

Chelated zinc and beneficial microorganisms: a sustainable fertilization option for pecan production

Zinc quelado y microorganismos benéficos: una opción de fertilización sostenible en la producción de nueces

Socorro H. Tarango-Rivero¹; Graciela D. Ávila-Quezada²; Juan L. Jacobo-Cuellar²; Claudia A. Ramírez-Valdespino³; Erasmo Orrantia-Borunda³; Raúl Rodríguez-Heredia⁴; Ana Luisa Olivas-Tarango^{2*}

¹Comité de la Nuez del Estado de Chihuahua. Trasviña y Retes, núm. 3505, San Felipe II Etapa, Chihuahua, Chihuahua, C. P. 31203, MÉXICO.

²Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas. Escorza, núm. 900, col. Centro, Chihuahua, Chihuahua, C. P. 31000, MÉXICO.

³Centro de Investigación en Materiales Avanzados. Av. Miguel de Cervantes Saavedra, núm. 120, Complejo Industrial Chihuahua, Chihuahua, Chihuahua, C. P. 31136, MÉXICO.

⁴Innovak Global. Blvd. Vicente Lombardo Toledano, núm. 6615, col. La Concordia, Chihuahua, Chihuahua, C. P. 31375, MÉXICO.

*Corresponding author: analuisa_olivas@hotmail.com, tel. 614 125 25 99.

Abstract

Zinc (Zn) fertilization of pecan trees is carried out by foliar spraying, since the nutrient in the soil is bound to carbonates, which hinders its absorption by the tree. This practice has environmental repercussions because it is an aerosol. Therefore, the objective of this study was to generate an alternative to foliar Zn application with soil-applied chelated Zn combined with beneficial microorganisms to maintain or improve pecan production. Fifteen homogeneous trees were selected based on trunk cross-sectional area and crown volume in a pecan orchard in Chihuahua, Mexico. During four years (2015-2018), three treatments with five replications were evaluated under a completely randomized design. The treatments were: 1) foliar Zn (36 % ZnSO₄), 2) soil Zn (14 % Zn chelated with carboxylic acids) and 3) soil Zn + mycorrhizal fungi (*Pisolithus tinctorius* + *Azospirillum brasilense*). The orchard studied had native communities of *P. tinctorius*, which was found in 83.7 % of the roots analyzed. Pecan production, in the four years, with the different treatments was 27 kg with foliar Zn, 25.4 kg with chelated Zn and 26.9 kg with chelated Zn plus microorganisms. The results indicate that soil-applied Zn is a viable and environmentally friendly option.

Keywords: *Carya illinoensis*, *Pisolithus tinctorius*, mycorrhizal fungi, soil zinc.

Resumen

La fertilización del nogal con zinc (Zn) se realiza por aspersión foliar, dado que el nutriente en el suelo se encuentra ligado a los carbonatos, lo que dificulta su absorción por el árbol. Dicha práctica tiene repercusiones ambientales por tratarse de un aerosol. Por ello, el objetivo de este estudio fue generar una alternativa de la aplicación de Zn foliar con Zn quelado edáfico combinado con microorganismos benéficos, para mantener o mejorar la producción de nueces. Se seleccionaron 15 árboles homogéneos con base en el área de sección transversal del tronco y el volumen de la copa en una huerta de nogales en Chihuahua, México. Durante cuatro años (2015-2018), se evaluaron tres tratamientos con cinco repeticiones bajo un diseño completamente aleatorizado. Los tratamientos fueron: 1) Zn foliar (36 % de ZnSO₄), 2) Zn edáfico (14 % de Zn quelado con ácidos carboxílicos) y 3) Zn edáfico + hongos micorrízicos (*Pisolithus tinctorius* + *Azospirillum brasilense*). La huerta estudiada tenía comunidades nativas de *P. tinctorius*, el cual se encontró en 83.7 % de las raíces analizadas. La producción de nuez, en los cuatro años, con los diferentes tratamientos fue de 27 kg con Zn foliar, 25.4 kg con Zn quelado y 26.9 kg con Zn quelado más microorganismos. Los resultados indican que la aplicación de Zn al suelo es viable y amigable con el ambiente.

Palabras clave: *Carya illinoensis*, *Pisolithus tinctorius*, hongos micorrízicos, zinc edáfico.



Introduction

The United Nations Convention on Climate Change, the Paris Agreement and Sustainable Development Goals 9, 11 and 12 of the 2030 Agenda frame the need to reduce emissions of air pollutants as part of anthropogenic activities (Organización de las Naciones Unidas [ONU], 1992; ONU, 2015). To achieve this, all sectors must use new technologies to ensure food production and quality.

In pecan production, zinc (Zn) is an essential micronutrient involved in many physiological processes of plants (Tsonev & Cebola Lidon, 2012). Most pecan orchards in northern Mexico and the southern United States are planted on calcareous soils, where the trees are prone to Zn deficiency (Walworth, White, Comeau, & Heerema, 2017). In alkaline pH soils, Zn binds to the carbonate ion and forms insoluble Zn (Imran, Arshad, Khalid, Kanwal, & Crowley, 2014).

Zn applications to the soil in the form of inorganic salts are not effective, since many factors influence low availability (Montalvo, Degryse, da Silva, Baird, & McLaughlin, 2016). For this reason, Zn fertilization in pecan orchards is carried out by foliar spraying; however, among the disadvantages of this management practice are the high cost of inputs and equipment, and environmental pollution (Herrera-Aguirre, 2008). Although it is the current conventional practice, it is known that Zn uptake by the tree leaf is very low, as is its mobility (Walworth et al., 2017). This suggests that the difficulty of pecan trees in absorbing Zn is a problem of chemical unavailability of the nutrient in the soil, in addition to the inefficiency of the roots to absorb the element.

In pecan trees, Zn uptake is closely related to the percentage of ectomycorrhization (Tarango-Rivero, Nevárez-Moorillón, & Orrantia-Borunda, 2009; Olivas-Tarango, Tarango-Rivero, & Ávila-Quezada, 2021). Zn is acquired and transported as Zn^{2+} (divalent). Zn ions can also bind with root exudates that help it move into the root area, and when it enters the free space of the root cell wall it is transported (Ajeesh-Krishna, Maharajan, Roch, Savarimuthu, & Stanislaus, 2020). It is then moved within the tree by specific proteins that regulate intercellular and intracellular transport. There are several genes that encode for Zn transporter proteins or regulate their expression (Gupta, Ram, & Kumar, 2016).

The level of ectomycorrhizal colonization and the microorganisms associated with the rhizosphere are of vital importance for crop nutrition (Madrid-Delgado et al., 2021). Some bacteria and mycorrhizal fungi are very important for the solubilization of minerals such as $Zn(CO_3)_2$, and for their transformation into molecules

Introducción

La Convención de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático, el Acuerdo de París y los Objetivos de Desarrollo Sostenible 9, 11 y 12 de la Agenda 2030, enmarcan la necesidad de reducir las emisiones de contaminantes atmosféricos como parte de las actividades antropogénicas (Organización de las Naciones Unidas [ONU], 1992; ONU, 2015). Para lograrlo, todos los sectores deben utilizar nuevas tecnologías que garanticen la producción y calidad de los alimentos.

En la producción de nuez, el zinc (Zn) es un micronutriente esencial, involucrado en muchos procesos fisiológicos de las plantas (Tsonev & Cebola Lidon, 2012). La mayoría de las huertas nogaleras en el norte de México y el sur de Estados Unidos están plantadas en suelos calcáreos, donde los árboles son propensos a la deficiencia de Zn (Walworth, White, Comeau, & Heerema, 2017). En suelos de pH alcalino, el Zn se une al ion carbonato y forma $Zn(CO_3)_2$ insoluble (Imran, Arshad, Khalid, Kanwal, & Crowley, 2014).

Las aplicaciones de Zn al suelo en forma de sales inorgánicas no son efectivas, pues influyen muchos factores en la baja disponibilidad (Montalvo, Degryse, da Silva, Baird, & McLaughlin, 2016). Por ello, la fertilización con Zn en las huertas nogaleras se realiza por aspersiones foliares; sin embargo, entre las desventajas de este manejo se encuentran el alto costo de los insumos y equipos, y la contaminación ambiental (Herrera-Aguirre, 2008). Aunque es la práctica convencional actual, se sabe que la absorción de Zn por la hoja del árbol es muy baja, al igual que su movilidad (Walworth et al., 2017). Esto sugiere que la dificultad del nogal para absorber Zn es un problema de indisponibilidad química del nutriente en el suelo, además de la ineficiencia de las raíces para absorber el elemento.

En nogales, la absorción de Zn está estrechamente relacionada con el porcentaje de ectomicorrización (Tarango-Rivero, Nevárez-Moorillón, & Orrantia-Borunda, 2009; Olivas-Tarango, Tarango-Rivero, & Ávila-Quezada, 2021). El Zn se adquiere y se transporta como Zn^{2+} (divalente). Los iones de Zn también pueden unirse con exudados de la raíz que lo ayudan a moverse hacia el área de la raíz, y cuando ingresa al espacio libre de la pared celular de la raíz se transporta (Ajeesh-Krishna, Maharajan, Roch, Savarimuthu, & Stanislaus, 2020). Luego, éste se mueve dentro del árbol mediante proteínas específicas que regulan el transporte intercelular e intracelular. Existen varios genes que codifican para proteínas transportadoras de Zn o regulan su expresión (Gupta, Ram, & Kumar, 2016).

El nivel de colonización ectomicorrízica y los microorganismos asociados con la rizosfera son de

that can be taken up by the feeder roots (Barea, Pozo, Azcon, & Azcon-Aguilar, 2005; Krishnakumar, Balakrishnan, Muthukrishnan, & Kumar, 2013; Kamran et al., 2017). This explains why pecan tree root ectomycorrhization significantly favors Zn absorption and plant growth, even in calcareous soils (Tarango-Rivero, Macías-López, Alarcón, & Pérez-Moreno, 2004).

Pecan trees established in the state of Chihuahua, in the municipalities of Delicias and Rosales, are characterized by having a high number of feeder roots in the first 35 cm of soil. In this stratum there is a high mycorrhizal colonization in the fine roots, abundant hyphae up to a depth of 1 m and macroforms on the surface. A characteristic of these orchards is their low soil fertility and sandy loam texture (Muñoz-Márquez et al., 2009). Considering the above, the objective of this study was to generate an alternative for the application of foliar Zn with soil-applied chelated Zn combined with beneficial microorganisms, to maintain or improve pecan production (Muñoz-Márquez et al., 2009).

Materials and methods

Study site

The study was conducted from 2015 to 2018 in Delicias, Chihuahua, Mexico, in the Santa Maria orchard (28° 22' 88" north latitude and 105° 37' 67" west longitude). To do this, 15 'Western' variety trees, from 16 to 19 years old, grafted onto native pecan rootstock (grown from seed) were selected. The orchard was planted at 13 x 13 m, and each tree had a 350 LPH micro-sprinkler (LWP 2450, NETAFIM™, Mexico) for irrigation. Soil characteristics were: sandy loam texture, pH of 7.9, very low organic matter content (0.58 %), 6.0 % CaCO₃ and low salinity (EC of 0.84 dS·m⁻¹).

Treatments

The 15 pecan trees selected were homogeneous in terms of trunk cross-sectional area (on average 18 cm) and crown volume (abundant and homogeneous in its four quadrants). Three treatments were established to compare pecan production. The first was conventional foliar Zn fertilization, the second was fertilization with soil-applied chelated Zn, and the third was Zn chelated to the soil plus the addition of *Azospirillum brasilense* to stimulate Zn solubilization and the mycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* (Table 1). The chelated form was chosen because it favors Zn uptake by the roots and translocation by the conducting tissues in the tree (Sharma, Patni, Shankhdhar, & Shankhdhar, 2013). Treatments were applied to the same trees for all four years. Each tree represented one replicate under a completely randomized design.

vital importancia para la nutrición de los cultivos (Madrid-Delgado et al., 2021). Algunas bacterias y los hongos micorrízicos son muy importantes para la solubilización de minerales como el Zn(CO₃)₂, y para su transformación en moléculas que puedan ser absorbidas por las raíces alimentadoras (Barea, Pozo, Azcon, & Azcon-Aguilar, 2005; Krishnakumar, Balakrishnan, Muthukrishnan, & Kumar, 2013; Kamran et al., 2017). Esto explica que la ectomicorrización de la raíz del nogal favorece significativamente la absorción de Zn y el crecimiento vegetal, incluso en suelos calcáreos (Tarango-Rivero, Macías-López, Alarcón, & Pérez-Moreno, 2004).

Los nogales establecidos en el estado de Chihuahua, en los municipios de Delicias y Rosales, se caracterizan por tener una alta cantidad de raíces alimentadoras en los primeros 35 cm del suelo. En este estrato se presenta una alta colonización micorrízica en las raíces finas, abundantes hifas hasta una profundidad de 1 m y macroformas en la superficie. Una característica de estas huertas es su baja fertilidad y su textura franco-arenosa (Muñoz-Márquez et al., 2009). Considerando lo anterior, el objetivo de este estudio fue generar una alternativa de la aplicación de Zn foliar con Zn quelado edáfico combinado con microorganismos benéficos, para mantener o mejorar la producción de nueces (Muñoz-Márquez et al., 2009).

Materiales y métodos

Sitio de estudio

El estudio se realizó de 2015 a 2018 en Delicias, Chihuahua, México, en la huerta Santa María (28° 22' 88" latitud norte y 105° 37' 67" longitud oeste). Para ello, se seleccionaron 15 árboles de la variedad 'Western' de 16 a 19 años, injertados sobre portainjertos de nogal nativo (cultivados a partir de semillas). La huerta estaba plantada a 13 x 13 m, y cada árbol tenía un microaspersor (LWP 2450, NETAFIM™, México) de 350 LPH para riego. Las características del suelo eran: textura franco arenoso, pH de 7.9, contenido de materia orgánica muy bajo (0.58 %), 6.0 % de CaCO₃ y baja salinidad (CE de 0.84 dS·m⁻¹).

Tratamientos

Los 15 árboles de nogal seleccionados eran homogéneos en cuanto al área de la sección transversal del tronco (en promedio de 18 cm) y el volumen de la copa (abundante y homogéneo en sus cuatro cuadrantes). Se establecieron tres tratamientos para comparar la producción de nueces. El primero fue la fertilización convencional de Zn foliar, el segundo fue fertilización con Zn edáfico quelado, y el tercero fue Zn quelado al suelo más la adición de *Azospirillum brasilense*,

The initial Zn concentration in the soil was determined by atomic absorption spectrophotometry (Analyst 100, Perkin Elmer®, Mexico) in two samples from the irrigation area, in the 0-30 cm and 30-60 cm strata. Leaf Zn concentration was analyzed in dehydrated tissue by triacid digestion (HNO_3 , HClO_4 and H_2SO_4 , at a 10:1:0.25 ratio) by means of atomic absorption spectrophotometry using the DTPA method (González, Almendros, & Álvarez, 2009).

Despite finding an adequate concentration of Zn, it was decided to apply chelated Zn twice per growing season, since this Zn is not necessarily available to the tree. This is because the chelated form allows the element to remain available in the soil and water under extreme conditions, such as high pH (> 7.5) and high carbonate concentration (> 6 %).

Vegetative and productive variables

Shoot length was evaluated in June of each year, on one tree shoot per quadrant at a height of 2 m, which was marked in order to always evaluate the same one.

para estimular la solubilización del Zn, y el hongo micorrízico *Pisolithus tinctorius* (Cuadro 1). La forma quelatada se eligió por favorecer la absorción del Zn por las raíces y la translocación por los tejidos de conducción en el árbol (Sharma, Patni, Shankhdhar, & Shankhdhar, 2013). Los tratamientos se aplicaron a los mismos árboles durante los cuatro años. Cada árbol representó una repetición bajo un diseño completamente al azar.

La concentración inicial de Zn en suelo se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica (Analyst 100, Perkin Elmer®, México) en dos muestras del área de riego, en el estrato de 0-30 cm y de 30-60 cm. La concentración foliar de Zn se analizó en tejido deshidratado mediante digestión triácida (HNO_3 , HClO_4 y H_2SO_4 , en relación 10:1:0.25) en espectrofotometría de absorción atómica por el método DTPA (González, Almendros, & Álvarez, 2009).

A pesar de encontrar una concentración adecuada de Zn, se decidió aplicar Zn quelado dos veces por temporada, ya que este Zn no necesariamente está

Table 1. Zinc application on 'Western' pecan trees (*Carya illinoensis*) for four years.

Cuadro 1. Aplicación de zinc en nogal pecanero (*Carya illinoensis*) 'Western' durante cuatro años.

Treatment/ Tratamiento	Soil fertilization rate (g of NPK per cm of trunk diameter)/ Dosis de fertilización al suelo (g de NPK por cm de diámetro de tronco)	CZn dose/ Dosis de Zn	Zn application method/ Método de aplicación de Zn
Foliar Zn/ Zn foliar	45-05-10	250 g of 36 % ZnSO_4 + 250 g of urea + 15 mL of HNO_3 in 100 L of water/ 250 g al 36 % de ZnSO_4 + 250 g de urea + 15 mL de HNO_3 en 100 L de agua	Six foliar sprayings/ Seis aspersiones foliares
Soil-applied chelated zinc/ Zinc quelado edáfico	45-05-10	On April 1 and May 1, 140 g·tree ⁻¹ of Carboxy-Zn (14 % zinc chelated with carboxylic acids) were applied/ 1 de abril y 1 de mayo se aplicaron 140 g·árbol ⁻¹ de Carboxy-Zn (14 % de zinc quelado con ácidos carboxílicos)	Carboxy-Zn was dissolved in 20 L of water and applied to the drip zone prior to irrigation/ El Carboxy-Zn se disolvió en 20 L de agua y se aplicó en la zona de goteo previo al riego
Soil-applied chelated zinc + MF/ Zinc quelado edáfico + HM	45-05-10	On April 1 and May 1, 140 g·tree ⁻¹ of Carboxy-Zn and 45 g·tree ⁻¹ of 1.0E+06 spores·g ⁻¹ of <i>Pisolithus tinctorius</i> + 1.0E+06 CFU·g ⁻¹ of <i>Azospirillum brasilense</i> were applied/ 1 de abril y 1 de mayo se aplicaron 140 g·árbol ⁻¹ de Carboxy-Zn y 45 g·árbol ⁻¹ de 1.0E+06 esporas·g ⁻¹ de <i>Pisolithus tinctorius</i> + 1.0E+06 UFC·g ⁻¹ de <i>Azospirillum brasilense</i>	Carboxy-Zn + MF was dissolved in 20 L of water and applied to the drip zone prior to irrigation/ El Carboxy-Zn + HM se disolvió en 20 L de agua y se aplicó en la zona de goteo previo al riego

NPK = nitrogen, phosphorus, potassium; MF = mycorrhizal fungus.

NPK = nitrógeno, fósforo, potasio; HM = hongo micorrízico.

Yield (kg of pecans per tree) was determined in October of each year. Foliar Zn analysis ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) was carried out on 10 leaflets per tree the first week of August. Leaflets were taken from the external and internal part of the tree, trying to cover the four cardinal points of the canopy, washed with 10 % acetic acid solution in distilled water and subjected to wet digestion with an acid mixture ($\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$). The measurement was made by atomic absorption spectrometry using the DTPA method (González et al., 2009).

During the years of study, the orchard soil was maintained with a cover of weedy plants with growth controlled by periodic mowing to stimulate the establishment of mycorrhizae and microbial diversity in the soil (Madrid-Delgado et al., 2021). According to Dakora and Phillips (2002), the vegetative cover of native weedy plants with limited height causes an increase in the amount of root exudates, as well as in microbial activity and in the chemical transformation of nutrients.

Evaluation of total bacteria and fungi

The concentration of bacteria and fungi ($\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$) in the soil was quantified using the techniques established by Official Mexican Standards NOM-111, NOM-092 and NOM-110-SSA-1994 in order to relate the concentrations of the microbiota to the treatments. The ectomycorrhization percentage was determined by observing the roots under a stereoscopic microscope (GmbH 37081, Carl Zeiss microscopy, Germany) with the following equation: colonization percentage = number of mycorrhizae / total number of roots (Aguilar-Ulloa, Arce-Acuña, Galiano-Murillo, & Torres-Cruz, 2016).

Identification of mycorrhizal fungi

The sporocarps found in the orchard were collected for characterization. The surface of the sporocarps was cleaned with 75 % alcohol following the methodology of Zhang, Li, Wu, Ye, and Kang (2019). The fungus was isolated from the inner tissue of the central zone of the gleba, and placed on Melin-Norkrans agar. From the growth in the Petri dish, DNA extraction was performed using the commercial Power Soil® kit (QIAGEN) following the manufacturer's protocol. Amplification of the ITS region was carried out by polymerase chain reaction (PCR) using the iTaq Universal SYBR® Green Supermix kit. The concentration of the ITS1/ITS4 primers was 250 nM. The PCR conditions were: initial temperature of 95 °C for 10 min, 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 57 °C for 30 s, an extension at 72 °C for 30 s, denaturation at 95 °C for 15 s, dissociation curve at 60 °C for 1 min and final denaturation at 95 °C for 1 min. Two PCR products from two sporocarps were sequenced using the Sanger

disponible para el árbol. Lo anterior debido a que la forma quelatada permite que el elemento permanezca disponible en el suelo y en el agua en condiciones extremas, como pH alto (> 7.5) y alta concentración de carbonatos (> 6 %).

Variables vegetativas y productivas

La longitud de los brotes se evaluó en junio de cada año, en un brote del árbol por cuadrante a una altura de 2 m, el cual se señaló para evaluar siempre el mismo. El rendimiento (kg de nueces por árbol) se determinó en octubre de cada año. El análisis de Zn foliar ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) se realizó en 10 foliolos por árbol la primera semana de agosto. Los foliolos se tomaron de la parte externa e interna del árbol, tratando de abarcar los cuatro puntos cardinales del dosel, se lavaron con solución de ácido acético al 10 % en agua destilada y se sometieron a digestión húmeda con una mezcla ácida ($\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$). La medición se realizó mediante espectrometría de absorción atómica por el método DTPA (González et al., 2009).

Durante los años de estudio, el suelo de la huerta se mantuvo con una cubierta de plantas arvenses con crecimiento controlado mediante siegas periódicas para estimular el establecimiento de micorrizas y la diversidad microbiana en el suelo (Madrid-Delgado et al., 2021). De acuerdo con Dakora y Phillips (2002), la cubierta vegetal de arvenses nativas con altura limitada provoca un incremento en la cantidad de exudados radicales, así como en la actividad microbiana y en la transformación química de los nutrientes.

Evaluación de bacterias y hongos totales

La concentración de bacterias y hongos ($\text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$) del suelo se cuantificó con las técnicas establecidas por las Normas Oficiales Mexicanas NOM-111, NOM-092 y NOM-110-SSA-1994 con la finalidad de relacionar las concentraciones de la microbiota con los tratamientos. El porcentaje de ectomicorrización se determinó mediante la observación de las raíces en el microscopio estereoscópico (GmbH 37081, Carl Zeiss microscopy, Alemania) con la siguiente ecuación: Porcentaje de colonización = número de micorrizas / número total de raíces (Aguilar-Ulloa, Arce-Acuña, Galiano-Murillo, & Torres-Cruz, 2016).

Identificación de hongos micorrízicos

Los esporocarpos encontrados en la huerta se colectaron para su caracterización. La superficie de los esporocarpos se limpió con alcohol al 75 % siguiendo la metodología de Zhang, Li, Wu, Ye, y Kang (2019). El hongo se aisló a partir del tejido interno de la zona central de la gleba, y se colocó en agar Melin-Norkrans. A partir del

method, a quality analysis of the obtained sequences was performed, and the consensus sequence was developed with both sequences. The highest similarity was determined with the NCBI BLASTn tool.

Costs

The cost of each treatment was calculated including the costs of foliar Zn, diesel and payment to the tractor driver. In the second treatment, the cost of chelated Zn per hectare and per production cycle was added. In the third treatment, in addition to chelated Zn, the cost of beneficial microorganisms was added.

Statistical analysis

Analysis of variance of the data was performed according to a completely randomized design, and Tukey's range test ($P \leq 0.05$) was also carried out, both with MINITAB 18 statistical software.

Results and discussion

The initial soil Zn concentration in the study area was $1.96 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in the 0-30 cm stratum and $0.26 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in the 30-60 cm stratum. According to Flynn (2015), the suitable Zn content for pecan trees in soils of semiarid regions is 0.5 to $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. This indicates that the native element in the topsoil, where feeder roots and mycorrhizae are found, is abundant and adequate. In the topsoil, where organic matter accumulates and is transformed, microbial activity is very intense (Madrid-Delgado et al., 2021). In this layer, roots are colonized by mycorrhizae and the uptake of recycled and solubilized nutrients occurs (Hinsinger et al., 2018).

Fruiting shoot length

Although no statistical differences were found between treatments (Table 2), foliar Zn exhibited the greatest shoot length, with an average of 13.99 cm in the four years. Tarango-Rivero et al. (2009) state that average fruiting shoot growth for adult 'Western' pecan trees is 16 to 20 cm per year. The results of the first two years of the study reflect that shoot size was in the range considered conventional by these authors; however, in 2017 and 2018, the average fruiting shoot length was less than 12.6 cm. The above suggests that in pecan there is physiological variation between years, although the reason is unknown.

Specific leaf area

Regarding specific leaf area (SLA), no significant statistical differences were found between treatments (Table 3).

crecimiento en la caja Petri, se realizó la extracción de ADN con el kit comercial Power Soil® (QIAGEN) siguiendo el protocolo del fabricante. La amplificación de la región ITS se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con el kit iTaq Universal SYBR® Green Supermix. La concentración de los iniciadores ITS1/ITS4 fue de 250 nM. Las condiciones de la PCR fueron: temperatura inicial de 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 s, alineación a 57 °C durante 30 s, una extensión a 72 °C durante 30 s, desnaturalización a 95 °C durante 15 s, curva de disociación a 60 °C durante 1 min y desnaturalización final a 95 °C durante 1 min. Se secuenciaron, por el método de Sanger, dos productos de la PCR de dos esporocarpos, se realizó un análisis de calidad de las secuencias obtenidas y se elaboró la secuencia consenso con ambas secuencias. La mayor similitud se determinó con la herramienta NCBI BLASTn.

Costos

El costo de cada tratamiento se calculó incluyendo los costos del Zn foliar, el diésel y el pago al conductor del tractor. En el segundo tratamiento se adicionó el costo del Zn quelado por hectárea y por ciclo de producción. En el tercer tratamiento, además del Zn quelado, se agregó el costo de los microorganismos benéficos.

Análisis estadístico

El análisis de varianza de los datos se realizó de acuerdo con un diseño completamente al azar, y se llevó a cabo una comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$). Ambos con el paquete estadístico MINITAB 18.

Resultados y discusión

La concentración inicial de Zn en el suelo en el área de estudio fue de $1.96 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ en el estrato de 0-30 cm y de $0.26 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ en el estrato de 30-60 cm. Según Flynn (2015), el contenido adecuado de Zn para nogal en suelos de regiones semiáridas es de 0.5 a $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Esto indica que el elemento nativo en el suelo superficial, donde se encuentran las raíces alimentadoras y las micorrizas, es abundante y adecuado. En la capa superficial del suelo, donde la materia orgánica se acumula y se transforma, la actividad microbiana es muy intensa (Madrid-Delgado et al., 2021). En dicha capa, las raíces son colonizadas por micorrizas y se produce la absorción de nutrientes reciclados y solubilizados (Hinsinger et al., 2018).

Longitud del brote fructífero

Aunque no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos (Cuadro 2), el Zn foliar exhibió la

Table 2. Fruiting shoot length (FSL) in 'Western' pecan tree (*Carya illinoensis*) under three zinc treatments.**Cuadro 2. Longitud de brote fructífero (LBF) en nogal pecanero (*Carya illinoensis*) 'Western' bajo tres tratamientos con zinc.**

Treatment/Tratamiento	FSL (cm)/LBF (cm)				Average ¹ / Promedio ¹
	2015	2016	2017	2018	
Foliar Zn/Zn foliar	16.70 a ^z	16.22 a	10.38 a	12.66 a	13.99 a
Soil-applied chelated Zn/ Zn quelado edáfico	14.40 a	13.56 a	9.28 a	12.12 a	12.34 a
Soil-applied chelated Zn + MF/ Zn quelado edáfico + HM	14.80 a	14.80 a	10.52 a	12.32 a	13.11 a
CV	11.19	10.91	24.04	15.57	21.57

¹Average of all observations over four years. Values are means of each treatment. MF = mycorrhizal fungus; CV = coefficient of variation (%). ^zMeans with the same letter within a column do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

¹Promedio de todas las observaciones de cuatro años. Los valores son medias de cada tratamiento. HM = hongo micorrízico; CV = coeficiente de variación (%).

^zMedias con la misma letra dentro de una columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

Table 3. Specific leaf area (SLA) in 'Western' pecan trees (*Carya illinoensis*) under three zinc treatments.**Cuadro 3. Área foliar específica (AFE) en nogal pecanero (*Carya illinoensis*) 'Western' bajo tres tratamientos con zinc.**

Treatment/Tratamiento	SLA (cm ²)/AFE (cm ²)				Average ¹ / Promedio ¹
	2015	2016	2017	2018	
Foliar Zn/Zn foliar	27.10 a ^z	24.30 a	23.36 a	28.80 a	25.89 a
Soil-applied chelated Zn/ Zn quelado edáfico	24.70 a	22.88 a	24.12 a	30.90 a	25.65 a
Soil-applied chelated Zn + MF/ Zn quelado edáfico + HM	25.08 a	24.08 a	26.02 a	29.12 a	26.07 a
CV	15.55	11.81	14.45	19.15	17.57

¹Average of all observations over four years. Values are means of each treatment. MF = mycorrhizal fungus; CV = coefficient of variation (%). ^zMeans with the same letter within a column do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

¹Promedio de todas las observaciones de cuatro años. Los valores son medias de cada tratamiento. HM = hongo micorrízico; CV = coeficiente de variación (%).

^zMedias con la misma letra dentro de una columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

The SLA obtained with soil Zn and the mycorrhizal fungus *P. tinctorius* is similar to that obtained by Tarango-Rivero and García-Nevárez (2014), who report that mycorrhization induced by *P. tinctorius* in pecan trees improved Zn uptake, growth, and nut production (from 4.6 to 22.9 kg·tree⁻¹) from 2004 to 2008.

In addition to Zn, there are other environmental and management factors involved in pecan tree growth that should be considered in future studies; among them are irrigation, pruning, and nitrogen fertilization. According to Lombardini, Restrepo-Díaz, and Volder (2009), pecan trees need good canopy management to avoid self-shading and maintain productivity (Smith, 2008).

Foliar Zn concentration

The foliar treatment generated the highest leaf Zn concentration (43.64 mg·kg⁻¹) during the four years (Table 4). In general, foliar Zn concentration was low in all treatments except in the 2016 fertilization. Heerema

mayor longitud de brote, con un promedio de 13.99 cm en los cuatro años. Tarango-Rivero et al. (2009) mencionan que el crecimiento promedio del brote fructífero para nogales adultos 'Western' es de 16 a 20 cm por año. Los resultados de los dos primeros años de estudio reflejan que el tamaño del brote estuvo en el rango que dichos autores consideran convencional; sin embargo, en 2017 y 2018, la longitud promedio del brote fructífero fue menor a 12.6 cm. Lo anterior sugiere que en nogal se presenta variación fisiológica entre años, aunque la razón se desconoce.

Área foliar específica

En relación con el área foliar específica (AFE), no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Cuadro 3).

El AFE obtenida con Zn edáfico y el hongo micorrízico *P. tinctorius* es similar a la obtenida por Tarango-Rivero y García-Nevárez (2014), quienes señalan que la

et al. (2017) report Zn ranges in leaves from 14 to 22 mg·kg⁻¹ in 'Wichita' pecan trees, so the results of this study are within normal limits for foliar Zn.

The treatment of soil Zn combined with the mycorrhizal fungus generated an increase in foliar Zn concentration of 24 %, compared to chelated Zn alone (Table 4); in addition, growth was greater. A recent study points out that N fertilization has a significant interaction with Zn concentration; the higher the N concentration, the higher the foliar Zn content in pecan trees (Cruz-Álvarez et al., 2020) and other crops (Alloway, 2008).

Although Pond et al. (2006) note that the normal foliar Zn concentration in pecan trees should be 86 to 256 mg·kg⁻¹, Sherman (2018) proposes lower standards in leaves washed before analysis for semiarid regions (30 to 50 mg·kg⁻¹ Zn). Based on the above range, only the control reached an adequate Zn concentration. It has been argued for decades that much of the nutrient that is considered sufficient is actually the residual deposit on the leaf surface and not metabolic Zn (Smith & Storey, 1976); this is how this element is translocated from old leaves to developing organs (Alloway, 2008).

Currently, there is little scientific information on foliar Zn applications in pecan trees (Ojeda-Barrios et al., 2014). Ferrandon and Chamel (1988) and Zhang and Brown (1999) report that foliar Zn sprays on *Pistacia vera* and *Pisum sativum* showed little mobility and, apparently, little effectiveness, since 10 days after the application of the treatments more than 89 % of the element was still found in the leaf of both crops. Due to the low translocation capacity of Zn, many foliar applications are required (Swietlik, 2001). Foliar uptake and nutrient translocation in pecan are poorly understood physiological processes. Apparently, foliar

micorrización inducida por *P. tinctorius* en árboles de nogal mejoró la absorción de Zn, el crecimiento y la producción de nuez (de 4.6 a 22.9 kg·árbol⁻¹) de 2004 a 2008.

Además del Zn, existen otros factores ambientales y de manejo involucrados en el crecimiento del nogal que deben ser considerados en futuros estudios; entre ellos se encuentran el riego, la poda y la fertilización con nitrógeno. De acuerdo con Lombardini, Restrepo-Díaz, y Volder (2009), los nogales necesitan un buen manejo del dosel para evitar la sombra propia y mantener la productividad (Smith, 2008).

Concentración foliar de Zn

El tratamiento foliar generó la concentración más alta de Zn en las hojas (43.64 mg·kg⁻¹) durante los cuatro años (Cuadro 4). En general, la concentración foliar de Zn fue baja en todos los tratamientos, excepto en la fertilización de 2016. Heerema et al. (2017) reportan rangos de dicho elemento en hojas de 14 a 22 mg·kg⁻¹ en nogales 'Wichita', por lo que los resultados de este estudio están dentro de los límites normales de Zn foliar.

El tratamiento de Zn edáfico combinado con el hongo micorrízico generó un aumento en la concentración foliar de Zn de 24 %, en comparación con el Zn quelado solo (Cuadro 4); además, el crecimiento fue mayor. Un estudio reciente menciona que la fertilización con N tiene una interacción significativa con la concentración de Zn; a mayor concentración de N, mayor contenido de Zn foliar en nogal (Cruz-Álvarez et al., 2020) y en otros cultivos (Alloway, 2008).

Aunque Pond et al. (2006) mencionan que la concentración normal de Zn foliar en nogales debe ser de 86 a 256 mg·kg⁻¹, Sherman (2018) propone estándares más bajos en hojas lavadas antes del

Table 4. Foliar zinc concentration in 'Western' pecan trees (*Carya illinoensis*) under three Zn treatments.

Cuadro 4. Concentración foliar de zinc en nogal pecanero (*Carya illinoensis*) 'Western' bajo tres tratamientos con Zn.

Treatment/Tratamiento	Concentración foliar de Zn (mg·kg ⁻¹)/ Foliar Zn concentration (mg·kg ⁻¹)				Average ¹ / Promedio ¹
	2015	2016	2017	2018	
Foliar Zn/Zn foliar	43.60 a ²	61.80 a	23.80 a	45.36 a	43.64 a
Soil-applied chelated Zn/ Zn quelado edáfico	27.40 b	24.60 b	15.80 a	31.04 b	24.71 b
Soil-applied chelated Zn + MF/ Zn quelado edáfico + HM	35.20 ab	29.60 b	24.20 a	40.78 ab	32.45 b
CV	21.12	35.09	40.38	15.85	37.93

¹Average of all observations over four years. Values are means of each treatment. MF = mycorrhizal fungus; CV = coefficient of variation (%). ²Means with the same letter within a column do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

¹Promedio de todas las observaciones de cuatro años. Los valores son medias de cada tratamiento. HM = hongo micorrízico; CV = coeficiente de variación (%).

²Medias con la misma letra dentro de una columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

fertilizers are not designed based on plant physiology. An example of this is soluble Zn salts for foliar fertilization, which can cause leaf burn (Drissi, Houssa, Bamouh, & Benbella, 2015).

Yield

Although the yield of adult pecan trees is closely related to the nutritional reserves of the previous year, the nutritional supply of the current year also affects fruiting (Smith, 1991). In this study, all Zn treatments showed good nut production. Foliar and soil treatments with Zn were statistically similar in production (Table 5). Walworth et al. (2017) report that nut yield was lower in pecan trees receiving 4.4 kg·ha⁻¹ of Zn, compared to those receiving 2.2 kg·ha⁻¹, although without statistical differences. Furthermore, these authors achieved higher nut yields in treatments with chelated Zn applied by fertigation in 'Western' and 'Wichita' pecan trees after the third year of application.

Microbial populations and mycorrhization

The activity of native mycorrhizal communities, where neither *P. tinctorius* nor soil Zn was applied, allowed the Zn available in the soil to be absorbed by the roots of the control treatment. In this regard, Ge, Breneman, Bonito, and Smith (2017) reported that soil-available Zn is sufficient for pecan growth and fruiting in the presence of ectomycorrhizal fungi. Therefore, minimum tillage may favor the natural environment of mycorrhizae in the pecan orchard. Apparently, by not applying Zn to the foliage or soil, tree roots stimulate rhizospheric microbial activity to favor nutrient acquisition from the soil (Read & Pérez-Moreno, 2003), as occurred in the control treatment of this study.

As expected, the trees that received soil Zn and mycorrhizal fungi presented a high concentration of

análisis para regiones semiáridas (30 a 50 mg·kg⁻¹ de Zn). Con base en el rango anterior, únicamente el control alcanzó una concentración adecuada de Zn. Durante décadas se ha argumentado que gran parte del nutriente que se considera suficiente es, en realidad, el depósito residual en la superficie de la hoja y no Zn metabólico (Smith & Storey, 1976); es así que dicho elemento se transloca desde hojas viejas hasta órganos en desarrollo (Alloway, 2008).

En la actualidad, se cuenta con poca información científica sobre aplicaciones foliares de Zn en nogal pecanero (Ojeda-Barrios et al., 2014). Ferrandon y Chamel (1988), y Zhang y Brown (1999) reportan que las aspersiones foliares de Zn sobre *Pistacia vera* y *Pisum sativum* mostraron poca movilidad y, aparentemente, poca efectividad, ya que después de 10 días de la aplicación de los tratamientos más del 89 % del elemento aún se encontraba en la hoja de ambos cultivos. Debido a la baja capacidad de translocación del Zn, se requieren muchas aplicaciones foliares (Swietlik, 2001). La absorción foliar y la translocación de nutrientes en nogal son procesos fisiológicos poco comprendidos. Aparentemente, los fertilizantes foliares no están diseñados en función de la fisiología de las plantas. Un ejemplo de ello son las sales de Zn solubles para la fertilización foliar, las cuales pueden provocar quemaduras en las hojas (Drissi, Houssa, Bamouh, & Benbella, 2015).

Rendimiento

Aunque el rendimiento de nogales adultos está estrechamente relacionado con las reservas nutricionales del año anterior, el aporte nutricional del año en curso también afecta la fructificación (Smith, 1991). En este estudio, todos los tratamientos con Zn mostraron una buena producción de nuez. Los tratamientos foliar y edáfico con Zn fueron estadísticamente similares en producción (Cuadro 5). Walworth et al. (2017) reportan que el rendimiento

Table 5. 'Western' pecan tree (*Carya illinoensis*) yield under three zinc treatments.

Cuadro 5. Rendimiento de nogal pecanero (*Carya illinoensis*) 'Western' bajo tres tratamientos con zinc.

Treatment/Tratamiento	Yield (kg·tree ⁻¹)/Rendimiento (kg·árbol ⁻¹)				Average ¹ / Promedio ¹
	2015	2016	2017	2018	
Foliar Zn/Zn foliar	15.78 a ²	33.94 a	23.80 a	34.80 a	27.08 a
Soil-applied chelated Zn/ Zn quelado edáfico	15.55 a	32.18 a	19.42 a	34.76 a	25.48 a
Soil-applied chelated Zn + MF/ Zn quelado edáfico + HM	16.78 a	32.08 a	24.77 a	34.20 a	26.95 a
CV	28.51	14.26	18.45	13.93	33.50

¹Average of all observations over four years. Values are means of each treatment. MF = mycorrhizal fungus; CV = coefficient of variation (%). ²Means with the same letter within a column do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

¹Promedio de todas las observaciones de cuatro años. Los valores son medias de cada tratamiento. HM = hongo micorrízico; CV = coeficiente de variación (%).

²Medias con la misma letra dentro de una columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

bacteria and fungi in the soil, and a high percentage of ectomycorrhization (Table 6). Tarango-Rivero et al. (2004) found similar mycorrhizal percentages in young pecan tree roots. Madrid-Delgado et al. (2021) point out that there are numerous factors that influence the populations of microorganisms in the rhizosphere.

The identity of the native ectomycorrhiza was confirmed by amplification and sequencing of the ITS gene, where the fungus *Pisolithus tinctorius* was identified (Table 7). The basidiocarps found in the experimental area presented the typical characteristics of this fungus (Figure 1), and their shape varied from globose, obpyriform to claviform, from 4 to 11 cm in diameter and from 3.0 to 8.5 cm in height, without considering the length of the stipe. The latter was fibrous, yellowish and deeply rooted, and reached 5 cm in diameter by 9 cm in length. The stipe had a fine, smooth, bright yellow to yellowish-brown peridium with dark olive tones. The texture of the basidiocarp was fleshy to slightly viscous in the young stages,

de nuez fue inferior en los nogales que recibieron 4.4 kg·ha⁻¹ de Zn, en comparación con los de 2.2 kg·ha⁻¹, aunque sin diferencias estadísticas. Asimismo, estos autores lograron mayor producción de almendra en los tratamientos con Zn quelado aplicado por fertiirrigación en nogales 'Western' y 'Wichita' después del tercer año de aplicación.

Poblaciones microbianas y micorrización

La actividad de las comunidades nativas de micorrizas, donde no se aplicó *P. tinctorius* ni Zn edáfico, permitió que el Zn disponible en el suelo fuera absorbido por las raíces del tratamiento control. En este sentido, Ge, Breneman, Bonito, y Smith (2017) informaron que el Zn disponible en el suelo es suficiente para el crecimiento y fructificación del nogal pecanero en presencia de hongos ectomicorrízicos. Por lo tanto, la labranza mínima puede favorecer el ambiente natural de las micorrizas en la huerta nogalera. Aparentemente, al no aplicar Zn al follaje o al suelo, las raíces de los

Table 6. Microorganisms in roots and rhizospheric soil of 'Western' pecan trees (*Carya illinoensis*) under three zinc treatments.

Cuadro 6. Microorganismos en raíces y suelo rizosférico de nogal pecanero (*Carya illinoensis*) 'Western' bajo tres tratamientos con zinc.

Treatment/ Tratamiento	Bacteria (CFU·g ⁻¹ soil)/ Bacterias (UFC·g ⁻¹ suelo)	Fungi (CFU·g ⁻¹ soil)/ Hongos (UFC·g ⁻¹ suelo)	Ectomycorrhization (%)/ Ectomicorrización (%)
Foliar Zn/Zn foliar	48,000 b ²	2,000 b	66.9 a
Soil-applied chelated Zn/ Zn quelado edáfico	48,000 b	2,000 ab	67.8 a
Soil-applied chelated Zn + MF/ Zn quelado edáfico + HM	63,000 a	4,000 a	83.7 a
CV (%)	26.09	78.60	12.72

CFU = colony forming units; MF = mycorrhizal fungus; CV = coefficient of variation (%). ²Means with the same letter within a column do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

UFC = unidades formadoras de colonias; HM = hongo micorrízico; CV = coeficiente de variación. ²Medias con la misma letra dentro de una columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

Table 7. Molecular identification of the fungus from sporocarps present in the 'Western' pecan tree (*Carya illinoensis*) plantation.

Cuadro 7. Identificación molecular del hongo a partir de los esporocarpos presentes en la plantación de nogal pecanero (*Carya illinoensis*) 'Western'.

Isolate/ Aislado	Sequence/ Secuencia	Identity (%)/ Identidad (%)	Reference sequence/ Secuencia de referencia	Molecular identification/ Identificación molecular
1	ITS region/Región ITS	98.99	<i>Pisolithus tinctorius</i> EF529622.1	<i>Pisolithus tinctorius</i>
		98.99	<i>Pisolithus tinctorius</i> AY739178.1	
3	ITS region/Región ITS	99.02	<i>Pisolithus tinctorius</i> EF529622.1	<i>Pisolithus tinctorius</i>
		99.02	<i>Pisolithus tinctorius</i> AY739178.1	

and brittle pulvinate in the mature stages. When opened, the gleba and peridioles were white, yellowish brown, reddish brown and olive in tone. Spores were spherical, 7 to 8 μm in diameter, with ornamentations of approximately 0.5 μm . The ectomycorrhizal roots of the pecan trees took the form of the coralloid type (Figure 2).

árboles estimulan la actividad microbiana rizosférica para favorecer la adquisición del nutriente del suelo (Read & Pérez-Moreno, 2003), como ocurrió en el tratamiento control de este estudio.

Como era de esperarse, los árboles que recibieron Zn edáfico y hongos micorrízicos presentaron alta



Figure 1. Fruiting body of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. Santa María pecan orchard in Delicias, Chihuahua, Mexico.

Figura 1. Cuerpo fructífero del hongo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*. Huerta nogalera Santa María en Delicias, Chihuahua, México.



Figure 2. Coralloid-type ectomycorrhizal feeder roots of pecan trees (*Carya illinoensis*). Santa María pecan orchard in Delicias, Chihuahua, Mexico.

Figura 2. Raíces alimentadoras ectomicorrizadas de nogal pecanero (*Carya illinoensis*) tipo coraloide. Huerta nogalera Santa María en Delicias, Chihuahua, México.

Zinc application method

According to the results of the study, soil-applied Zn is effective for pecan trees when the nutrient is concentrated in an application band and surface feeder roots are ectomycorrhizal. Wood (2007) applied Zn sulfate or oxide in a 10-cm-wide band over underground irrigation lines supplying five-year-old pecan trees in acid soils. This author points out that the application of 264 g of Zn per tree supplies the nutrient needs for up to three or four years, since the fertilizer slowly penetrates the soil and each year that passes the feeder roots have contact with the Zn band.

Costs

The cost analysis is summarized in Table 8. The results show that both treatments have the same cost (\$116.00 USD·ha⁻¹), but if mycorrhizal fungi are added, the cost must be increased by \$36.00 USD·ha⁻¹.

In the conventional production model for pecan trees in Chihuahua, 5,400 g·ha⁻¹·year⁻¹ are discharged into the environment, while applying 280 g·tree⁻¹ of chelated Zn to the soil is equivalent to 2,660 g·ha⁻¹, which is enough for the pecan cycle. Tractor diesel consumption for fertilizing with Zn sprayed on foliage could be reduced by 65 %, as well as water, and soil compaction would be avoided, since five or more foliar applications are required.

Conclusions

The results indicate that the contribution of Zn to the soil, in the form of chelates, plus the addition of beneficial microorganisms allows the pecan tree to be adequately nourished. This technology allows the tree to grow and produce just like with traditional

concentración de bacterias y hongos en el suelo, y alto porcentaje de ectomicorrización (Cuadro 6). Tarango-Rivero et al. (2004) encontraron porcentajes de micorrización similares en raíces de nogales jóvenes. Madrid-Delgado et al. (2021) señalan que existen numerosos factores que influyen en las poblaciones de microorganismos en la rizosfera.

La identidad de la ectomicorriza nativa se confirmó mediante la amplificación y secuenciación del gen ITS, donde se identificó al hongo *Pisolithus tinctorius* (Cuadro 7). Los basidiocarpos encontrados en el área experimental presentaron las características típicas de dicho hongo (Figura 1), y su forma varió de globoso, obpiriforme a claviforme, de 4 a 11 cm de diámetro y de 3.0 a 8.5 cm de altura, sin considerar la longitud del estípite. Este último era fibroso, amarillento y profundamente enraizado, y alcanzó 5 cm de diámetro por 9 cm de largo. El estípite tenía un peridio fino y suave, de color amarillo brillante a pardo amarillento con tonos oliva oscuro. La textura del basidiocarpo fue carnosa a levemente viscosa en las etapas jóvenes, y pulvinato frágil en las etapas maduras. Cuando éste se abrió, se observaron la gleba y los peridiolos de tono blanco, marrón amarillento, rojizo y oliva. Las esporas eran esféricas de 7 a 8 µm de diámetro, con ornamentaciones de aproximadamente 0.5 µm. La raíces de los nogales ectomicorrizadas tomaron forma del tipo coraloide (Figura 2).

Método de aplicación de zinc

De acuerdo con los resultados del estudio, la aplicación de Zn al suelo es efectiva para los nogales cuando el nutriente se concentra en una banda de aplicación y las raíces superficiales alimentadoras están ectomicorrizadas. Wood (2007) aplicó sulfato u óxido de

Table 8. Cost of zinc applications on 'Western' pecan trees (*Carya illinoensis*).

Cuadro 8. Costo de las aplicaciones de zinc en nogal pecanero (*Carya illinoensis*) 'Western'.

Isolate/ Aislado	Treatment/ Tratamiento	Cost per application/ Costo por aplicación	Applications/ Aplicaciones	Cost per year of production/ Costo por año de producción
1	Foliar Zn spraying/ Aspersiones foliares de Zn	\$23.18 USD·ha ⁻¹ (Zn, diesel and tractor driver included)/ \$23.18 USD·ha ⁻¹ (Zn, diesel y conductor de tractor incluidos)	1 h·ha; 5 applications = 5 h of spraying/ 1 h·ha; 5 aplicaciones = 5 h de aspersión	\$116.00 USD·ha ⁻¹
2	Soil applications of chelated Zn/ Aplicaciones al suelo de Zn quelado	\$116.00 USD (10 kg·ha ⁻¹)	1 h·ha	\$116.00 USD·ha ⁻¹

Cost in US dollars. The addition of mycorrhizal fungi has an additional cost of \$36.00 USD·ha⁻¹.

Costo en dólares americanos. La adición de hongos micorrízicos tiene un costo adicional de \$36.00 USD·ha⁻¹.

technology, with the advantage of eliminating nighttime foliar spraying.

Acknowledgments

The authors thank Mr. Jesús Montoya Chávez and Mr. Luis Fitzmaurice Castro for their support in carrying out the agricultural activities in the Santa María orchard.

End of English version

References / Referencias

- Aguilar-Ulloa, W., Arce-Acuña, P., Galiano-Murillo, F., & Torres-Cruz, T. J. (2016). Aislamiento de esporas y evaluación de métodos de inoculación en la producción de micorrizas en cultivos trampa. *Revista Tecnología en Marcha*, 29, 5-14. doi: 10.18845/tm.v29i7.2700
- Ajeesh-Krishna, T. P., Maharajan, T., Roch, G. V., Savarimuthu, I., & Stanislaus, A. C. (2020). Structure, function, regulation and phylogenetic relationship of ZIP family transporters of plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 662. doi: 10.3389/fpls.2020.00662
- Alloway, B. J. (2008). *Zinc in soils and crop nutrition*. Francia: International Fertilizer Industry Association. Retrieved from <http://www.topsoils.co.nz/wp-content/uploads/2014/09/Zinc-in-Soils-and-Crop-Nutrition-Brian-J-Alloway.pdf>
- Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcon, R., & Azcon-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1761-1778. doi: 10.1093/jxb/eri197
- Cruz-Álvarez, O., Hernández-Rodríguez, O. A., Jacobo-Cuellar, J. L., Ávila-Quezada, G., Morales-Maldonado, E., Parra-Quezada, R. Á., Robles-Hernandez L., & Ojeda-Barrios, D. L. (2020). Nitrogen fertilization in pecan and its effect on leaf nutrient concentration, yield and nut quality. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 26(3), 163-173. doi: 10.5154/rchsh.2019.10.021
- Dakora, F. D., & Phillips, D. A. (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. In: Adu-Gyamfi, J. J. (Ed.), *Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities. Developments in Plant and Soil Sciences* (pp. 201-213). Dordrecht, Netherlands: Springer. doi: 10.1007/978-94-017-1570-6_23
- Drissi, S., Houssa, A. A., Bamouh, A., & Benbella, M. (2015). Corn silage (*Zea mays* L.) response to zinc foliar spray concentration when grown on sandy soil. *Journal of Agricultural Science*, 7(2), 68-79. doi: 10.5539/jas.v7n2p68
- Ferrandon, M., & Chamel, A. R. (1988). Cuticular retention, foliar absorption and translocation of Fe, Mn and Zn supplied in organic and inorganic form. *Journal of Plant Nutrition*, 11(3), 247-263. doi: 10.1080/01904168809363800

Zn en una banda de 10 cm de ancho en la línea de goteo de nogales de cinco años en suelos ácidos. Dicho autor menciona que la aplicación de 264 g de Zn por árbol suple las necesidades del nutriente hasta por tres o cuatro años, ya que el fertilizante profundiza en el suelo lentamente y cada año que pasa las raíces alimentadoras tienen contacto con la banda de Zn.

Costos

El análisis de costos se resume en el Cuadro 8. Los resultados muestran que ambos tratamientos tienen el mismo costo (\$116.00 USD·ha⁻¹), pero si se agregan los hongos micorrízicos se deben aumentar \$36.00 USD·ha⁻¹.

En el modelo convencional de producción de nogales en Chihuahua, se vierten al ambiente 5,400 g·ha⁻¹·año⁻¹, mientras que aplicar 280 g·árbol⁻¹ de Zn quelado en el suelo equivale a 2,660 g·ha⁻¹, lo cual es suficiente para el ciclo del nogal. El consumo de diésel del tractor para fertilizar con Zn asperjado al follaje se podría reducir en 65 %, así como el agua, y se evitaría la compactación del suelo, ya que se requieren de cinco o más aplicaciones foliares.

Conclusiones

Los resultados indican que el aporte de Zn al suelo, en forma de quelatos, más la adición de microorganismos benéficos permite que el nogal pecanero se nutra adecuadamente. Esta tecnología logra que el árbol crezca y produzca igual que con la tecnología tradicional, con la ventaja de eliminar la aspersión foliar nocturna.

Agradecimientos

Los autores agradecen al señor Jesús Montoya Chávez y al señor Luis Fitzmaurice Castro por su apoyo para realizar las actividades agrícolas en la huerta Santa María.

Fin de la versión en español

- Flynn, R. (2015). *Interpreting soil tests: unlock the secrets of your soil*. USA: New Mexico State University. Retrieved from https://aces.nmsu.edu/pubs/_circulars/CR676/welcome.html
- Ge, Z. W., Breneman, T., Bonito, G., & Smith, M. E. (2017). Soil pH and mineral nutrients strongly influence truffles and other ectomycorrhizal fungi associated with commercial pecans (*Carya illinoensis*). *Plant and Soil*, 418, 493-505. doi: 10.1007/s11104-017-3312-z
- González, D., Almendros, P., & Álvarez, J. (2009). Métodos de análisis de elementos en suelos: disponibilidad y fraccionamiento. *Anales de Química de la RSEQ*, 105(3), 205-

212. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3094237>
- Gupta, N., Ram, H., & Kumar, B. (2016). Mechanism of Zinc absorption in plants: uptake, transport, translocation and accumulation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15(1), 89-109. doi: 10.1007/s11157-016-9390-1
- Heerema, R. J., Vanleeuwen, D., Thompson, M. Y., Sherman, J. D., Comeau, M. J., & Walworth, J. L. (2017). Soil application of zinc-EDTA increases leaf photosynthesis of immature 'Wichita' pecan trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 142(1), 27-35. doi: 10.21273/JASHS03938-16
- Herrera-Aguirre, E. (2008). *Manejo de huertas de nogal*. México: Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Hinsinger, P., Herrmann, L., Lesueur, D., Robin, A., Trap, J., Waithaisong, K., & Plassard, C. (2018). Impact of roots, microorganisms and microfauna on the fate of soil phosphorus in the rhizosphere. In: Plaxton, W. C., & Lambers, H. (Eds), *Annual Plant Reviews online* (377-407). USA: Wiley & Sons, Inc. doi: 10.1002/9781119312994.apr0528
- Imran, M., Arshad, M., Khalid, A., Kanwal, S., & Crowley, D. E. (2014). Perspectives of rhizosphere microflora for improving Zn bioavailability and acquisition by higher plants. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16(3), 653-662. Retrieved from http://www.fspublishers.org/published_papers/41589_..pdf
- Kamran, S., Shahid, I., Baig, D. N., Rizwan, M., Malik, K. A., & Mehnaz, S. (2017). Contribution of zinc solubilizing bacteria in growth promotion and zinc content of wheat. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2593. doi: 10.3389/fmicb.2017.02593
- Krishnakumar, S., Balakrishnan, N., Muthukrishnan, R., & Kumar, S. R. (2013). Myth and mystery of soil mycorrhiza: a review. *African Journal of Agricultural Research*, 8(38), 4706-4717. doi: 10.5897/AJAR2013.7490
- Lombardini, L., Restrepo-Díaz, H., & Volder, A. (2009). Photosynthetic light response and epidermal characteristics of sun and shade pecan leaves. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(3), 372-378. doi: 10.21273/JASHS.134.3.372
- Madrid-Delgado, G., Orozco-Miranda, M., Cruz-Orsorio, M., Hernández-Rodríguez, O. A., Rodríguez-Heredia, R., Roa-Huerta, M., & Avila-Quezada, G. D. (2021). Pathways of phosphorus absorption and early signaling between the mycorrhizal fungi and plants. *Phyton International Journal of Experimental Botany*, 90(5), 1321-1338. doi: 10.32604/phyton.2021.016174
- Montalvo, D., Degryse, F., da Silva, R. C., Baird, R., & McLaughlin, M. J. (2016). Agronomic effectiveness of zinc sources as micronutrient fertilizer. *Advances in Agronomy*, 139, 215-267. doi: 10.1016/bs.agron.2016.05.004
- Muñoz-Márquez, E., Macías-López, C., Franco-Ramírez, A., Sánchez-Chávez, E., Jiménez-Castro, J., & González-García, J. (2009). Identificación y colonización natural de hongos micorrízicos arbusculares en nogal. *Terra Latinoamericana*, 27(4), 355-361. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57313040010>
- NOM-111-SSA-1994. (1994). *Norma Oficial Mexicana: Método para la cuenta de hongos y levaduras en alimentos*. Retrieved from <http://www.norlexinternacional.com/arch/N111S194.htm>
- NOM-092-SSA1-1994. (1994). *Norma Oficial Mexicana: Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa*. Retrieved from <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html>
- NOM-110-SSA1-1994. (1994). *Norma Oficial Mexicana: Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico*. Retrieved from <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>
- Ojeda-Barrios, D. L., Perea-Portillo, E., Hernández-Rodríguez, O. A., Avila-Quezada, G., Abadía, J., & Lombardini, L. (2014). Foliar fertilization with zinc in pecan trees. *HortScience*, 49(5), 562-566. doi: 10.21273/HORTSCI.49.5.562
- Olivas-Tarango, A. L., Tarango-Rivero, S. H., & Ávila-Quezada, G. D. (2021). Improving pecan production by zinc in drip irrigation in calcareous soils. *Terra Latinoamericana*, 39, 1-12. doi: 10.28940/terra.v39i0.992
- Organización de las Naciones Unidas (ONU). (1992). *Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático*. Retrieved from <https://unfccc.int/es/process-and-meetings/the-convention/que-es-la-convencion-marco-de-las-naciones-unidas-sobre-el-cambio-climatico>
- Organización de las Naciones Unidas (ONU). (2015). *Acuerdo de París*. Retrieved from <https://unfccc.int/es/process-and-meetings/the-paris-agreement/que-es-el-acuerdo-de-paris>
- Pond, A. P., Walworth, J. L., Kilby, M. W., Gibson, R. D., Call, R. E., & Núñez, H. (2006). Leaf nutrient levels for pecans. *HortScience*, 41(5), 1339-1341. doi: 10.21273/HORTSCI.41.5.1339
- Read, D. J., & Pérez-Moreno, J. (2003). Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance. *New Phytologist*, 157(3), 475-492. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00704.x
- Sharma, A., Patni, B., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, S. C. (2013). Zinc – an indispensable micronutrient. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(1), 11-20. doi: 10.1007/s12298-012-0139-1
- Sherman, J. (2018). Fertilization in pecan orchards. *52th Western Pecan Conference*. USA: Cooperative Extension Service (CES) - New Mexico State University. Retrieved from <https://aces.nmsu.edu/ces/pecans/pecan-management.html>
- Smith, M. W., & Storey, J. B. (1976). The influence of washing procedures on surface removal and leaching of certain elements from pecan *Carya illinoensis* leaflets. *HortScience*, 11, 50-52. Retrieved from <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19760092968>
- Smith, M. W. (1991). Pecan nutrition. *Pecan husbandry: Challenges and opportunities*, 1, 152-157. Retrieved from https://bugwoodcloud.org/CMS/pecan/challenges_prospects_developing_pecan_cultivars.pdf
- Smith, M. W. (2008). Relationship of trunk size to selected canopy size parameters for native pecan trees. *HortScience*, 43(3), 784-786. 2008. doi: 10.21273/HORTSCI.43.3.784

- Swietlik, D. (2001). Zinc nutrition of fruit trees by foliar sprays. *Acta Horticulturae*, 594, 123-129. doi: 10.17660/ActaHortic.2002.594.11
- Tarango-Rivero, S. H., & García-Nevárez, N. (2014). *Manejo sostenible del suelo en nogaleras*. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, CEDEL-INIFAP. Retrieved from <https://docplayer.es/47692444-Manejo-sostenible-del-suelo-en-nogaleras.html>
- Tarango-Rivero, S. H., Macías-López B. C., Alarcón, A., & Pérez-Moreno, J. (2004). Colonización micorrízica, crecimiento y concentración foliar de nutrimentos en nogal pecanero y pistachero. *Agricultura Técnica de México*, 30(2), 191-203. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/608/60830206.pdf>
- Tarango-Rivero, S. H, Nevárez-Moorillón, V., & Orrantia-Borunda, E. (2009). Growth, yield, and nutrient status of pecans fertilized with biosolids and inoculated with rizosphere fungi. *Bioresource Technology*, 100(6), 1992-1998. doi: 10.1016/j.biortech.2007.12.078
- Tsonev, T., & Cebola Lidon, F. J. (2012). Zinc in plants-an overview. *Emirates Journal of Food & Agriculture*, 24(4), 322-333. Retrieved from <https://www.ejfa.me/index.php/journal/article/view/892>
- Walworth, J. L., White, S. A., Comeau, M. J., & Heerema, R. J. (2017). Soil-applied Zn EDTA: vegetative growth, nut production, and nutrient acquisition of immature pecan trees grown in an alkaline, calcareous soil. *HortScience*, 52(2), 301-305. doi: 10.21273/HORTSCI11467-16
- Wood, B. W. (2007). Correction of zinc deficiency in pecan by soil banding. *HortScience*, 42(7), 1554-1558. doi: 10.21273/HORTSCI.42.7.1554
- Zhang, Q., & Brown, P. H. (1999). The mechanism of foliar zinc absorption in pistachio and walnut. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(3), 312-317. doi: 10.21273/JASHS.124.3.312
- Zhang, X., Li, X., Wu, C., Ye, L., & Kang, Z. (2019). Exogenous nitric oxide and phosphorus stress affect the mycorrhization, plant growth, and associated microbes of *Carya illinoensis* seedlings colonized by *Tuber indicum*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2634. doi: 10.3389/fmicb.2019.0263

