



Characterization of the mycorrhizal synthesis between *Pinus cooperi* C. E. Blanco and *Suillus placidus* (Bonord.) Singer under nursery conditions

Caracterización de la síntesis micorrícica de *Pinus cooperi* C. E. Blanco con *Suillus placidus* (Bonord.) Singer en vivero

✉ Laura E. Martínez-Nevárez¹; ✉ José L. García-Rodríguez²; ✉ José Á. Prieto-Ruiz¹; ✉ José Á. Sigala-Rodríguez²; ✉ Artemio Carrillo-Parra³; ✉ Pedro A. Domínguez-Calleros¹; ✉ Magdalena Martínez-Reyes^{4*}

¹Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Av. río Papaloapan y Bulevar Durango s/n, col. Valle del Sur. C. P. 34120. Durango, Durango, México.

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Valle del Guadiana. Carretera El Mezquital-Durango, km 4.5. C. P. 34170. Durango, Durango, México.

³Universidad Juárez del Estado de Durango, Instituto de Silvicultura e Industria de la Madera. Av. Veterinaria núm. 501, esquina con Bulevar del Guadiana, Circuito Universitario. C. P. 34120. Durango, Durango, México.

⁴Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, col. Montecillo. C. P. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

*Corresponding author: martinezreyes2012@gmail.com

Abstract

Introduction. Ectomycorrhizal fungi of the genus *Suillus* have a high degree of affinity with *Pinus* spp.; however, associations between species of the two genera are not always compatible. To date, there are no reports describing the ectomycorrhizal association between *Pinus cooperi* C. E. Blanco and any ectomycorrhizal fungal species.

Objective. The objective of this study was to verify and characterize the mycorrhizal association between *P. cooperi* and *Suillus placidus* (Bonord.) Singer under nursery conditions.

Materials and methods. *P. cooperi* seedlings were inoculated at three months of age with the hymenium of *S. placidus*. Sixteen months after sowing, mycorrhizal roots were sampled for the molecular and morphoanatomical characterization of the ectomycorrhizal morphotypes.

Results. Genetic sequencing shared 99.67-100 % identity with *S. placidus* sequences available in GenBank. The ectomycorrhizal system was abundant, with dichotomous morphotypes and an external mycelium containing rhizomorphs. The cellular arrangement of the fungal mantle was plectenchymatous, and the Hartig net extended to the third layer of cortical cells.

Conclusion. The mycorrhizal synthesis between *P. cooperi* and *S. placidus* was confirmed. This represents the first description of a symbiotic association involving this phytobiont.

Keywords: molecular characterization, ectomycorrhiza, fungal mantle, morphotypes, rhizomorphs.

Resumen

Introducción. Las ectomicorizas del género *Suillus* tienen un alto grado de afinidad con *Pinus* spp.; no obstante, la asociación entre las especies de ambos géneros no siempre es compatible. Específicamente para *Pinus cooperi* C. E. Blanco, a la fecha, no hay reportes de la descripción de la asociación con algún hongo ectomicorrícico.

Objetivo. Comprobar y describir la asociación micorrícica entre *P. cooperi* y *Suillus placidus* (Bonord.) Singer en vivero.

Materiales y métodos. Las plantas de *P. cooperi* se inocularon a los tres meses de edad con himenio de *S. placidus*. Dieciséis meses después de la siembra, las raíces micorizadas se muestrearon para la caracterización molecular y morfoanatómica de los morfotipos.

Resultados. La secuenciación genética tuvo un rango de 99.67 a 100 % de afinidad con datos del GenBank para *S. placidus*. El sistema micorrícico fue abundante con morfotipos dicotómicos y micelio externo con presencia de rizomorfos. El arreglo celular del manto fúngico fue plectenquimatoso y la red de Hartig cubrió hasta la tercera capa de células corticales.

Conclusión. Se comprobó la síntesis micorrícica entre *P. cooperi* con *S. placidus*. Se describe por primera vez una asociación simbiótica para el fitobionte.

Palabras clave:

caracterización molecular, ectomicoriza, manto fúngico, morfotipos, rizomorfos.

Please cite this article as follows (APA 7): Martínez-Nevárez, L. E., García-Rodríguez, J. L., Prieto-Ruiz, J. A., Sigala-Rodríguez, J. A., Carrillo-Parra, A., Domínguez-Calleros, P. A., & Martínez-Reyes, M. (2026). Characterization of the mycorrhizal synthesis between *Pinus cooperi* C. E. Blanco and *Suillus placidus* (Bonord.) Singer under nursery conditions. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 32, e25012. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2025.06.012>



Introduction

The root systems of 90 % of the world's vascular plants are associated with soil fungi through a mutualistic symbiotic relationship. This type of association is known as mycorrhiza; seven types are recognized, although arbuscular mycorrhiza and ectomycorrhiza (ECM) are the most important and widely distributed forms in forest ecosystems (Smith & Read, 2008). ECM predominates in trees of the family Pinaceae, which are primarily associated with ectomycorrhizal fungi belonging to the phyla Basidiomycota and Ascomycota (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2020).

In ECM associations, fungal hyphae form the fungal mantle, a sheath-like structure that envelops plant root tips. The hyphae of this mantle grow bidirectionally, extending outward into the soil to form the external mycelium and inward into the root through the intercellular spaces of the cortical cell, where they form the Hartig net (Barragán-Soriano et al., 2022; Pérez-Moreno & Read, 2004). Through the external mycelium, plants can access water beyond the immediate root zone and efficiently transport it to the xylem, thereby enhancing the water relations of host plants (Brunner et al., 2015).

Ectomycorrhizal fungi (EMF) can transfer essential nutrients to phytobionts because of their enhanced capacity for soil exploration and access to available soil nutrients; however, in high fertile sites, EMF diversity and colonization rates decline (Kumar & Atri, 2018). Furthermore, EMF influence bacterial communities and heavy metal dynamics through physiological and nutritional mechanisms in the host plant (Chot & Reddy, 2022; Song et al., 2025; Yuan et al., 2026). It has also been reported that EMF can improve nonstructural carbohydrate storage in plants under severe drought conditions (Wang et al., 2021a); in return, EMF receive photosynthesis-derived carbohydrates from their host plants (Smith & Read, 2008). Furthermore, EMF inoculation during the nursery stage can enhance plant growth following transplantation, especially in disturbed environments (Murata et al., 2017). Thus, EMF enhance the success and survival of reforestation programs, forest plantations, and the rehabilitation of degraded forest lands (Hui et al., 2018; Smith & Read, 2008).

The effects of EMF on plants vary depending on the specific interaction between phytobiont and mycobiont species (Cheng et al., 2024) and are reflected in differences in plant stress tolerance and morphophysiological responses (Bai et al., 2021). Moreover, incompatibility between symbionts may occur, even among species within the same genus (Liao et al., 2016), therefore, it is necessary to evaluate the compatibility between different species and subsequently determine their persistence and effects on

Introducción

El sistema radical del 90 % de las plantas vasculares del planeta está asociado con hongos del suelo en una relación simbiótica mutualista. Este tipo de unión se conoce como micorriza; hay siete tipos, pero la micorriza arbuscular y la ectomicorriza (ECM) son las de mayor importancia y distribución en ecosistemas forestales (Smith & Read, 2008). La ECM predomina en árboles de la familia Pinaceae, asociados principalmente con hongos ectomicorrícicos de los filos Basidiomycota y Ascomycota (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2020).

En la asociación de ECM, las estructuras filamentosas de los hongos, llamadas hifas fúngicas, conforman el manto fúngico, el cual recubre los ápices de las raíces de las plantas en forma de un manto. Las hifas de dicho manto, a su vez, crecen de forma bidireccional hacia afuera en el suelo formando el micelio externo y hacia adentro de la raíz a través de los espacios intersticiales de las células del córtex, formando la red de Hartig (Barragán-Soriano et al., 2022; Pérez-Moreno & Read, 2004). A través del micelio externo, las plantas pueden adquirir agua no disponible en la zona inmediata del sistema radical y transportarla de manera eficiente hasta el xilema, lo cual mejora las relaciones hídricas de las plantas hospedadoras (Brunner et al., 2015).

Los hongos ectomicorrícicos (HECM) pueden transferir nutrientes esenciales a los fitobiontes, debido a su mayor capacidad de exploración y acceso a la solución del suelo; sin embargo, en sitios con fertilidad alta, la diversidad de HECM y la tasa de colonización disminuyen (Kumar & Atri, 2018). Por otra parte, los HECM modulan las comunidades bacterianas y la dinámica de metales pesados mediante mecanismos fisiológicos y nutricionales de la planta (Chot & Reddy, 2022; Song et al., 2025; Yuan et al., 2026). También se ha documentado que los HECM pueden mejorar el almacenamiento de carbohidratos no estructurales en las plantas en condiciones de sequía severa (Wang et al., 2021a); a cambio, los HECM obtienen carbohidratos derivados de la fotosíntesis de las plantas (Smith & Read, 2008). Asimismo, la inoculación con HECM en etapa de vivero puede beneficiar el crecimiento de plantas después del trasplante, especialmente en áreas perturbadas (Murata et al., 2017). De esta manera, los HECM favorecen el éxito y supervivencia de las reforestaciones, plantaciones y rehabilitación de tierras forestales (Hui et al., 2018; Smith & Read, 2008).

Los efectos de los HECM en las plantas varían según la interacción específica entre especies de fitobionte y micobionte (Cheng et al., 2024) y se reflejan en diferencias de la tolerancia al estrés y la respuesta morfofisiológica en las plantas (Bai et al., 2021). Además, puede existir incompatibilidad entre simbioses, incluso dentro del mismo género (Liao et al., 2016), por lo que es

plant development (Gomes et al., 2016). In this context, molecular tools allow the identification of species involved in ECM symbioses (Ángeles-Argáiz & Garibay-Orijel, 2019; Wang et al., 2021b); however, these techniques are specialized and expensive, limiting their widespread application. The characterization of ECM associations using morphological and anatomical descriptors provides a complementary and accessible approach (Janowski & Leski, 2023), particularly when sophisticated equipment and financial resources for molecular analyses are unavailable. Additional informative non-anatomical features may also be considered, including chemical reactions and ECM coloration (Agerer, 2006; Janowski & Leski, 2023). Nevertheless, the integration of molecular tools with morphotype characterization has been demonstrated to be more effective for species identification than either method used independently (Estevão et al., 2018; Marozzi et al., 2018).

The information derived from ECM descriptions is essential for identifying fungi associated with a specific phytobiont when sporocarps and molecular analyses are unavailable (Baeza et al., 2021; Rodríguez-Gómez-Tagle et al., 2024; Soto-Gil et al., 2022). Several EMF associated with plants of the genera *Abies* Mill., *Pinus* L. and *Quercus* L. have been characterized by Agerer (1991, 1995, 2001, 2006). Digital databases, such as DEEMY, an information system for the characterization and determination of ectomycorrhizae, which provides valuable resources containing extensive ECM characterization data (DEEMY, 2024). A practical application of ECM description is the assessment of the effects of specific silvicultural practices on EMF diversity, richness, and abundance under different environmental conditions, supporting the development of strategies for conserving genetic resources and restoring forest ecosystems (Soto-Gil et al., 2022), as well as for studies on species distribution (Pietras et al., 2018).

Pinus cooperi C. E. Blanco is an endemic conifer of the Sierra Madre Occidental (SMO), with a natural distribution in the Mexican states of Chihuahua, Durango and Nayarit (García & González, 2003). In the state of Durango, *P. cooperi* is one of the main species produced in forest nurseries due to its widespread use in reforestation programs. The species is valued for its high-quality timber and significant economic value (Graciano-Luna et al., 2025). To date, several studies have focused on the production of high-quality *P. cooperi* nursery stock to improve seedling survival and field performance (González-Orozco et al., 2018; Martínez-Nevárez et al., 2023; Prieto-Ruíz et al., 2018). Optimal fertilization regimes to promote ectomycorrhizal colonization have also been studied (Martínez-Nevárez et al., 2025). However, studies providing a detailed morphoanatomical characterization of ectomycorrhizae (ECM) associated with this species are still lacking.

necesario comprobar la compatibilidad entre organismos de especies distintas y, posteriormente, su persistencia y efectos en el desarrollo vegetal (Gomes et al., 2016). En este sentido, existen herramientas moleculares que definen las especies involucradas en una simbiosis ECM (Ángeles-Argáiz & Garibay-Orijel, 2019; Wang et al., 2021b); sin embargo, son técnicas especializadas y costosas, por lo que se utilizan con poca frecuencia. La identificación de la ECM con descriptores morfológicos y anatómicos es una herramienta complementaria y accesible (Janowski & Leski, 2023), especialmente cuando se carece de equipos sofisticados y recursos económicos para realizar análisis moleculares. También pueden estar presentes otros rasgos informativos no anatómicos, como las reacciones químicas y el color de la ECM (Agerer, 2006; Janowski & Leski, 2023). No obstante, se ha demostrado que el uso de herramientas moleculares, junto con la caracterización de morfotipos, es más efectiva para la identificación de especies que cuando se utilizan por sí solas (Estevão et al., 2018; Marozzi et al., 2018).

La información en las descripciones de ECM es importante para reconocer a los hongos asociados a un fitobionte en particular, en ausencia de esporomas y análisis moleculares (Baeza et al., 2021; Rodríguez-Gómez-Tagle et al., 2024; Soto-Gil et al., 2022). Varios HECM con plantas de los géneros *Abies* Mill., *Pinus* L. y *Quercus* L. se han caracterizado por Agerer (1991, 1995, 2001, 2006). También existen bancos de información digital como DEEMY, un sistema de información para la caracterización y determinación de ectomicorrizas, que ofrece información con una cantidad importante de caracterizaciones de ECM (DEEMY, 2024). Una implicación práctica es la comprensión del impacto de ciertas prácticas silvícolas sobre la diversidad, riqueza y abundancia de HECM en condiciones diversas, para buscar estrategias que conserven el reservorio genético y la restauración de ecosistemas forestales (Soto-Gil et al., 2022) o bien para estudios de distribución de las especies (Pietras et al., 2018).

Pinus cooperi C. E. Blanco es una variedad endémica de la Sierra Madre Occidental (SMO) con distribución natural en Chihuahua, Durango y Nayarit (García & González, 2003). En el estado de Durango, *P. cooperi* es una de las principales especies producidas en vivero por su uso amplio en los programas de reforestación, ya que aporta madera de buena calidad y de mayor valor económico (Graciano-Luna et al., 2025). A la fecha, se han realizado estudios en vivero para la producción de planta de *P. cooperi* de calidad, con la finalidad de aumentar la supervivencia y desarrollo en campo (González-Orozco et al., 2018; Martínez-Nevárez et al., 2023; Prieto-Ruíz et al., 2018), y se han analizado las dosis óptimas de fertilización para favorecer la colonización ectomicorrícica (Martínez-Nevárez et al., 2025). No obstante, aún se carece de estudios que describan morfoanatómicamente las ECM en esta especie.

Species of the genus *Suillus* are widely distributed throughout the SMO and are well known for their ability to establish ectomycorrhizal associations with *Pinus* spp. This characteristic has led to their consideration as pioneer fungi with potential uses as bioinoculants in forest nurseries (Lofgren et al., 2024; Pérez-Moreno et al., 2020; Policelli et al., 2019); additionally, they are edible mushrooms consumed in central Mexico (Garibay-Orijel et al., 2013). However, it is important to confirm and characterize the interaction between these two symbionts to subsequently promote the use of *S. placidus* as a bioinoculant for nursery seedling production. Therefore, the objective of this study was to confirm and describe the mycorrhizal association between *P. cooperi* and *Suillus placidus* (Bonord.) Singer under nursery conditions.

Material and Methods

Sporocarp collection area

Sporocarps were collected from a pine-oak forest in the SMO, characterized by the predominance of *P. cooperi*, *P. durangensis* Martínez, and *Quercus* spp. The collection site is located in the ejido El Brillante, Pueblo Nuevo, Durango, Mexico, between 23° 40' 30"-23° 50' 35" N and 105° 30' 30"-105° 19' 30" W, at elevations ranging from 2 200 to 2 800 m. The climate is temperate subhumid with a semi-cold regime and summer rainfall, with annual precipitation ranging from 700 to 1 300 mm and temperatures between 10 and 18 °C (Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2025).

Fungal material collection

In July 2021, during the rainy season, EMF sporocarps with morphological characteristics consistent with

Los hongos del género *Suillus* se distribuyen ampliamente en la SMO y son conocidos por su capacidad alta para asociarse a plantas de *Pinus* spp., por lo que se consideran especies pioneras con potencial de uso como bioinoculante en vivero (Lofgren et al., 2024; Pérez-Moreno et al., 2020; Policelli et al., 2019); además, son hongos comestibles en estados del centro de México (Garibay-Orijel et al., 2013). No obstante, es importante confirmar y caracterizar la asociación entre ambos simbiontes para promover, posteriormente, el uso de *S. placidus* como bioinoculante en la producción de planta en vivero. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue comprobar y describir la asociación micorrícica entre *P. cooperi* y *Suillus placidus* (Bonord.) Singer en vivero.

Materiales y métodos

Área de recolección de esporomas

Los esporomas se recolectaron en un bosque de pino-encino de la SMO con predominancia de *P. cooperi*, *P. durangensis* Martínez y especies del género *Quercus*. El sitio se ubica en las coordenadas 23° 40' 30" a 23° 50' 35" N y 105° 30' 30" a 105° 19' 30" O en el ejido El Brillante, Pueblo Nuevo, Durango, México, con altitudes de 2 200 a 2 800 m. El clima es templado semifrío subhúmedo con lluvias en verano, precipitación anual entre 700 y 1 300 mm y temperaturas entre 10 y 18 °C (Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2025).

Obtención del material fúngico

En julio de 2021, durante la temporada de lluvias, se recolectaron esporomas de HECM con características morfológicas afines a *S. placidus* (Figura 1a). El material de estudio se colocó y transportó en canastas de

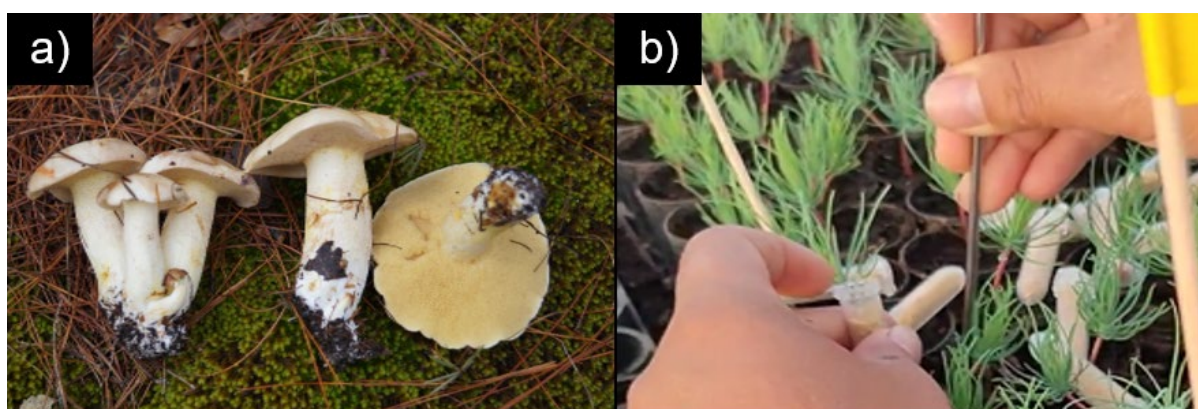


Figure 1. Eleven-week-old *Pinus cooperi* seedlings at the nursery stage inoculated with basidiomata identified as *Suillus placidus*. A) Fresh basidiomata collected from the field; b) inoculation through the direct application of dried and ground hymenial tissue to the growing medium.

Figura 1. Plantas de *Pinus cooperi* de 11 semanas, en etapa de vivero, inoculadas con esporomas afines a *Suillus placidus*. a) Esporomas frescos recolectados en campo; b) inoculación mediante aplicación de himenios secos y molidos directamente en el medio de crecimiento.

S. placidus were collected (Figure 1a). The collected material was placed in and transported using wicker baskets to promote spore dispersal, aeration, and the preservation of specimen integrity.

Laboratory processing

The fungal material was processed under laboratory conditions by separating the hymenium from the pileus and drying it on mesh racks (0.5 cm mesh size) at room temperature (<30 °C). Once dried, the hymenium was ground using an electric mill (Thomas Model 4 Wiley® Mill) equipped with a 1 mm sieve. The processed material contained 1.07×10^7 spores·g⁻¹, quantified using a hemocytometer. The inoculum was stored in plastic containers under refrigeration at 4 °C for 90 days until nursery application (Barragán-Soriano et al., 2022; Figure 1b).

Seedling production

P. cooperi seedlings were produced at the forest nursery of the Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED) in Durango, Mexico. Seeds were collected from natural pine-oak stands in the Guajolotes community (24° 27' 39.75" N and 105° 32' 53" W, 2 540 m) municipality of San Dimas, Durango, Mexico.

Growing containers consisted of 170 mL black polyethylene conical tubes, 20 cm in length, with diameters of 2 cm at the base and 4 cm at the top. The growing substrate consisted of a mixture of 60 % peat and 40 % composted pine bark. Before filling the containers, the substrate was disinfected with a solution containing 6.26 mL·L⁻¹ of a commercial bactericide-fungicide (quats + copper sulfate pentahydrate, Anibac Plus®, Mexico). The substrate rested for two days and was subsequently steam-sterilized for 2 h on two consecutive days. Before sowing, the seeds were soaked in water for 24 h and then disinfected in a 10 % sodium hypochlorite solution for 10 min. On September 13, 2021, the seeds were treated with a fungicide (Thiabendazole: 2-(4-thiazolyl) - 1H benzimidazole, Tecto® 60, Syngenta AG, Mexico) to control potential parasitic or pathogenic fungi, followed by sowing (Prieto Ruíz et al., 2009).

At seven weeks after sowing, water-soluble fertilizers were manually applied with irrigation twice per week, with an additional irrigation using water only between fertilization events. Fertilization was carried out at a rate of 60 mg nitrogen (N) per seedling and supplemented with phosphorus (P), potassium (K), magnesium (Mg), calcium (Ca), and sulfur (S) (Prieto Ruíz et al., 2009). In addition, a chelated micronutrient mixture (Ultrasol® micro, Rexene®, SQM, Chile) was

mimbres, para favorecer la dispersión de esporas, la ventilación y la integridad física de los ejemplares.

Procesamiento en laboratorio

El material fúngico se procesó en condiciones de laboratorio, donde se separó el himenio del píleo y se secó sobre bastidores con malla tamiz de 0.5 cm a temperatura ambiente (<30 °C). Una vez seco, el himenio se molió en un molino eléctrico para forraje (Thomas Model 4 Wiley® Mill) con tamiz de 1 mm. El material procesado tuvo un contenido de 1.07×10^7 esporas·g⁻¹, contabilizadas con un hematócitómetro. El inóculo se almacenó durante 90 días en recipientes plásticos en refrigeración a 4 °C hasta su utilización en vivero (Barragán-Soriano et al., 2022; Figura 1b).

Producción de plantas

La planta de *P. cooperi* se produjo en el vivero forestal de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED) en Durango, México. Las semillas se recolectaron en rodales naturales de pino-encino de la comunidad Guajolotes (24° 27' 39.75" N y 105° 32' 53" O, 2 540 m), municipio de San Dimas, Durango, México.

Los envases de cultivo fueron tubetes cónicos de polietileno negro de 170 mL, con 20 cm de largo y diámetros de 2 cm en la base y 4 cm en la parte superior. Como sustrato se empleó una mezcla de 60 % de turba y 40 % de corteza de pino compostada. Previo al llenado del envase, el sustrato se desinfectó con una solución de 6.26 mL·L⁻¹ de bactericida-fungicida comercial (sales cuaternarias de amonio + sulfato de cobre pentahidratado, Anibac Plus®, México). El sustrato reposó por dos días y, posteriormente, se sometió a esterilización en vapor de agua durante dos horas por dos días. Previo a la siembra, la semilla se remojó en agua durante 24 h y luego se desinfectó en una solución de hipoclorito de sodio al 10 % por 10 minutos. El 13 de septiembre de 2021, la semilla se impregnó con fungicida (Tiabendazol: 2-(4-tiazolil) - 1H benzimidazol, Tecto® 60, Syngenta AG, México) para el control de posibles hongos parásitos o patógenos y se procedió a la siembra (Prieto Ruíz et al., 2009).

Siete semanas después de la siembra se aplicaron fertilizantes hidrosolubles junto con el riego de forma manual dos veces por semana y un riego intermedio con solo agua. La fertilización se hizo a razón 60 mg de nitrógeno (N) por planta y se complementó con proporciones de fósforo (P), potasio (K), magnesio (Mg), calcio (Ca) y azufre (S) (Prieto Ruíz et al., 2009). Además, se aplicó un complejo de micronutrientes quelatados (Ultrasol® micro, Rexene®, SQM, Chile) a razón de 0.35 g·L⁻¹. Las plantas crecieron durante 24 semanas

applied at a concentration of 0.35 g·L⁻¹. Seedlings developed under greenhouse conditions for 24 weeks at 15.5 °C and 47.2 % relative humidity; subsequently, they were placed under shade-house conditions for 15 weeks at 22.4 °C and 44.6 % relative humidity. The remaining period of development, until evaluation of the mycorrhizal system (29 weeks), occurred under outdoor conditions at a mean temperature of 22.6 °C and relative humidity of 58 %.

Ectomycorrhizal inoculation

Inoculation was performed in two applications. The first application was carried out seven weeks after sowing, when third-order roots emerged, and the second was conducted at 11 weeks. For each application period, 0.5 g of inoculum was applied per seedling. Using a laboratory spatula, the superficial layer of the substrate surrounding the root was carefully removed, the inoculum contained in Eppendorf microcentrifuge tubes was applied, and the root was covered with the previously removed substrate (Figure 1b). Finally, a light irrigation was applied to promote spore dispersion throughout the substrate mixture and facilitate contact with the plant root system (Barragán-Soriano et al., 2022).

Morphotype sampling

After 16 months of growth under nursery conditions, 25 plants were randomly selected and analyzed in the Mycorrhiza laboratory of the Edaphology Building at the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, where molecular identification and morphological and anatomical characterization of the ectomycorrhizae (ECM) present in the root system of *P. cooperi* plants were performed. The root systems were examined using a stereomicroscope (Leica®, EZ4, USA), which allowed the identification and selection of representative mycorrhizal systems. Subsequently, the mycorrhizal structures were separated from the root ball under a stereomicroscope using a scalpel, following the recommendations of Agere (1991).

Molecular characterization of morphotypes

From the total number of samples, three morphotypes were selected and placed in Eppendorf tubes containing 70 % ethanol under aseptic conditions. These samples were analyzed using the fungal internal transcribed spacer (ITS) region with the ITS5/ITS4 primers (White et al., 1990).

Amplification of each deoxyribonucleic acid (DNA) region was performed by preparing the polymerase chain reaction (PCR) mixture to a final volume of 13 µL (Table 1). Amplifications were carried out with an

en condiciones de invernadero a 15.5 °C y 47.2 % de humedad relativa; posteriormente, estuvieron en un área con malla sombra durante 15 semanas a 22.4 °C y 44.6 % de humedad relativa. El resto de su desarrollo, hasta la evaluación del sistema micorrícico (29 semanas), ocurrió en condiciones de intemperie a temperatura media de 22.6 °C y humedad relativa de 58 %.

Inoculación ectomicorrícica

La inoculación se hizo en dos aplicaciones. La primera a las siete semanas después de la siembra, momento en que aparecieron las raíces de tercer orden, y la segunda a las 11 semanas. Para cada período se aplicaron 0.5 g de inóculo por planta. Con una espátula de laboratorio se removió cuidadosamente la capa superficial del sustrato alrededor de la raíz, se aplicó el inoculante contenido en tubos de microcentrífuga Eppendorf y la raíz se cubrió con el sustrato removido previamente (Figura 1b). Por último, se aplicó un riego ligero para favorecer la diseminación de las esporas por la mezcla de sustrato y facilitar su contacto con el sistema radical de las plantas (Barragán-Soriano et al., 2022).

Toma de muestras de morfotipos

Después de 16 meses de cultivo en vivero, se tomaron 25 plantas al azar y se analizaron en el laboratorio de Micorrizas del edificio de Edafología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, donde se realizó la identificación molecular y la caracterización morfológica y anatómica de las ECM presentes en el sistema radical de las plantas de *P. cooperi*. El sistema radical se examinó con un estereoscopio (Leica®, EZ4, EUA) que permitió la identificación y selección de los sistemas micorrícicos representativos. Posteriormente, se separaron del cepellón bajo estereoscopio con un bisturí, según las recomendaciones de Agerer (1991).

Caracterización molecular de morfotipos

Del total de las muestras se eligieron tres morfotipos y se colocaron en tubos Eppendorf con alcohol al 70 %, bajo condiciones de asepsia. Estos se analizaron mediante el espacio transcrita interno (ITS) para hongos, con los iniciadores ITS5/ITS4 (White et al., 1990).

Se hicieron amplificaciones de cada región de ácido desoxirribonucleico (ADN), para lo cual se preparó la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a un volumen final de 13 µL (Cuadro 1). Las amplificaciones se realizaron con un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 4 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, hibridación con los iniciadores a 57 °C durante 1 min, seguido de una extensión final de 2 min a 72 °C. Todas las reacciones de PCR se hicieron en un Peltier Thermal Cycler PTC-200 (BIORAD, México). Las

Table 1. PCR reaction mixture for DNA amplification of ectomycorrhizal root morphotypes of *Pinus cooperi* inoculated with *Suillus placidus*.**Cuadro 1. Mezcla de reacción en PCR para la amplificación de ADN de morfotipos de raíces ectomicorrizadas de *Pinus cooperi* inoculadas con *Suillus placidus*.**

Reagent/ Reactivo	Stock concentration/ Concentración	Final concentration/ Concentración final	Volume (1X)/Volumen (1X) (μ L)
Nuclease-free water/ Agua libre de nucleasas	-		7.6
PCR buffer	10X	1X	3.0
dNTP	10 mM	0.2 mM	0.6
ITS4 primer	100 μ M	10 μ M	0.2
ITS5 primer	100 μ M	10 μ M	0.2
Go Taq DNA polymerase/ Go Taq DNA polimerasa	5 U	2 U	0.4
DNA	100 ng	20 ng· μ L ⁻¹	1.0
Final volume/ Volumen final			13

initial denaturation cycle at 95 °C for 4 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 1 min, primer annealing at 57 °C for 1 min, with a final extension at 72 °C for 2 min. All PCR reactions were performed using a Peltier Thermal Cycler PTC-200 (BIORAD, Mexico). The amplification products were verified by electrophoresis on a 1.5 % agarose gel prepared with 1X TAE (Tris Acetate-EDTA) buffer and run at 95 V·cm⁻³ for 1 h. The gel was stained with GelRed (Biotium, USA), and the bands were visualized using a transilluminator (Infinity 3000 Vilber Lourmat, Germany). The amplified products were purified using the ExoSAP kit (Affymetrix, USA), according to the manufacturer's instructions (Martínez-González et al., 2017).

The purified PCR products were sequenced using an Applied Biosystems (3730XL, USA). Forward and reverse sequences were analyzed, edited, and assembled using BioEdit version 7.0.5 (Hall, 1999) to generate consensus sequences. The resulting sequences were compared with those deposited in the GenBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), using the BLASTN 2.2.19 search tool (Zhang et al., 2000).

Morphological and anatomical characterization of ectomycorrhiza

For the anatomical characterization, five morphotypes were selected, and transverse and longitudinal sections were prepared, along with four sections of the fungal mantle. A total of nine permanent slides were prepared, each containing an average of nine sections. Melzer's reagent was used as a staining medium to facilitate the observation and description of the ectomycorrhiza structures. The sections were examined and photographed using a light microscope

amplificaciones se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % preparado con 1X TAE *buffer* (Tris Acetate-EDTA) y se corrieron a 95 V·cm⁻³ durante 1 h. El gel se tiñó con Gel red (Biotium, EUA) y las bandas se visualizaron en un transiluminador (Infinity 3000 Vilber Lourmat, Alemania). Los productos amplificados se purificaron con el kit ExoSAP (Affymetrix, EUA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Martínez-González et al., 2017).

Los productos se secuenciaron en un Applied Biosystems (3730XL, EUA). Las secuencias de ambas hebras se analizaron, editaron y ensamblaron usando BioEdit version 7.0.5 (Hall, 1999) para generar una secuencia consenso. Estas se compararon con las depositadas en GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), empleando la herramienta BLASTN 2.2.19 (Zhang et al., 2000).

Caracterización morfológica y anatómica de la ectomicorriza

Para realizar la caracterización anatómica, se tomaron cinco morfotipos a los que se hicieron cortes transversales y longitudinales, y cuatro del manto fúngico; se realizaron nueve preparaciones fijas en total, con nueve cortes en promedio cada una. El reactivo Melzer se utilizó como medio de contraste para la observación de los cortes y descripción de micorrizas. Los cortes se observaron y fotografiaron con un microscopio óptico (Leica®, DM1000, EUA) con los objetivos 40x y 100x y cámara acoplada (Leica®, DFC290 HD, EUA). Las mediciones se realizaron en el material fotográfico con el procesador de imágenes digitales ImageJ 1.50i (Wayne Rasband/National Institutes of Health [NIH], Bethesda, MD, EUA). Los

(Leica®, DM1000, USA) equipped with 40x and 100x objectives and an attached camera (Leica®, DFC290 HD, EUA). Measurements were performed on photographic material using the digital image processing software ImageJ 1.50i (Wayne Rasband/National Institutes of Health [NIH], Bethesda, MD, USA). Central tendency statistics from 25 measurements of the morphotypes and mycorrhizal structures were calculated using RStudio software version 24.12.1 (R Core Team, 2025). The Munsell color chart (Munsell Plant Tissue, Color Book, Munsell Color®, USA) was used to describe the color of the ectomycorrhizae. All mycorrhizal tips were described morphologically and anatomically according to Agerer (1991, 1995, 2006) and DEEMY (2024).

Results and Discussion

Homology analysis of the obtained sequences, compared with those deposited in the GenBank database, revealed a phylogenetic affinity of 99.67 to 100 % with *S. placidus*. Two sequence alignments showed 100 % identity (accessions QQ474973.1 and QQ474973.2), whereas one sample showed 99.67 % sequence similarity (accessions PP850419.1; Table 2). No insertion or deletions were detected that would suggest the presence of cryptic species or intraspecific variants in the sample population. Intraspecific genetic diversity parameters, estimated using the Kimura two-parameter nucleotide substitution model, yielded genetic distances below 0.005, confirming the high conservation of the ITS region among *S. placidus* individuals associated with *P. cooperi*. These results validate the taxonomic identity of the fungal symbiont in the samples studied. This finding is highly significant because not all fungal and plant species establish a functional symbiotic association. Symbiotic compatibility is governed by molecular recognition mechanisms involving signaling mediated by root exudates and the differential expression of genes in both partners (Feng et al., 2022; Liao et al., 2016). Confirmation of this compatibility under controlled nursery conditions has important ecological and biotechnological implications, particularly for

estadísticos de tendencia central de 25 mediciones de los morfotipos y de las estructuras micorrícicas se calcularon en el *software* RStudio 24.12.1 (R Core Team, 2025). Para describir el color de las micorrizas, se utilizó la carta de colores Munsell (Munsell Plant Tissue, Color Book, Munsell Color®, EUA). Todos los ápices micorrizados se describieron morfológica y anatómicamente según Agerer (1991, 1995, 2006) y DEEMY (2024).

Resultados y discusión

El análisis de homología de las secuencias obtenidas, comparadas con las depositadas en la base de datos del GenBank, reveló afinidad filogenética de 99.67 al 100 % con *S. placidus*. Dos alineamientos de secuencias mostraron identidad del 100 % (accesiones QQ474973.1 y QQ474973.2), mientras que una de las muestras presentó 99.67 % de similitud (accesión PP850419.1; Cuadro 2). No se detectaron inserciones ni deleciones que sugieran la presencia de especies crípticas o variantes intraespecíficas en la población muestreada. Los parámetros de diversidad genética intraespecífica, calculados mediante el modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura-2-parámetros, arrojaron distancias genéticas inferiores de 0.005, lo que confirma conservación alta de la región ITS entre los individuos de *S. placidus* asociados a *P. cooperi*. Por tanto, se valida la identidad taxonómica del simbionte fúngico en las muestras analizadas. Este hallazgo es de gran relevancia, ya que no todas las especies de hongos y plantas establecen una asociación funcional; la compatibilidad simbiótica está determinada por mecanismos moleculares de reconocimiento que involucran la señalización mediada por exudados radicales y la expresión diferencial de genes en ambos organismos (Feng et al., 2022; Liao et al., 2016). La certeza de dicha afinidad en condiciones controladas de vivero tiene implicaciones ecológicas y biotecnológicas importantes, particularmente en la promoción del crecimiento y desarrollo de las plantas hospederas, así como en su resiliencia frente a factores de estrés biótico y abiótico.

Table 2. Molecular identification of ectomycorrhizal morphotypes formed between *Pinus cooperi* and *Suillus placidus* after 16 months under nursery conditions based on phylogenetic affinity analysis and comparison with sequences deposited in GenBank. Cuadro 2. Identificación molecular de morfotipos ectomicorrícicos formados entre *Pinus cooperi* y *Suillus placidus*, a los 16 meses de cultivo en vivero, mediante análisis de afinidad filogenética y su comparación con secuencias depositadas en GenBank.

GenBank 1	e	Id (%)	Best GenBank Match/ Coincidencia en GenBank	GenBank 2
PQ380159	0	100	<i>Suillus placidus</i>	QQ474973.1
PQ380160	0	100	<i>Suillus placidus</i>	QQ474973.2
PQ380161	0	99.67	<i>Suillus placidus</i>	PP850419.1

e: identification error; Id: sequence similarity.
e: error en la identificación; Id: porcentaje de similitud entre las secuencias.

promoting the growth and development of the host plants and enhancing their resilience to both biotic and abiotic stress.

Although many ectomycorrhiza fungal species showed a broad host range (i.e., are generalist), others display a high degree of host specificity, forming associations with a restricted taxonomic group. This is the case for the genus *Suillus*, whose members preferentially associated with conifers in the family Pinaceae, particularly pines (*Pinus* spp.) and larches (*Larix* spp.) (Liao et al., 2016; Lofgren et al., 2024; Pietras et al., 2018). Host specificity in *S. placidus* has been documented in association with *Pinus cembra* L. (Keller, 1992), *P. massoniana* Lamb. (Li et al., 2021), *P. sibirica* Du Tour (Palamarchuk et al., 2021), *P. radiata* D. Don (Wang et al., 2022), and more recently, *P. cooperi* (Martínez-Nevárez et al., 2025). However, not all of these studies include a detailed morphoanatomical characterization of the ectomycorrhizae, highlighting the added value of the present study. The specificity observed in the *S. placidus* – *P. cooperi* interaction could be explained by molecular coevolution that has shaped the differential expression of genes involved in the production of signaling molecules (e. g., lipochitoooligosaccharides and gaseous exchange factors) and the release of compatible organic root exudates. These exudates not only promote hyphal elongation and branching but also increase the contact area and facilitate the establishment of the mycobiont within the phytobiont (Feng et al., 2022; Liao et al., 2016; Lofgren et al., 2024; Ramírez-Mendoza et al., 2026).

Morphological characteristics

The mycorrhizal system of *P. cooperi* colonized by *S. placidus* was characterized by the abundant formation of nest-like aggregates (Figures 2a, 2c and 2d). The mean, median, standard deviation, and coefficient of variation values for the ectomycorrhizae formed are presented in Table 3. The observed morphotypes ranged from 0.9 to 1.7 mm in length and from 0.3 to 0.5 mm in diameter, with predominantly dichotomous branching, although monopodial branching was occasionally observed (Figure 2c). The surface color of the ectomycorrhizae at the basal and middle regions was dark brown, corresponding to the 5YR 4/2 notation according to the Munsell color charts. The apical tips were straight, slightly cylindrical, and had a lighter color than the basal surface, corresponding to the 7.5YR 7/2 notations in the apical region, where slight thickening was also observed. The surface of the fungal mantle, observed under a stereomicroscope, was slightly rough and cottony in appearance. Dense emanating hyphae originating from the short roots and whitish extrametrical mycelium were observed (2.5Y 8/2 according to the Munsell color charts; Figure 2c).

Aunque muchas especies de hongos ectomicorrícicos presentan un espectro amplio de hospedantes (generalistas), otras muestran un grado alto de especificidad, asociándose con un grupo taxonómico restringido. Este es el caso del género *Suillus*, cuyos miembros se asocian preferentemente con coníferas de la familia Pinaceae, especialmente con pinos (*Pinus* spp.) y alerces (*Larix* spp.) (Liao et al., 2016; Lofgren et al., 2024; Pietras et al., 2018). La especificidad observada en *S. placidus* se ha documentado en asociación con *Pinus cembra* L. (Keller, 1992), *P. massoniana* Lamb. (Li et al., 2021), *P. sibirica* Du Tour (Palamarchuk et al., 2021), *P. radiata* D. Don (Wang et al., 2022) y, más recientemente, con *P. cooperi* (Martínez-Nevárez et al., 2025). Sin embargo, no todos estos estudios incluyen una caracterización morfoanatómica detallada de la ECM, lo que subraya el valor añadido del presente trabajo. La especificidad observada en la interacción *S. placidus* – *P. cooperi* podría explicarse por una coevolución molecular que ha moldeado la expresión diferencial de genes implicados en la producción de moléculas señal (v. g., lipoquitooligosacáridos y factores de intercambio gaseoso) y la liberación de exudados orgánicos compatibles por parte de la raíz. Estos exudados no solo promueven la elongación y ramificación de las hifas, sino que también aumentan el área de contacto y facilitan el anclaje del micobionte en el fitobionte (Feng et al., 2022; Liao et al., 2016; Lofgren et al., 2024; Ramírez-Mendoza et al., 2026).

Características morfológicas

El sistema micorrícico de *P. cooperi* colonizado por *S. placidus* se caracterizó por la formación abundante de agregados en forma de ‘nido’ (Figuras 2a, 2c y 2d). Los valores correspondientes a la media, mediana, desviación estándar y coeficiente de variación de la ectomicorriza formada son presentados en el Cuadro 3. Los morfotipos observados midieron 0.9 a 1.7 mm de longitud y 0.3 a 0.5 mm de diámetro, con ramificación predominantemente dicotómica, aunque en algunas ocasiones se registró una ramificación monopodial (Figura 2c). El color de la superficie de las ectomicorrizas en su base y parte media fue marrón oscuro, correspondiente a la notación 5YR 4/2 de las cartas de color Munsell. Las terminaciones de los ápices fueron rectas, ligeramente cilíndricas y exhibieron un tono más claro que la superficie de la base (notación 7.5YR 7/2 de las cartas de color Munsell) en la región apical, donde además se observó ligero engrosamiento. La superficie del manto fúngico vista en estereomicroscopio fue ligeramente rugosa y algodonosa. Se observaron hifas emanantes densas que se originaban a partir de la raíz corta y micelio extrametrical de color blanquecino (2.5Y 8/2 según las cartas Munsell; Figura 2c). Un rasgo distintivo fue la presencia de rizomorfos lisos, bien diferenciados y altamente desarrollados, que emergían en las

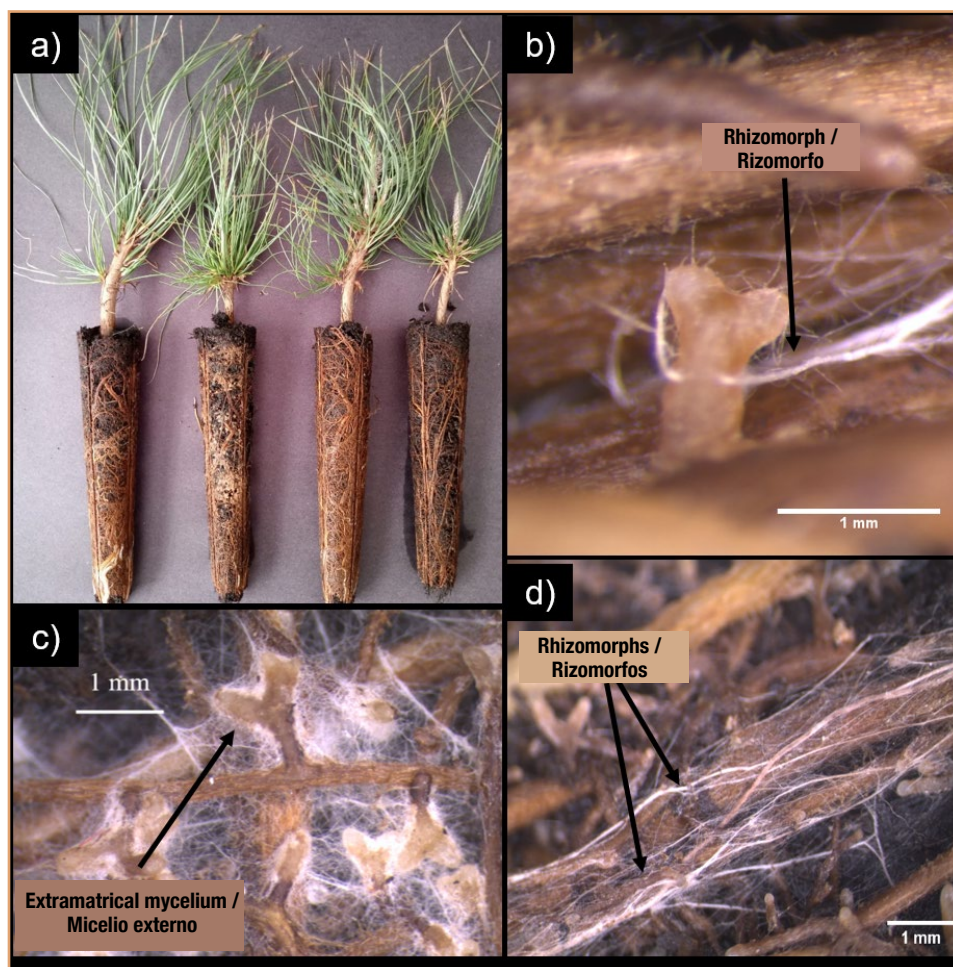


Figure 2. Morphological characteristics of ectomycorrhizae formed between the fungus *Suillus placidus* and the pine species *Pinus cooperi* after 16 months under nursery conditions. a) Well-structured *P. cooperi* root ball showing the presence of *S. placidus* ectomycorrhizal mycelium; b) rhizomorphs emerging from mycorrhizal root tips with dichotomous branching; c) mycorrhizal short roots with rhizomorphs characteristic of *Suillus* spp.; d) smooth and abundant rhizomorphs developed on *P. cooperi* roots.

Figura 2. Características morfológicas de las ectomicorrizas formadas entre *Suillus placidus* y *Pinus cooperi* a los 16 meses de cultivo en vivero. a) Cepellón de *P. cooperi* bien estructurado con presencia de micelio de la ectomicorriza de *S. placidus*; b) presencia de rizomorfos que emergen desde los ápices micorrizados con ramificación dicotómica; c) raíces cortas micorrizadas con presencia de rizomorfos, característicos de *Suillus* spp.; d) rizomorfos lisos y abundantes desarrollados en raíces de *P. cooperi*.

A distinctive feature was the presence of smooth, well-differentiated, and highly developed rhizomorphs emerging near the dichotomous branches and the tips of the ectomycorrhizal apices. These rhizomorphs measured 100-250 μm in diameter and were frequently associated with individual emanating hyphae (Figures 2b y 2d).

Anatomical description

As in the morphological characterization, the values for the mean, median, standard deviation, and coefficient of variation are provided in Table 3. The fungal mantle had a thickness of 23–29 μm and a type E plectenchymatous structure (Figure 3a). Mantle hyphae ranged from 3.5 to 5.0 μm in diameter, with cell lengths varying

proximidades de las dicotomías y de la punta de los ápices ectomicorrizados. Estos rizomorfos midieron entre 100 y 250 μm diámetro y se acompañaban frecuentemente de hifas emanantes individuales (Figuras 2b y 2d).

Descripción anatómica

Al igual que para la descripción morfológica, los valores correspondientes a la media, mediana, desviación estándar y coeficiente de variación se presentan en el Cuadro 3. El manto fúngico tuvo un espesor entre 23 y 29 μm y un arreglo celular plectenquimatoso de tipo E (Figura 3a). Las hifas del manto mostraron grosor entre 3.5 y 5.0 μm y longitud celular variable de 15 a 30 μm . Estas hifas de color marrón (5YR 5/6 según cartas

Table 3. Descriptive statistics for the ectomycorrhiza formed between the fungus *Suillus placidus* and the pine species *Pinus cooperi* after 16 months under nursery conditions (n = 25).

Cuadro 3. Estadísticos descriptivos de la ectomicorriza formada entre *Suillus placidus* y *Pinus cooperi* a los 16 meses de cultivo en vivero (n = 25).

Measurement / Medida	Morphotypes / Morfortipos		Anatomy / Anatomía			
	Length / Longitud	Diameter / Diámetro	Mantle / Manto	Hypha / Hifa	Cells / Células	Intercellular spaces / Espacios intersticiales
	(mm)		(µm)			
Minimum / Mínimo	0.9	0.3	23.0	3.2	44.0	4.0
Maximum / Máximo	1.7	0.5	29.0	5.0	80.0	9.0
Mean / Media	1.5	0.4	25.5	4.4	63.2	5.4
Median / Mediana	1.5	0.4	26.0	4.6	67.0	5.0
Standard deviation / Desviación estándar	0.2	0.1	1.8	0.6	10.3	1.2
Coefficient of variation (%) / Coeficiente de variación (%)	16.0	19.7	6.9	13.2	16.3	21.4

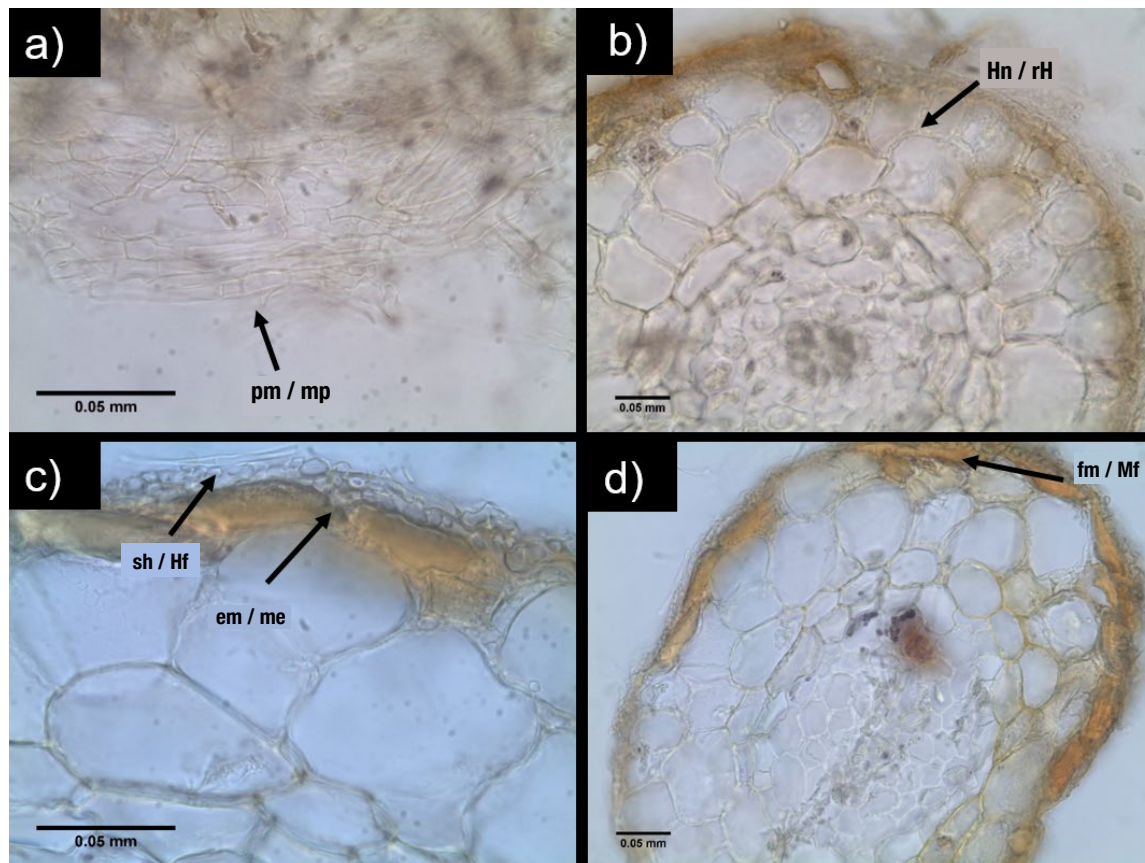


Figure 3. Anatomy of the ectomycorrhiza formed between the fungus *Suillus placidus* and the pine species *Pinus cooperi* after 16 months under nursery conditions. a) cross-section of the mantle with a plectenchymatous cellular arrangement (pm), type E; b) transverse section showing the Hartig net (Hn) extending to the third layer of cortical cells; c) external mycelium (em) with septate hyphae (sh); d) longitudinal section showing the fungal mantle (fm).

Figura 3. Anatomía de la ectomicorriza de *Pinus cooperi* con *Suillus placidus* a los 16 meses de cultivo en vivero. a) Corte del manto con arreglo celular plectenquimatoso (mp) de tipo E; b) corte transversal con la red de Hartig (rH) cubriendo hasta la tercera capa de células corticales; c) micelio externo (me) con hifas septadas (hf); d) corte longitudinal con apreciación del manto fúngico (mf).

between 15 and 30 μm . The brown mantle hyphae (5YR 5/6 according to the Munsell color charts) showed no reaction to Melzer's reagent and were composed of rectangular, branched hyphal elements, consistent with the classification proposed by Agerer (1991, 2006). The morphology of the host root cortical cells ranged from globose to rectangular, with diameters of 44–80 μm (Figure 3b). The Hartig net was well developed, extending into the second and, in some cases, the third layer of cortical cells containing tannins (Figures 3b and 3d). The width of the Hartig net in the intercellular spaces remained relatively constant, ranging from 4.8 to 6.1 μm . The extrametrical mycelium consisted of hyaline, filamentous, tubular, and septate hyphae (Figure 3c), with diameters ranging from 2.5 to 4.0 μm . The septa were simple and lacked clamp connections. No sexual or asexual reproductive structures (conidia) were observed directly on the mycorrhizal roots under the sampling conditions. Additionally, no amyloid reaction to Melzer's reagent was detected (absence of blue staining). The presence of phenolic compounds (tannins) in the cortical cells adjacent to the mantle and Hartig net was evidenced by their brown coloration (5YR 5/6 according to Munsell color charts), suggesting a possible localized defense response.

The morphological and anatomical evidence unequivocally confirmed the presence of the three diagnostic structures of ectomycorrhizae (ECM): the fungal mantle, the Hartig net, and the external mycelium, together with the formation of rhizomorphs, which serve as long-distance exploration structure. These observations confirm the establishment of a functional ECM association between the symbionts (Ángeles-Argáiz et al., 2024), as both morphological traits (branching pattern, mantle color, and texture) and anatomical characteristics (mantle organization and Hartig net penetration depth) provide diagnostic features for identifying ectomycorrhizal fungi at the genus and, in some cases, species level (Agerer, 2001, 2006). For example, the dichotomous branching pattern that gradually develops into a coraloid morphology is characteristic of the genus *Suillus* (Table 4) and was clearly observed in the ectomycorrhizal association examined in the study.

Each ectomycorrhizal structure plays a key role in the ecophysiology of the symbiosis (Agerer, 2006; Smith & Read, 2008). The fungal mantle serves as a nutrient storage interface and a protective barrier against soil-borne pathogens. The Hartig net is the primary site of bidirectional exchange of carbon, nitrogen, phosphorus, and water, and the extrametrical mycelium extends the absorptive zone of the root system beyond the rhizosphere. In turn, rhizomorphs are differentiated aggregates of hyphae that enable the efficient transport of water and nutrients over distances of several decimeters to meters (Duddridge

Munsell) sin reacción al Melzer fueron producidas por hifas rectangulares y ramificadas de acuerdo con Agerer (1991, 2006). La morfología de las células corticales de la raíz hospedera fue globosa a rectangular, con diámetros de 44 a 80 μm (Figura 3b). La red de Hartig se encontró bien desarrollada, penetró a la segunda y, a veces, hasta la tercera capa de células corticales con presencia de taninos (Figuras 3b y 3d). El ancho de la red de Hartig en los espacios intersticiales se mantuvo relativamente constante con un rango de 4.8–6.1 μm . El micelio extrametrical presentó hifas hialinas, filamentosas, tubulares y septadas (Figura 3c) con diámetro entre 2.5 y 4.0 μm . Los septos fueron simples sin fíbulas. No se observaron estructuras de reproducción sexual ni asexuales (conidios) directamente sobre las raíces micorrizadas en las condiciones de muestreo. Tampoco se observó reacción amiloide al reactivo de Melzer (ausencia de tinción azul). La presencia de compuestos fenólicos (taninos) en las células corticales adyacentes al manto y a la red de Hartig se evidenció por su color marrón (5YR 5/6 en las cartas Munsell), lo que sugiere una posible respuesta de defensa localizada.

Las evidencias morfológicas y anatómicas demuestran inequívocamente la presencia de las tres estructuras diagnósticas de la ECM: el manto fúngico, la red de Hartig y el micelio externo, así como la formación de rizomorfos, estructuras de exploración a larga distancia. Estas observaciones evidencian el establecimiento de una asociación ECM funcional entre simbioses (Ángeles-Argáiz et al., 2024), ya que tanto los caracteres morfológicos (ramificación, color y textura del manto) como los anatómicos (organización del manto y profundidad de la red de Hartig) son diagnósticos a nivel de género e incluso de especie para los hongos ectomicorrícicos (Agerer, 2001, 2006). Por ejemplo, las ramificaciones dicotómicas que con el tiempo se vuelven coraloides son típicas del género *Suillus* (Cuadro 4) y este patrón se observó claramente en la asociación estudiada.

Cada una de las estructuras de las ECM cumplen funciones clave en la ecofisiología de la simbiosis (Agerer, 2006; Smith & Read, 2008). El manto fúngico actúa como interfaz de almacenamiento de nutrientes y como barrera frente a patógenos del suelo; la red de Hartig es el sitio principal de intercambio bidireccional de carbono, nitrógeno, fósforo y agua; y el micelio externo extiende la zona de absorción del sistema radical más allá de la rizosfera. Por otra parte, los rizomorfos son agregados de hifas diferenciadas que permiten el transporte rápido de agua y nutrientes a distancias de varios decímetros o metros (Duddridge et al., 1980). Aunque no son exclusivos de *Suillus* spp. (Endo et al., 2020), su presencia es distintiva de diversas especies de este género asociadas a *Pinus* spp. y otras coníferas (Agerer, 2006). Ejemplos documentados incluyen *S. brevipes* (Peck) Kuntze asociado a *Quercus incana* W. Bartram y *S. luteus* (L.) Roussel asociado a *P. ponderosa* Douglas ex Lawson y *P. elliotii* Engelm. (Barroetaveña et

Table 4. Comparative morphological and anatomical characterization of ectomycorrhizae formed by *Suillus* species with different host plants.
Cuadro 4. Comparación de características morfológicas y anatómicas de ectomicorizas formadas por especies de *Suillus* con varios hospedantes.

Mycobiont / Micobionte	Phytobiont / Fitobionte	Morphotype / Morfotipo				Hyphae / Hifas	Mantle / Manto	Rhizomorphs / Rizomorfos	Hartig net / Red de Hartig	Reference / Referencia
		Branching pattern / Ramificación	Surface appearance / Aspecto de la superficie	Length / Longitud	Thickness / Grosor					
(mm)										
<i>Suillus bovinus</i> (L.) Roussel	<i>Pinus massoniana</i> Lamb.	Dichotomous to coralloid / Dicotómica a coraloide	Yellowish to yellowish-brown, smooth, lacking adhering particles, occasionally constricted at the branch points / Amarillenta a marrón amarillenta, lisa, sin adherencias y a veces presenta constricciones en las ramas	-	-	-	38.64 µm	-	1-2 layers / 1-2 capas	Sun et al. (2019); Feng et al. (2022)
<i>S. cavipes</i> (Klotzsch) A. H. Sm. & Thiers	<i>Larix laricina</i> (Du Roi) K. Koch	Simple to highly pinnate, with rounded tips / Simple o muy pinnada con los extremos redondeados	White and velvety, becoming felty with age; abundant white, cottony mycelium / Blanca aterciopelada que se vuelve fieltada con la edad; micelio abundante, blanco y algodonoso	1-3.5	0.4-0.6	Opaque white hyphae, 1-9 µm in diameter, with clamp connections / Blancas opacas de 1-9 µm con fibulas	Prosenchymatous mantle with loosely parallel to interwoven hyphae, covered by pale gray amorphous material, 29-71 µm thick / Prosenquimatoso con hifas laxamente paralelas a entrelazadas, cubiertas de material amorfo gris pálido, 29-71 µm	Present / Presentes	2-3 layers / 2-3 capas	Samson and Fortin (1988)
<i>S. granulatus</i> (L.) Roussel	<i>P. eliottii</i> Engelm.	Dichotomous with some branches tightly clustered, giving a coralloid appearance / Dicotómica, algunas apretadas y de apariencia coraloide	Opaque white with light brown patches / Blanca opaca con áreas castaño claro	-	-	Hyphae 1-2 µm in diameter, with clamp connections / 1-2 µm con fibulas	Plectenchymatous mantle with loosely arranged hyphae / Plectenquimatoso con hifas laxas	White, abundant, 12-160 µm in diameter (78 µm) / Blancos, abundantes, 12-160 µm (78 µm)	-	Nouhra and Becerra (2001)
<i>S. grevillei</i> (Klotzsch) Singer	<i>L. laricina</i>	Simple and dichotoous with pointed, reddish tips / Simple y dicotómica con extremos puntiagudos y rojos	White with a woolly texture, often covered by a thick layer of mycelium / Blanca con textura lanosa, a menudo oculta por una capa gruesa de micelio	1-4	0.4-0.5	-	Prosenchymatous, 14-65 µm / Prosenquimatoso, 14-65 µm	Translucent, white, 35 µm / Translúcidos, blancos, 35 µm	1-2 layers / 1-2 capas	Samson and Fortin (1988)

Table 4. Comparative morphological and anatomical characterization of ectomycorrhizae formed by *Suillus* species with different host plants. (cont.)
Cuadro 4. Comparación de características morfológicas y anatómicas de ectomicorizas formadas por especies de *Suillus* con varios hospedantes. (cont.)

Mycobiont/ Micobionte	Phytobiont/ Fitobionte	Morphotype/ Morfofoto			Hyphae/ Hifas	Mantle/ Manto	Rhizomorphs/ Rizomorfos	Hartig net/ Red de Hartig	Reference/ Referencia
		Branching pattern/ Ramificación	Surface appearance/ Aspecto de la superficie	Length/ Longitud	Thickness/ Grosor				
<i>S. luteus</i> (L.) Roussel	<i>P. elliotii</i>	Dichotomous to coralloid/ Dicotómica a coraloide	Light Brown when Young, becoming dark brown with age/ Marrón claro cuando son jóvenes y después marrón oscuro	-	-	-	White, dense and floculent/ Blancos, densos y floculentos	-	Pan et al. (2022)
<i>S. luteus</i>	<i>P. ponderosa</i> Douglas ex Lawson	Simple dichotomous or multiply dichotomous with yellowish tips/ Dicotómica simple o múltiples con extremos amarillentos	Light chestnut Brown with slightly pearlescent whitish patches; woolly texture; dull or slightly satin-like surface outside the patches/ Castaño claro con parches blanquecinos ligeramente nacarados, textura lanosa, brillo nulo o ligeramente satinado fuera de los parches	1.6-3.2	1.8-3.2	4 µm	Plectenchymatous, with branched, irregular and interwoven hyphae/ Plectenquimatoso, con hifas ramificadas, irregulares y entrelazadas	-	Barroetaaveña et al. (2012)
<i>S. placidus</i> (Bonord.) Singer	<i>P. ayacahuite</i> Ehrenb. ex Schltld.	Dichotomous to coralloid/ Dicotómica y coraloide	White with abundant external mycelium; cylindrical tips when young, becoming reddish white at maturity / Blanca con micelio externo abundante y ápices cilíndricos cuando joven y blanco rojizo al madurar	0.5-1.0	0.4-0.5	-	Abundant, white, and involved in long-distance exploration / Abundantes, blancos y exploración de larga distancia	3 layers/ 3 capas	Ortiz-López et al. (2025)
<i>S. placidus</i> (Bonord.) Singer	<i>P. cooperi</i> C. E. Blanco	Dichotomous, occasionally monopodial / Dicotómica y en ocasiones monopoidal	Rugose and cottony, dark Brown; straight termini with slightly cylindrical, lighter-colored apices / Rugosa y algodonosa, marrón oscuro, con terminaciones rectas, ligeramente cilíndricas de color más claro en el ápice	0.9-1.7	0.3-0.5	Dense, whitish hyphae, 3.2-5.0 µm in diameter Hifas densas y blanquecinas de 3.2 a 5.0 µm	Abundant, smooth, and well differentiated/ Abundantes, lisos bien diferenciados	2-3 layers/ 2-3 capas	Present study/ En este trabajo

Table 4. Comparative morphological and anatomical characterization of ectomycorrhizae formed by *Suillus* species with different host plants. (cont.)
Cuadro 4. Comparación de características morfológicas y anatómicas de ectomicorizas formadas por especies de *Suillus* con varios hospedantes. (cont.)

Mycobiont/ Micobionte	Phytobiont/ Fitobionte	Morphotype / Morfortipo			Hyphae / Hifas	Mantle / Manto	Rhizomorphs / Rizomorfos	Hartig net / Red de Hartig	Reference / Referencia
		Branching pattern / Ramificación	Surface appearance / Aspecto de la superficie	Length / Longitud	Thickness / Grosor				
<i>S. pseudobrevipes</i> A. H. Sm. & Thiers	<i>P. montezumae</i> Lamb.	Dichotomous or simple, with straight termini and acute cylindrical tips/ Dicotómica o simple con terminaciones rectas y puntas cilíndricas agudas	White, velvety, and cottony, turning brown and then gray with age; abundant mycelium covering the gray morphotype / Blanca, afelpada y algodonosa, luego café y finalmente gris, micelio abundante cubriendo el morfortipo de color gris	-	-	-	Absent / Ausentes	-	Garibay-Orijel et al. (2013)
<i>S. pungens</i> Thiers & A. H. Sm. (1964)	<i>P. montezumae</i>	Dichotomous to coralloid, becoming tuberculate, with straight, white to bluish-gray, translucent tips / Dicotómica a coraloide y finalmente tuberculosa, con extremos rectos blancos o grises azulados y translúcido	White and cottony, becoming brown at the base; abundant gray mycelium / Blanca algodonosa y en la base se vuelve café, con micelio abundante color gris	-	-	-	Thin cream- colored hyphae, with some thicker, gray- colored hyphae / Emanantes ocasionales con cristales / Delgados color crema y otros más gruesos color gris	-	Garibay-Orijel et al. (2013)
<i>S. tomentosus</i> Singer, Snell & E. A. Dick.	<i>P. montezumae</i>	Dichotomous to coralloid / Dicotómica a coraloide	-	0.4-1.6	0.1	Plectenchymatous mantle with interwoven hyphae, 21.49-88.87 µm (48.03 µm) / Plectenquimatoso con hifas entrelazadas, 21.49- 88.87 µm (48.03 µm)	Absent / Ausentes	1.5 layers / 1.5 capas	Galindo-Flores et al. (2015)

et al., 1980). Although rhizomorphs are not exclusive to *Suillus* spp. (Endo et al., 2020), they are a characteristic feature of several species in this genus associated with *Pinus* spp. and other conifers (Agerer, 2006). Documented examples include *S. brevipes* (Peck) Kuntze associated with *Quercus incana* W. Bartram and *S. luteus* (L.) Roussel associated with *P. ponderosa* Douglas ex Lawson and *P. elliottii* Engelm. (Barroetaveña et al., 2012; Pan et al., 2022). However, the presence of rhizomorphs is not universal within the genus *Suillus* or across all associations with pines. For example, rhizomorphs were not observed in *P. montezumae* Lamb. when associated with *S. pseudobrevipes* A. H. Sm. & Thiers (Garibay-Orijel et al., 2013) or *S. tomentosus* Singer, Snell & E. A. Dick. (Galindo-Flores et al., 2015) (Table 4). In the *S. placidus* – *P. cooperi* association, smooth, well-differentiated rhizomorphs were abundantly produced, suggesting that this symbiosis has a high capacity for soil exploration and water transport to the host plant. Indeed, preliminary studies have indicated that this characteristic may be the basis for the drought tolerance observed in *P. cooperi* inoculated with *S. placidus* (Martínez-Nevárez et al., 2025). Rhizomorphs enable long-distance exploration for water resources (Castaño et al., 2023), whereas individual emanating hyphae originating from rhizomorphs or directly from the mantle provide short-distance exploration that is highly effective for acquiring mobile nutrients such as phosphorus (Agerer, 2001, 2006). The presence of both exploration strategies optimizes resource acquisition in heterogeneous soils.

Fungal mantle and Hartig net characterization

The fungal mantle and emanating hyphae exhibit structural patterns that, although they may vary among species, are generally conserved at the genus level, thereby facilitating the taxonomic characterization of the symbionts (Balestrini & Kottke, 2016). Members of the order Boletales, particularly those in the family Suillaceae, typically possess a fungal mantle with a plectenchymatous organization, characterized by interwoven hyphae lacking a defined orientation and with reduced interhyphal spaces. For example, *S. grevillei* (Klotzsch) Singer shows concentric ring formation as an additional structure pattern (Agerer, 2006). The fungal mantle of *S. placidus* associated with *P. cooperi* also exhibits a plectenchymatous organization; however, it lacks a ring-like structure, which is consistent with the description of *S. granulatus* (L.) Roussel associated with *P. elliottii* (Nouhra & Becerra, 2001). In this latter association, a dense, whitish extrametrical mycelium was also reported, similar to that observed in the present study. Likewise, the ECM of *S. cavipes* (Klotzsch) A. H. Sm. & Thiers and *S. grevillei* con *Larix laricina* (Du Roi) K. Koch exhibited dense, whitish extrametrical mycelium, with a Hartig net extending into the outer two-thirds of the root cortex (Samson & Fortin, 1988).

al., 2012; Pan et al., 2022). Sin embargo, la presencia de rizomorfos no es universal en el género *Suillus* ni en todas las asociaciones con pinos. Por ejemplo, en *P. montezumae* Lamb. no se encontraron rizomorfos cuando se asoció con *S. pseudobrevipes* A. H. Sm. & Thiers (Garibay-Orijel et al., 2013), ni con *S. tomentosus* Singer, Snell & E. A. Dick. (Galindo-Flores et al., 2015) (Cuadro 4). En la asociación *S. placidus* – *P. cooperi* se observó formación abundante de rizomorfos lisos y bien diferenciados, lo que sugiere que esta interacción posee alta capacidad de exploración del suelo y de conducción de agua hacia la planta hospedera. De hecho, trabajos preliminares han señalado que esta característica podría ser la base de la tolerancia a la desecación observada en *P. cooperi* inoculado con *S. placidus* (Martínez-Nevárez et al., 2025). Los rizomorfos confieren exploración de largo alcance para recursos hídricos (Castaño et al., 2023), mientras que las hifas emanantes individuales que parten de los rizomorfos o directamente del manto proporcionan exploración de corto alcance, pero muy efectiva para nutrientes móviles como el fósforo (Agerer, 2001, 2006). La presencia de ambos tipos de exploración optimiza la adquisición de recursos en suelos heterogéneos.

Caracterización del manto fúngico y de la red de Hartig

El manto fúngico y las hifas emanantes presentan patrones estructurales que, si bien pueden variar entre especies, suelen conservarse a nivel de género, lo que facilita la caracterización taxonómica de los simbioses (Balestrini & Kottke, 2016). Las familias del orden Boletales, en particular Suillaceae, generalmente presentan un manto con arreglo celular plectenquimatoso; es decir, hifas entrelazadas sin una orientación definida, pero con espacios interhifales reducidos. Por ejemplo, *S. grevillei* (Klotzsch) Singer presenta formación de anillos concéntricos como patrón adicional (Agerer, 2006). El manto de *S. placidus* en asociación con *P. cooperi* no es una excepción en cuanto al arreglo plectenquimatoso, pero no mostró la estructura anillada, lo que coincide con lo descrito para *S. granulatus* (L.) Roussel asociado a *P. elliottii* (Nouhra & Becerra, 2001). En esta última asociación, además, se reportó micelio extrametrical blanquecino y denso, similar al observado en el presente estudio. De manera comparable, las ECM de *S. cavipes* (Klotzsch) A. H. Sm. & Thiers y *S. grevillei* con *Larix laricina* (Du Roi) K. Koch presentaron micelio extrametrical denso y blanquecino, con una red de Hartig que penetraba los dos tercios exteriores de la corteza radicular (Samson & Fortin, 1988). En el presente estudio, la red de Hartig penetró hasta la segunda y, ocasionalmente, la tercera capa de células corticales, lo que indica una interfaz extensa y potencialmente eficiente; este aspecto puede ser variable en otras ECM del género *Suillus* y la profundidad de la red podría estar correlacionada con la eficiencia en la transferencia de carbono y nutrientes. La presencia de

In the present study, the Hartig net extended into the second and, occasionally, the third layer of cortical cells, indicating an extensive and potentially efficient interface. This characteristic may vary among ECM associations within the genus *Suillus* and the depth of Hartig net penetration could be correlated with the efficiency of carbon and nutrient transfer. The presence of tannins in cortical cells adjacent to the Hartig net, as observed in histological sections (Figure 3d), suggest the occurrence of a localized defense response; however, this response does not prevent symbiosis establishment, indicating a precise modulation of host defense signaling pathways by the fungus.

Ecological and biotechnological implications

Beyond its descriptive characterization, this study provides findings with relevant applied implications when considered alongside previous research on the functional effects of *S. placidus* in different host species. Preliminary studies with *P. cooperi* have shown that inoculation with *S. placidus* enhances drought resistance, potentially through improvements in water-use efficiency and increased antioxidant enzyme activity (Martínez-Nevárez et al., 2025). In *P. massoniana*, the same fungal species increased proline content, antioxidant enzyme activity (superoxide dismutase, catalase, and peroxidase), and the photochemical efficiency of photosystem II under water stress, resulting in greater field survival (Li et al., 2021). Furthermore, *S. placidus* has been reported to enhance phosphorus uptake in nursery conditions, a limiting nutrient in many forest soils (Peng et al., 2021). Within the context of bioremediation, *in vitro* studies have shown that *S. placidus* has high cadmium tolerance and the capacity to accumulate this metal in its hyphae, positioning it as a promising candidate for the phytoremediation of heavy metal-contaminated soils in association with pine species (Luo et al., 2023). Moreover, inoculation of *P. cembra* with *S. placidus* has been shown to remain sustainable over decades, even under conditions of climate change and nitrogen fertilization, demonstrating the resilience and long-term compatibility of this symbiotic association (Rainer et al., 2015).

These findings collectively position *S. placidus* as a potentially valuable bioinoculant for the production of *P. cooperi* seedlings in forest nurseries, particularly for ecological restoration and reforestation programs in areas affected by water stress or soil degradation. In this context, the morphological and anatomical characterization of ECM provides diagnostic traits (mantle color, branching pattern, presence or absence of rhizomorphs, and Hartig net penetration depth) that can be evaluated easily and rapidly, and used as quality criteria to verify successful symbiosis establishment prior to field planting. The integration of molecular tools (ITS sequencing) with morpho-anatomical observations remains the most robust approach for

tannins in las células corticales adyacentes a la red de Hartig, observada en los cortes histológicos (Figura 3d), sugiere que existe una respuesta de defensa localizada, aunque no impide el establecimiento de la simbiosis, lo que indica una modulación fina de las vías de señalización defensiva por parte del hongo.

Implicaciones ecológicas y biotecnológicas

Más allá de la caracterización descriptiva, los hallazgos de este trabajo adquieren relevancia aplicada a la luz de estudios previos sobre los efectos funcionales de *S. placidus* en varios hospederos. En trabajos preliminares con *P. cooperi* se demostró que la inoculación con *S. placidus* mejora la resistencia a la sequía, mediada posiblemente por aumento en la eficiencia en el uso del agua y en la actividad de enzimas antioxidantes (Martínez-Nevárez et al., 2025). En *P. massoniana*, la misma especie fúngica incrementó el contenido de prolina, la actividad enzimática antioxidante (superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa) y la eficiencia fotoquímica del fotosistema II bajo estrés hídrico, lo que se tradujo en mayor supervivencia en campo (Li et al., 2021). Además, se ha reportado que *S. placidus* mejora la absorción de fósforo en vivero, un nutriente limitante en muchos suelos forestales (Peng et al., 2021). En un contexto de biorremediación, estudios *in vitro* indican que *S. placidus* posee tolerancia alta al cadmio con capacidad de acumularlo en sus hifas, lo que lo convierte en un candidato prometedor para la fitorremediación de suelos contaminados por metales pesados en asociación con pinos (Luo et al., 2023). Asimismo, la inoculación de *P. cembra* con *S. placidus* ha demostrado ser sostenible durante décadas, incluso bajo condiciones de cambio climático y fertilización nitrogenada, lo que atestigua su resiliencia y compatibilidad a largo plazo (Rainer et al., 2015).

Toda esta evidencia posiciona a *S. placidus* como un bioinoculante potencialmente valioso para la producción de plantas de *P. cooperi* en viveros forestales, especialmente con fines de restauración ecológica y reforestación en zonas sujetas a estrés hídrico o degradación edáfica. En este sentido, la caracterización morfológica y anatómica de la ECM aporta elementos diagnósticos de evaluación fácil y rápida (color del manto, tipo de ramificación, presencia/ausencia de rizomorfos, profundidad de la red de Hartig) que pueden utilizarse como criterios de calidad para verificar el establecimiento exitoso de la simbiosis antes de la plantación en campo. La combinación de herramientas moleculares (secuenciación de ITS) con la observación morfoanatómica sigue siendo el enfoque más robusto para la identificación de simbiontes compatibles, esencial para la selección de cepas fúngicas destinadas a la producción de inoculantes comerciales, particularmente cuando se trabaja con especies nativas de alto valor ecológico (Galindo-Flores et al., 2015;

identifying compatible symbionts, which is essential for selecting fungal strains intended for the production of commercial inoculants, particularly when working with native species of high ecological value (Galindo-Flores et al., 2015; Herrera et al., 2022; Oros-Ortega et al., 2017). Future research should focus on evaluating the functional specificity of the *S. placidus* strain used in this study in relation to other native *Pinus* species from the region, and determining the optimal conditions for inoculum production (substrate, C:N ratio, and temperature) to maximize root colonization and physiological benefits for the host plant.

Conclusions

Molecular analysis and morpho-anatomical characterization of the morphotypes confirmed the ectomycorrhizal association between *P. cooperi* and *S. placidus* under nursery conditions. This finding demonstrates the compatibility between both symbionts. This finding demonstrates the compatibility between both symbionts. The present study provides the first description of the ectomycorrhizal synthesis of *P. cooperi* with *S. placidus* and establishes this fungal species as a potential ectomycorrhizal bioinoculant for the production of *P. cooperi* under nursery conditions.

Acknowledgments

Martínez-Nevárez gratefully recognizes the support provided by SECIHTI-470972 for the postdoctoral fellowship awarded. The Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Durango (COCYTED) is gratefully acknowledged for supporting the Project entitled: “*Diversidad de hongos silvestres macromicetos de bosque templado, potencial alimenticio y su aplicación biotecnológica en la producción de planta forestal*” (Project number 2369). The authors also acknowledge the Colegio de Postgraduados, through Project CONV_ENASAS_2026_29, for the support provided during the development of part of this research.

Conflict of Interest Declaration

The authors declare that they have no economic conflicts of interest or known personal relationships that could have influenced the research presented in this article.

Declaration of Artificial Intelligence (AI) Use

The authors declare that no generative AI or AI-assisted technology was used in the preparation of this manuscript.

Herrera et al., 2022; Oros-Ortega et al., 2017). Futuras líneas de investigación deberían orientarse a evaluar la especificidad funcional de la cepa de *S. placidus* utilizada en este estudio frente a otras especies de *Pinus* nativas de la región, así como a determinar las condiciones óptimas de producción de inóculo (sustrato, relación C:N, temperatura) que maximicen la colonización radical y los beneficios fisiológicos para la planta.

Conclusiones

El análisis molecular y la caracterización morfoanatómica de los morfotipos demuestran la asociación ectomicorrícica entre *P. cooperi* y *S. placidus* en condiciones de vivero. Tal hallazgo confirma la compatibilidad entre ambos simbios. Este estudio describe por vez primera la síntesis ectomicorrícica de *P. cooperi* con *S. placidus* y posiciona a dicha especie fúngica como un bioinoculante ectomicorrícico para la producción de *P. cooperi* en vivero.

Agradecimientos

Martínez-Nevárez agradece a la SECIHTI-470972 por la beca postdoctoral. Se agradece al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Durango (COCYTED) por el apoyo al proyecto “*Diversidad de hongos silvestres macromicetos de bosque templado, potencial alimenticio y su aplicación biotecnológica en la producción de planta forestal*” (folio 2369). Se agradece también al Colegio de Postgraduados, a través del Proyecto CONV_ENASAS_2026_29, por el apoyo recibido para el desarrollo de parte de esta investigación.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaramos que no tenemos conflictos de intereses económicos ni relaciones personales conocidas que pudieran haber influido en el trabajo presentado en este artículo.

Declaración del uso de inteligencia artificial (IA)

Los autores declaramos no haber utilizado IA generativa o tecnologías asistidas por IA para el desarrollo del presente manuscrito.

End of English version

Fin de la versión en español

References / Referencias

- Agerer, R. (1991). Characterization of ectomycorrhiza. In *Methods in microbiology* (vol. 23, pp. 25–73). [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70172-7](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70172-7)
- Agerer, R. (1995). Anatomical characteristics of identified ectomycorrhizas: An attempt towards a natural classification. In A. Varma & B. Hock (Eds.), *Mycorrhiza: Structure, function, molecular biology and biotechnology* (pp. 633–682). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-08897-5_29
- Agerer, R. (2001). Exploration types of ectomycorrhizae: A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza*, 11(2), 107–114. <https://doi.org/10.1007/s005720100108>
- Agerer, R. (2006). Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycological Progress*, 5(2), 67–107. <https://doi.org/10.1007/s11557-006-0505-x>
- Ángeles-Argáiz, R. E., Cruz-Gutiérrez, R., Medel-Ortiz, R., Pérez-Moreno, J., Velázquez-López, O. E., & Mata, G. (2024). Recognizing symbiotic compatibility between *Laccaria trichodermophora* and *Pinus teocote*. *Symbiosis*, 94, 151–164. <https://doi.org/10.1007/s13199-024-01021-2>
- Ángeles-Argáiz, R., & Garibay-Orijel, R. (2019). The evolution of ectomycorrhizal symbiosis from the genomic perspective. *Scientia Fungorum*, 49, 1–16. <https://doi.org/10.33885/sf.2019.49.1247>
- Baeza, Y., Dorantes, J., Mende, R., & Trejo, D. (2021). Ectomycorrhizae morphotypes in a *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. & Cham. stand chronosequence in eastern Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 12(66), 141–164. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v12i66.819>
- Bai, X.-N., Hao, H., Hu, Z.-H., & Leng, P.-S. (2021). Ectomycorrhizal inoculation enhances the salt tolerance of *Quercus mongolica* seedlings. *Plants*, 10(9), 1790. <https://doi.org/10.3390/plants10091790>
- Balestrini, R., & Kottke, I. (2016). Structure and development of ectomycorrhizal roots. In F. Martin (Ed.), *Molecular mycorrhizal symbiosis* (pp. 47–61). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118951446.ch4>
- Barragán-Soriano, J. L., Pérez-Moreno, J., Almaraz-Suárez, J. J., Carcaño-Montiel, M. G., Delgadillo-Martínez, J., Cetina-Alcalá, V. M., & Mata, G. (2022). Coinoculación de *Pinus montezumae* (Pinaceae) con un hongo comestible ectomicorrízico y bacterias promotoras de crecimiento vegetal. *Acta Botánica Mexicana*, 129, e2024. <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.2024>
- Barroetaña, C., Bassani, V. N., & Rajchenberg, M. (2012). Inoculación micorrízica de *Pinus ponderosa* en la Patagonia Argentina: colonización de las raíces, descripción de morfotipos y crecimiento de las plántulas en vivero. *Bosque (Valdivia)*, 33(2), 163–169. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002012000200006>
- Brunner, I., Herzog, C., Dawes, M. A., Arend, M., & Sperisen, C. (2015). How tree roots respond to drought. *Frontiers in Plant Science*, 6, 547. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00547>
- Castaño, C., Suarez-Vidal, E., Zas, R., Bonet, J. A., Oliva, J., & Sampedro, L. (2023). Ectomycorrhizal fungi with hydrophobic mycelia and rhizomorphs dominate in young pine trees surviving experimental drought stress. *Soil Biology and Biochemistry*, 178, 108932. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108932>
- Cheng, K., Liu, Y., Tang, M., & Zhang, H. (2024). *Suillus grevillei* and *Suillus luteus* promote lead tolerance of *Pinus tabulaeformis* and biomineralize lead to pyromorphite. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1296512. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1296512>
- Chot, E., & Reddy, M. S. (2022). Role of ectomycorrhizal symbiosis behind the host plants ameliorated tolerance against heavy metal stress. *Frontiers in Microbiology*, 13, 855473. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.855473>
- DEEMY. (2024). An information system for characterization and determination of ectomycorrhizae. <https://www.deemy.de/>
- Duddridge, J. A., Malibari, A., & Read, D. J. (1980). Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature*, 287(5785), 834–836. <https://doi.org/10.1038/287834a0>
- Endo, N., Yamamoto, T., Sugawara, R., Sotome, K., Maekawa, N., & Nakagiri, A. (2020). Characterization of Japanese *Lactarius* section *deliciosi* ectomycorrhizae: Toward the use of mycorrhizae for taxonomy and expansion of available cultures. *Mycoscience*, 61(6), 293–306. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2020.06.002>
- Estevão, B., Oliveira, A., Bortoluzzi, D., Fiuza, D., Seminoti, R. J., & Inês, Z. (2018). Characterization of ectomycorrhizal species through molecular biology tools and morphotyping. *Scientia Agricola*, 75, 246–254. <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2016-0419>
- Feng, W., Sun, X., & Ding, G. (2022). Morphological and transcriptional characteristics of the symbiotic interaction between *Pinus massoniana* and *Suillus bovinus*. *Journal of Fungi*, 8(11), 1162. <https://doi.org/10.3390/jof8111162>
- Galindo-Flores, G., Castillo-Guevara, C., Campos-López, A., & Lara, C. (2015). Caracterización de las ectomicorrizas formadas por *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tomentosus* en *Pinus montezumae*. *Botanical Sciences*, 93(4), 855–863. <https://doi.org/10.17129/botsci.200>
- García, A. A., & González, M. S. (2003). *Pináceas de Durango* (2.ª ed.). Instituto de Ecología, A. C.
- Garibay-Orijel, R., Morales-Marañón, E., Domínguez-Gutiérrez, M., & Flores-García, A. (2013). Caracterización morfológica y genética de las ectomicorrizas formadas entre *Pinus montezumae* y los hongos presentes en los bancos de esporas en la Faja Volcánica Transmexicana. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84(1), 153–169. <https://doi.org/10.7550/rmb.29839>
- Gomes, F., Suárez, D., Santos, R., Silva, M., Gaspar, D., & Machado, H. (2016). Mycorrhizal synthesis between *Lactarius deliciosus* and *Arbutus unedo* L. *Mycorrhiza*, 26, 177–188. <https://doi.org/10.1007/s00572-015-0656-1>
- González-Orozco, M. M., Prieto-Ruiz, J. Á., Aldrete, A., Hernández-Díaz, J. C., Chávez-Simental, J. A., & Rodríguez-Laguna, R. (2018). Sustratos a base de aserrín crudo con fertilización y la calidad de planta de *Pinus cooperi* Blanco en vivero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 9(48), 203–225. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v8i48.125>
- Graciano-Luna, J. de J., Alanís-Rodríguez, E., Aguirre-Calderón, O. A., Cantú-Ayala, C. M., Yerena-Yamallel, J. I., Luján-Soto, J. E., Martínez-Adriano, C. A., & Graciano-Ávila, G. (2025).

- Composición y estructura de un bosque bajo manejo forestal en el estado de Durango, México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 12(5), e4549. <https://doi.org/10.19136/era.a12nV.4549>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98. https://www.academia.edu/2034992/BioEdit_a_user_friendly_biological_sequence_alignment_editor_and_analysis_program_for_Windows_95_98_NT
- Herrera, M., Yu, F. Q., Ramos-Rendón, D., Martínez-Reyes, M., Hernández-Santiago, F., Chater, C. C., & Perez-Moreno, J. (2022). Morphoanatomical and phylogenetic characterization of the ectomycorrhiza between *Laccaria squarrosa* with *Pinus pseudostrobus* and its relevance for reforestation programs. *Botanical Sciences*, 100(2), 397–411. <https://doi.org/10.17129/botsci.2830>
- Hui, N., Liu, X., Jumpponen, A., Setälä, H., Kotze, D. J., Biktasheva, L., & Romantschuk, M. (2018). Over twenty years farmland reforestation decreases fungal diversity of soils, but stimulates the return of ectomycorrhizal fungal communities. *Plant and Soil*, 427, 231–244. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3647-0>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2025). *Climatología*. <https://www.inegi.org.mx/temas/climatologia/>
- Janowski, D., & Leski, T. (2023). Methods for identifying and measuring the diversity of ectomycorrhizal fungi. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 96(5), 639–652. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpad017>
- Keller, G. (1992). Isozymes in isolates of *Suillus* species from *Pinus cembra* L. *New Phytologist*, 120(3), 351–358. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb01075.x>
- Kumar, J., & Atri, N. S. (2018). Studies on ectomycorrhiza: an appraisal. *The Botanical Review*, 84, 108–155. <https://doi.org/10.1007/s12229-017-9196-z>
- Li, M., Wang, H., Zhao, X., Lu, Z., Sun, X., & Ding, G. (2021). Role of *Suillus placidus* in improving the drought tolerance of Masson Pine (*Pinus massoniana* Lamb.) seedlings. *Forests*, 12(3), 332. <https://doi.org/10.3390/f12030332>
- Liao, H. L., Chen, Y., & Vilgalys, R. (2016). Metatranscriptomic study of common and host-specific patterns of gene expression between pines and their symbiotic ectomycorrhizal fungi in the genus *Suillus*. *PLoS Genetics*, 12(10), e1006348. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006348>
- Lofgren, L., Nguyen, N. H., Kennedy, P. G., Pérez-Pazos, E., Fletcher, J., Liao, H. L., Wang, H., Zhang, K., Ruytinx, J., Smith, A. H., Ke, Y-H, Cotter, H. V. T., Engwall, E., Hameed, K. M., Vilgalys, R., & Branco, S. (2024). *Suillus*: an emerging model for the study of ectomycorrhizal ecology and evolution. *New Phytologist*, 242(4), 1448–1475. <https://doi.org/10.1111/nph.19700>
- Luo, X., Zhang, C., & Wang, Y. (2023). Different responses of two ectomycorrhizal fungi to Cd treatment. *Polish Journal of Environmental Studies*, 32(6), 5732–5731. <https://doi.org/10.15244/pjoes/169396>
- Marozzi, G., Benucci, G. M. N., Baciarelli Falini, L., Albertini, E., & Donnini, D. (2018). Synthesis of *Tuber mesentericum* ectomycorrhizae with *Quercus pubescens*: a morphological review and DNA characterization. *Sydowia*, 70, 81–88. <https://doi.org/10.12905/0380.sydowia70-2018-0081>
- Martínez-González, C. R., Ramírez-Mendoza, R., Jiménez-Ramírez, J., Gallegos-Vázquez, C., & Luna-Vega, I. (2017). Improved method for genomic DNA extraction for *Opuntia* Mill. (Cactaceae). *Plant Methods*, 13, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0234-y>
- Martínez-Nevárez, L. E., Prieto-Ruiz, J. Á., Sigala-Rodríguez, J. Á., García-Rodríguez, J. L., Martínez-Reyes, M., Carrillo-Parra, A., & Domínguez-Calleros, P. A. (2023). Crecimiento y eficiencia en el uso de nutrientes de plantas de *Pinus cooperi* CE Blanco producidas en vivero con un fertilizante de liberación controlada. *Terra Latinoamericana*, 41, 1–12. <https://doi.org/10.28940/terra.v41i0.1707>
- Martínez-Nevárez, L. E., Sigala, J. A., Prieto-Ruiz, J. Á., García-Rodríguez, J. L., Uscola, M., Martínez-Reyes, M., Carrillo-Parra, A., & Domínguez-Calleros, P. A. (2025). Improving ectomycorrhizal colonization and morpho-physiological traits of *Pinus cooperi* seedlings through organic nitrogen fertilization. *Mycorrhiza*, 35(28). <https://doi.org/10.1007/s00572-025-01206-7>
- Murata, M., Kanetani, S., & Nara, K. (2017). Ectomycorrhizal fungal communities in endangered *Pinus amamiana* forests. *PLoS ONE*, 12(12), e0189957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189957>
- Nouhra, E. R., & Becerra, A. G. (2001). Síntesis micorrícica de *Suillus granulatus* (Eumycota) y plantines de *Pinus elliotii* (Pinaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 36(4), 209–215. <http://hdl.handle.net/11336/39184>
- Oros-Ortega, I., Andrade-Torres, A., Lara-Pérez, L. A., Guzmán-Olmos, R. F., Casanova-Lugo, F., Sáenz-Carbonell, L. A., & Córdova-Lara, I. (2017). Ectomycorrhizal ecology, biotechnology and taxonomy for the conservation and use of *Abies religiosa* in temperate areas of Mexico. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 23(3), 411–426. <https://doi.org/10.5154/r.chscfa.2016.11.060>
- Ortiz-López, I., Pérez-Moreno, J., Martínez-Reyes, M., Almaraz-Suárez, J. J., Ayala-Vásquez, O., & Carballo-Sánchez, M. P. (2025). Crecimiento y fisiología en plantas de *Pinus ayacahuite* (Pinaceae) inoculado con *Suillus placidus* (Suillaceae) y una bacteria promotora del crecimiento vegetal. *Acta Botanica Mexicana*, 132, e2473. <https://doi.org/10.21829/abm132.2025.2473>
- Palamarchuk, M. A., Kirillov, D. V., & Shadrin, D. M. (2021). Morphology and molecular data of the species of *Suillus* (Suillaceae, Boletales) associated with *Pinus sibirica* at the European northeast of Russia. *Phytotaxa*, 490(1), 18–34. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.490.1.2>
- Pan, X., Zhang, J., Xue, Z., Liang, J., Chen, Y., & Liu, Y. (2022). Synergistic effect of phytohormone-producing ectomycorrhizal fungus *Suillus luteus* and fertilizer GGR6 on *Pinus massoniana* growth. *Journal of Plant Interactions*, 17(1), 643–655. <https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2081369>
- Peng, L., Li, Y., Huang, J., & Yuan, L. (2021). Soil phosphorus mobilization and utilization by *Suillus* isolates and *Suillus*-mycorrhized pine plants. *Forest Ecology and Management*, 483, 118772. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118772>
- Pérez-Moreno, J., Martínez-Reyes, M., Hernández-Santiago, F., & Ortiz-Lopez, I. (2020). Climate change, biotechnology, and Mexican Neotropical edible ectomycorrhizal mushrooms. In Pérez-Moreno, J., Guerin-Laguette, A., Flores Arzú, R., & Yu, F.-Q.

- (Eds.), *Mushrooms, humans and nature in a changing world* (pp. 61–99). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-37378-8_3
- Pérez-Moreno, J., & Read, D. J. (2004). Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivos que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*, 29(5), 239–247. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442004000500004&lng=es&tng=es
- Pietras, M., Litkowiec, M., & Gołębiewska, J. (2018). Current and potential distribution of the ectomycorrhizal fungus *Suillus lakei* ((Murrill) A.H. Sm. & Thiers) in its invasion range. *Mycorrhiza*, 28, 467–475. <https://doi.org/10.1007/s00572-018-0836-x>
- Policelli, N., Bruns, T. D., Vilgalys, R., & Nuñez, M. A. (2019). Suilloid fungi as global drivers of pine invasions. *New Phytologist*, 222(2), 714–725. <https://doi.org/10.1111/nph.15660>
- Prieto Ruíz, J. A., García Rodríguez, J. L., Mejía Bójquez, J. M., Huchín Alarcón, S., & Aguilar Vitela, J. L. (2009). *Producción de planta del género Pinus en vivero en clima templado frío*. Campo Experimental Valle del Guadiana INIFAP-SAGARPA. Durango, Dgo. México. <https://es.scribd.com/document/374541047/Produccion-de-Planta-Del-Genero-Pinus-en-Vivero-en-Clima-Templado-Frio>
- Prieto-Ruiz, J. Á., Duarte-Santos, A., Goche-Télles, J. R., González-Orozco, M. M., & Pulgarín-Gámiz, M. Á. (2018). Supervivencia y crecimiento de dos especies forestales, con base en la morfología inicial al plantarse. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 9(47), 151–168. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v9i47.182>
- R Core Team. (2025). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Rainer, G., Kuhnert, R., Unterholzer, M., Dresch, P., Gruber, A., & Peintner, U. (2015). Host-specialist dominated ectomycorrhizal communities of *Pinus cembra* are not affected by temperature manipulation. *Journal of Fungi*, 1(1), 55–75. <https://doi.org/10.3390/jof1010055>
- Ramírez-Mendoza, R., Martínez-Reyes, M., Wang, Y., Zhou, Y., Galvis-Spinola, A., Almaraz-Suárez, J. J., Yu, F., & Pérez-Moreno, J. (2026). Molecular crosstalk underlying pre-colonization signaling and recognition in ectomycorrhizal symbiosis. *Forests*, 17(1), 134. <https://doi.org/10.3390/f17010134>
- Rodríguez-Gómez-Tagle, G., Vargas Hernández, J. J., López Upton, J., & Pérez Moreno, J. (2024). Diversidad de morfotipos de hongos ectomicorrizógenos y adaptación al hospedero en poblaciones contrastantes de *Pinus greggii* var. *australis* (Pinaceae). *Acta Botánica Mexicana*, (131), e2151. <https://doi.org/10.21829/abm131.2024.2151>
- Rodríguez-Gutiérrez, I., Garibay-Orijel, R., Santiago-Morales, B., & Lindig-Cisneros, R. (2020). Comparison between *Laccaria* basidiomata and ectomycorrhizae abundances in Ixtlan de Juárez, Oaxaca. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 91, e913340. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2020.91.3340>
- Samson, J., & Fortin, J. A. (1988). Structural characterization of *Fuscoboletinus* and *Suillus* ectomycorrhizae synthesized on *Larix laricina*. *Mycologia*, 80(3), 382–392. <https://doi.org/10.1080/000275514.1988.12025553>
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis* (3rd ed.). Academic Press. <https://www.sciencedirect.com/book/9780123705266/mycorrhizal-symbiosis>
- Song, Y.-P., Anderson, D., & Wu, Y.-T. (2025). Ectomycorrhizal fungi significantly shape endorhizal bacteria associated with *Pinus taiwanensis* in heavy metal soils. *Ecosphere*, 16, e70488. <https://doi.org/10.1002/ecs2.70488>
- Soto-Gil, A. L., Velázquez-Martínez, A., Pérez-Moreno, J., Fierros-González, A. M., & Martínez-Reyes, M. (2022). Ectomycorrhizal morphotypes in structural variable retention of *Pinus patula* Schltdl et Cham. *Madera y Bosques*, 28(2), 1–15. <https://doi.org/10.21829/myb.2022.2822388>
- Sun, X., Feng, W., Li, M., Shi, J., & Ding, G. (2019). Phenology and cultivation of *Suillus bovinus*, an edible mycorrhizal fungus, in a *Pinus massoniana* plantation. *Canadian Journal of Forest Research*, 48(8), 960–968. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2018-0405>
- Wang, J., Zhang, H., Gao, J., Zhang, Y., Liu, Y., & Tang, M. (2021a). Effects of ectomycorrhizal fungi (*Suillus variegatus*) on the growth, hydraulic function, and non-structural carbohydrates of *Pinus tabulaeformis* under drought stress. *BMC Plant Biology*, 21, 171. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02945-3>
- Wang, R., Wang, Y., Guerin-Laguette, A., Zhang, P., Colinas, C., & Yu, F. (2022). Factors influencing successful establishment of exotic *Pinus radiata* seedlings with co-introduced *Lactarius deliciosus* or local ectomycorrhizal fungal communities. *Frontiers in Microbiology*, 13, 973483. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.973483>
- Wang, R., Yu, F. Q., Pérez-Moreno, J., & Colinas, C. (2021b). A new edible *Rhizopogon* species from Southwest China, and its mycorrhizal synthesis with two native pines. *Mycorrhiza*, 31(1), 85–92. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00996-2>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. White (Eds.), *PCR Protocols: a guide to methods and applications* (pp. 315–322). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Yuan, J., Wang, Y., Zhang, X., Yan, Z., Wang, R., Yang, C., He, X., Pérez-Moreno, J., Yu, F., & Zheng, Y. (2026). Compartment-specific assembly and functional characterization of the bacterial microbiome in a *Pinus radiata*–*Lactarius deliciosus* plantation system. *Applied Soil Ecology*, 221, 106943. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2026.106943>
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7, 203–214. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>