



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**Centro de Ciencias Básicas**

**Doctorado en Ciencias Biológicas**

**Tesis**

**Restauración de ecosistemas forestales de bosque templado en el  
Área Natural Protegida Sierra Fría, Aguascalientes, México.**

**Presenta**

**M. en C. Víctor Manuel Martínez Calderón**

**Para obtener el grado en  
Doctor en Ciencias Biológicas**

**Tutor**

**Dr. Joaquín Sosa Ramírez**

**Integrantes del Comité Tutoral**

**Dr. José de Jesús Luna Ruiz**

**Dr. Diego Rafael Pérez Salicrup**

**Aguascalientes, Ags. Febrero 2023**

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

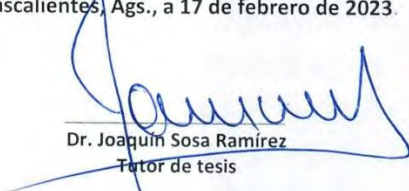
Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **VICTOR MANUEL MARTINEZ CALDERON** con ID **153801** quien realizó la tesis titulada: **RESTAURACIÓN DE ECOSISTEMAS FORESTALES DE BOSQUE TEMPLADO EN EL ÁREA NATURAL PROTEGIDA SIERRA FRÍA, AGUASCALIENTES, MÉXICO**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.


Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.


ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 17 de febrero de 2023.

  
Dr. Joaquín Sosa Ramírez  
Tutor de tesis

  
Dr. José de Jesús Luna Ruiz  
Asesor de tesis

  
Dr. Diego Rafael Pérez Salicrup  
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.  
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.  
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16  
Actualización: 00  
Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACION ACADEMICA PARA INICIAR LOS TRAMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 14-mar-23

NOMBRE: Víctor Manuel Martínez Calderón ID 153801

PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, MODALIDAD DIRECTA LGAC (del posgrado): ECOLOGÍA Y BIODIVERSIDAD

TIPO DE TRABAJO: ( X ) Tesis ( ) Trabajo práctico

TITULO: Restauración de ecosistemas forestales de bosque templado en el ANP Sierra Fría, Aguascalientes, México.

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

Impacta sobre la restauración de ecosistemas importantes en el país

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
NO Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
NO Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI Coincide con el título y objetivo registrado
SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
SI El estudiante es el primer autor
SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

SI
No

FIRMAS

Elaboró:

\* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

DR. GILBERTO ALEJANDRO OCAMPO ACOSTA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

\* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DR. JUAN JÁUREGUI LINCÓN

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. JORGE MARTÍN ALFEREZ CHÁVEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.



## Effect of storage and pre-germination treatments on seeds of *Arbutus xalapensis* from north-central Mexico

Victor Manuel Martínez-Calderón<sup>1</sup> · Joaquín Sosa-Ramírez<sup>2</sup> · José de Jesús Luna-Ruíz<sup>2</sup> · Diego Rafael Pérez-Salicrup<sup>3</sup> · Manuel Higinio Sandoval-Ortega<sup>4</sup>

Received: 8 February 2022 / Accepted: 10 December 2022  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2022

### Abstract

*Arbutus xalapensis* is the species of the genus with the greatest distribution in Mexico. Despite this, knowledge about its seeds and propagation is scarce. The objective of the present study was to observe the effect of storage on the germination of *A. xalapensis* seeds and the effect of pre-germination treatments on stored seeds. The seeds were stored at room temperature for a period of 24 months, and germination tests were performed at 0, 6, 12, 18 and 24 months. Four pre-germination treatments were tested on seeds previously stored for 12 and 24 months. These treatments consisted of control, immersion in gibberellic acid for 24 h, cold stratification for 30 days and a combination of cold stratification for 30 days and gibberellic acid for 24 h. The germination percentage and mean germination time (MGT) were analyzed. Germination decreased from 93 to 52% between the periods studied, reducing by approximately 10% every six months. In the MGT, an increase in the time necessary to initiate germination was observed. Pre-germination treatments with gibberellic acid reduced MGT, but no significant increase in germination was observed with the treatments. Seeds of *A. xalapensis* are sensitive to storage, losing viability and causing higher MGT. Pre-germination treatments mainly helped to reduce MGT. It is necessary to conduct further studies in order to increase knowledge of this species and the genus *Arbutus* L. in Mexico.

**Keywords** Madroño · Ericaceae · Temperate forests · Gibberellic acid · Propagation · Germination

### Introduction

Mexico has approximately 23,314 species of vascular plants, around 7,151 of which are shrubby, and 4,044 trees, mainly distributed in the temperate forests of the country (Villaseñor and Ortiz 2014; Villaseñor 2016). Despite this great floristic diversity, studies of propagation are scarce (Vázquez-Yanes et al. 2001; Bonfil and Trejo 2010; Cervantes et al. 2014). This represents a problem, since adequate information regarding the propagation of native

Extended author information available on the last page of the article

## Propagation of *Arctostaphylos pungens* Kunt from temperate forests of north-central Mexico

## Propagación de *Arctostaphylos pungens* Kunt procedente de bosques templados del centro-norte de México

Víctor M. Martínez-Calderón<sup>1</sup>; Joaquín Sosa-Ramírez<sup>2\*</sup>; Jesús M. Fuantos-Mendoza<sup>2</sup>; Diego R. Pérez-Salicrup<sup>3</sup>; J. de Jesús Luna-Ruiz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Básicas. Av. Universidad 940, Ciudad Universitaria. C. P. 20100. Aguascalientes, Aguascalientes, México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Agropecuarias. Av. Universidad 940, Ciudad Universitaria. C. P. 20100. Aguascalientes, Aguascalientes, México.

<sup>3</sup>Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad. Antigua carretera a Pátzcuaro 8701. C. P. 58190. Morelia, Michoacán, México.

\*Corresponding author: jsosar@correo.uaa.mx; tel.: +52 449 910 7400 ext. 50155.

### Abstract

**Introduction:** *Arctostaphylos pungens* Kunt is a species with significant characteristics for restoration; however, there are few studies on its propagation.

**Objective:** To evaluate the effect of pre-germinative treatments and the use of vegetative propagation methods in *A. pungens*.

**Materials and methods:** Eight pre-germinative treatments were evaluated, consisting of scarification with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98 %) for 5 and 6 h, gibberellic acid immersion (1 000 ppm), cold stratification (4 °C for 30, 60 and 90 days) and heat shock (100 °C for 5 min), as well as combinations of these. Vegetative propagation was analyzed by cuttings and air layering.

**Results and discussion:** The highest germination (73.33 ± 15.63 %) was for immersion in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 5 to 6 h; heat shock and cold stratification treatments showed low or no germination. Root formation was not achieved in cuttings but was achieved in 37.50 ± 25 % of 20-week air layering.

**Conclusion:** The best treatments consisted of immersion in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It is recommended to continue experimenting with vegetative propagation by leaving air layering for more than the 20 weeks used in this study to achieve complete root development.

**Keywords:** germination; scarification; stratification; air layering; indolbutyric acid.

### Resumen

**Introducción:** *Arctostaphylos pungens* Kunt es una especie con características relevantes para la restauración; sin embargo, hay pocos trabajos sobre su propagación.

**Objetivo:** Evaluar el efecto de tratamientos pregerminativos y el uso de métodos de propagación vegetativa en *A. pungens*.

**Materiales y métodos:** Se evaluaron ocho tratamientos pregerminativos que consistieron en escarificación con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98 %) por 5 y 6 h, inmersión en ácido giberélico (1 000 ppm), estratificación en frío (4 °C por 30, 60 y 90 días) y choque térmico (100 °C por 5 min), así como combinaciones de estos. La propagación vegetativa se evaluó por medio de esquejes y acodos aéreos.

**Resultados y discusión:** La mayor germinación (73.33 ± 15.63 %) se registró con la inmersión en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 5 a 6 h; los tratamientos con choque térmico y estratificación fría presentaron baja o nula germinación. No se consiguió formación de raíz en esquejes, pero sí en 37.50 ± 25 % de los acodos aéreos de 20 semanas.

**Conclusión:** Los mejores tratamientos consistieron en inmersión en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se recomienda seguir experimentando con la propagación vegetativa dejando los acodos aéreos por más de las 20 semanas utilizadas en este estudio, para lograr el desarrollo completo de la raíz.

**Palabras clave:** germinación; escarificación; estratificación; acodo aéreo; ácido indolbutírico.

Please cite this article as follows (APA 6): Martínez-Calderón, V. M., Sosa-Ramírez, J., Fuantos-Mendoza, J. M., Pérez-Salicrup, D. R., Luna-Ruiz, J. J. (2022). Propagation of *Arctostaphylos pungens* Kunt from temperate forests of north-central Mexico. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 28(2), 241-255. doi: 10.5154/rchscfa.2021.03.013

Received: March 3, 2021 / Accepted: March 14, 2022



[www.chapingo.mx/revistas/forestales](http://www.chapingo.mx/revistas/forestales)

## **AGRADECIMIENTOS**

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado.

Al Centro de Ciencias Agropecuarias UAA, por facilitarme las instalaciones para llevar a cabo la mayor parte de los experimentos y toma de datos, en especial al laboratorio de Análisis de Suelos, Laboratorio de Análisis de Sistemas y Recursos Naturales y al Laboratorio de Granos y Semillas.

Se Agradece al Centro de Ciencias Biológicas y a todo el equipo del Doctorado en Ciencias Biológicas por su apoyo en el proceso del doctorado.

Se agradece al propietario de Rancho Piletas en Sierra Fría, Ing. Clemente Villalobos por permitirnos realizar parte del experimento en su propiedad.

Mis más grandes agradecimientos a mi comité tutorial, a mi estimado tutor que me ha guiado durante la maestría y doctorado, el Dr. Joaquín Sosa Ramírez, y a mis estimados asesores el Dr. José de Jesús Luna Ruiz y el Dr. Diego Rafael Pérez Salicrup, por su apoyo y conocimiento que fue la base para realizar toda esta tesis a pesar de las dificultades por la pandemia.

A los biólogos Stephanie Olivares y Fabian Alejandro Rubalcava por brindar su ayuda y amistad durante el trabajo de campo como técnicos del equipo de investigación.

## **DEDICATORIA**

Esta tesis tiene una especial dedicatoria hacia mi familia que siempre ha estado conmigo...Con dedicatoria muy especial a mi madre Araceli y a mi padre César

Esta tesis va por toda la gente que me ha apoyado y creído en mi a lo largo de mi formación como investigador en las ciencias biológicas, desde la licenciatura como Biólogo, Maestro en Ciencias Agronómicas y ahora como Doctor en Ciencias Biológicas.

## INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS.....	3
INDICE DE FIGURAS .....	3
RESUMEN .....	5
ABSTRACT .....	6
CAPITULO 1. Planteamiento de investigación .....	7
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	8
JUSTIFICACIÓN .....	9
OBJETIVOS .....	10
Objetivo general:.....	10
Objetivos particulares:.....	10
HIPOTESIS.....	10
REFERENCIAS.....	11
CAPITULO II. Effect of storage and pre-germination treatments on seeds of <i>Arbutus xalapensis</i> from north-central Mexico.....	13
ABSTRACT.....	13
INTRODUCTION .....	13
MATERIALS AND METHODS.....	15
Collection of biological material.....	15
Storage effect.....	16
Pre-germination treatments. ....	17
Germination tests.....	18
Viability tests.....	18
Statistical analysis. ....	18
RESULTS .....	19
Storage effect.....	19
Effect of pre-germination treatments. ....	20
DISCUSSION .....	23
CONCLUSION.....	25
REFERENCES .....	26



CAPITULO III. Propagación de <i>Arctostaphylos pungens</i> Kunt (Ericaceae) procedente de bosques templados del centro-norte de México. ....	31
Resumen.....	31
INTRODUCCIÓN .....	31
MATERIALES Y METODOS .....	34
Colecta del material biológico.....	34
Propagación sexual.....	36
Caracterización del fruto y semilla.....	36
Germinación .....	36
Propagación asexual.....	37
Esquejes.....	37
Acodos aéreos.....	38
Análisis estadístico.....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	39
Propagación sexual.....	39
Germinación.....	39
Propagación asexual .....	43
CONCLUSIONES .....	46
REFERENCIAS.....	46
CAPITULO IV. Aplicación de estrategias de restauración.....	52
INTRODUCCIÓN .....	52
MATERIALES Y METODOS .....	53
SIEMBRA DIRECTA.....	53
Sitio de estudio.....	53
Colecta de material biológico y selección de semillas.....	54
Vivero.....	54
Campo.....	54
Variables ambientales.....	55
REFORESTACION .....	56
Sitio de estudio.....	56
Especies de estudio y diseño de reforestación.....	56

VARIABLES DE MEDICIÓN ..... 56

VARIABLES AMBIENTALES..... 57

RESULTADOS..... 57

SIEMBRA DIRECTA..... 57

REFORESTACION ..... 62

DISCUSIÓN ..... 67

CONCLUSIÓN..... 68

REFERENCIAS..... 69

CAPITULO V. CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES ..... 73

ANEXOS ..... 74

## INDICE DE TABLAS

**Table 2. 1** Morphometric data of the fruit, number of seeds and weight of newly collected seeds of *Arbutus xalapensis* Kunth from Sierra Fría, Aguascalientes, Mexico. .... 19

**Table 2. 2** Effects of storage on the germination of *Arbutus xalapensis* Kunth seeds ..... 20

**Table 2. 3** Effects of pre-germination treatments on the germination of stored seeds of *Arbutus xalapensis* Kunth..... 21

**Tabla 3. 1.** Tratamientos pre-germinativos utilizados en semillas de *A. pungens* ..... 36

**Tabla 3. 2.** Valores morfométricos de fruto y peso de semillas libres. Medias ± desviación estándar..... 39

**Tabla 3. 3.** Germinación y tiempo medio de germinación (TMG) de semillas de *Arctostaphylos pungens* sometidas a tratamientos pregerminativos. Medías ± desviación estándar..... 40

**Tabla 4.1.** Porcentajes de emergencia en vivero y campo. Medias ± desviación estándar . 57

## INDICE DE FIGURAS

**Figure 2. 1** Details of *Arbutus xalapensis* Kunth. A) Specimen in the field, B) Detail of bark, C) Ripe fruits, D) Seeds..... 16

**Figure 2. 2** Monthly temperature and relative humidity in the storage room. Mean  $\pm$  standard deviation ..... 17

**Figure 2. 3** Cumulative germination curve in *A. xalapensis* seeds with different durations of storage..... 20

**Figure 2. 4** Cumulative germination curves in stored seeds of *Arbutus xalapensis* Kunth subjected to pre-germination treatments. a) one year of storage and b) two years of storage ..... 23

**Figura 3. 1.** Detalles de *A. pungens* en campo y experimentos. A) Ejemplares en campo, B) Fruto, C) Propagación vegetativa natural, D) Semillas libres, E) semillas fusionadas, F) Formación de raíz en acodo, G) Tamaño de esqueje utilizado en experimento. .... 35

**Figura 3. 2.** Curva de germinación acumulada de los ocho tratamientos pre-germinativos 41

**Figura 4. 1.** Supervivencia de plántulas en distintos tratamientos de nodriza y protección mecánica. .... 58

**Figura 4.2.** Curvas de temperatura ambiental y precipitación presentada durante el experimento (septiembre 2020-julio 2021). .... 59

**Figura 4. 3.** Curva de porcentaje de humedad del suelo en tratamientos durante los meses de experimento. .... 60

**Figura 4.4.** Radiación fotosintéticamente Activa y Temperatura de suelo en distintas condiciones durante el mes de abril del 2021. .... 61

**Figura 4.5.** Supervivencia de plántulas en distintos tratamientos de nodriza y sol directo de *Q. eduardii* y *Q. potosina*. .... 63

**Figura 4.6.** Curvas de temperatura ambiental y precipitación presentada durante el experimento de reforestación con plántulas (julio 2021-agosto 2022)..... 64

**Figura 4.7.** Curva de porcentaje de humedad del suelo en tratamientos durante los meses de experimento. .... 65

**Figura 4.8.** Radiación fotosintéticamente Activa y Temperatura de suelo en distintas condiciones durante el mes de abril del 2022.....66



**RESUMEN**

En México los bosques templados son una parte importante de los ecosistemas del país, estos han sufrido un constante deterioro por disturbios antropogénicos. La restauración ecológica implica ayudar a la recuperación de un ecosistema que ha sido degradado, dañado o destruido, generalmente como resultado de actividades humanas. La restauración ecológica tiene el objetivo de recuperar la biodiversidad y función del ecosistema que tenía antes de la degradación, existe la restauración natural y restauración artificial. El objetivo de la presente tesis fue generar información de ayuda para restaurar ecosistemas perturbados por medio de la propagación y establecimiento de especies nativas en los bosques templados de Aguascalientes.

La tesis se estructura en cinco capítulos, el primero retoma una introducción al proyecto, la justificación, objetivos e hipótesis. En el capítulo dos se analiza el efecto del almacenamiento de las semillas forestales del madroño (*Arbutus xalapensis*). Se encontró que las semillas de *Arbutus xalapensis* pierden viabilidad por el tiempo de almacenamiento, y que el uso de tratamientos pre-germinativos probados en esta tesis no se logra reactivar las semillas, principalmente porque la semilla pierde viabilidad. El tercer capítulo se probaron métodos pre-germinativos en semillas de *Arctostaphylos pungens*, logrando subir su germinación de 0 % a 70 % por medio de escarificación con Acido Sulfurico. Se probaron métodos de propagación asexual consiguiendo enraizamiento por medio de acodos aéreos. El cuarto capítulo de la tesis aborda experimentos de reforestación por medio de semillas y plántulas de *Quercus eduardii* y *Quercus potosina*, utilizando protección por medio de nodrizas y jaulas para evitar la depredación de semillas. Se observó una mortandad del 100% por medio de ambas formas de reforestación y aún bajo la protección de las nodrizas y jaulas, la mortandad se debió principalmente por la falta de lluvias en la región y en menor medida por la depredación de plántulas. En el quinto capítulo sobre conclusiones y recomendaciones se recomienda seguir generando información para propagar especies nativas del bosque templado del ANP Sierra Fría y más importante seguir experimentado con métodos de reforestación para encontrar el que permita la mayor supervivencia, de esta forma recuperar bosques y sus beneficios para el estado de Aguascalientes.

## **ABSTRACT**

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

In Mexico, temperate forests are an important part of the country's ecosystems, they have suffered constant deterioration due to anthropogenic disturbances. Ecological restoration involves helping the recovery of an ecosystem that has been degraded, damaged or destroyed, usually as a result of human activities. The ecological restoration has the objective of recovering the biodiversity and function of the ecosystem that it had before the degradation, there is natural restoration and artificial restoration.

The thesis is structured in five chapters, the first one takes up an introduction to the project, the justification, objectives and hypothesis. In chapter two, the effect of storing forest seeds of the strawberry tree (*Arbutus xalapensis*) is analyzed. It was found that the seeds of *Arbutus xalapensis* lose viability due to storage time, and that the use of pre-germination treatments tested in this thesis fails to reactivate the seeds, mainly because the seed loses viability. The third chapter tested pre-germination methods in *Arctostaphylos pungens* seeds, managing to raise their germination from 0% to 70% by means of scarification with Sulfuric Acid. Methods of asexual propagation were tested, achieving rooting by means of air layering. The fourth chapter of the thesis deals with reforestation experiments through seeds and seedlings of *Quercus eduardii* and *Quercus potosina*, using protection by means of nurses and cages to avoid seed predation. A 100% mortality was observed through both forms of reforestation and even under the protection of the nurses and cages, the mortality was mainly due to the lack of rain in the region and to a lesser extent by the predation of seedlings. In the fifth chapter on conclusions and recommendations, it is recommended to continue generating information to propagate native species of the temperate forest of the ANP Sierra Fría and more importantly to continue experimenting with reforestation methods to find the one that allows the greatest survival, thus recovering forests and their benefits for the state of Aguascalientes.

## **CAPITULO 1. Planteamiento de investigación**

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Los bosques templados de México se encuentran, en su mayoría, en las zonas montañosas de la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental, Sierra Madre del Sur, el Eje Neovolcánico, la Sierra Norte de Oaxaca y los Altos de Chiapas, así como en serranías y montañas aisladas en el Altiplano, además entremezclados en las planicies tropicales (Challenger & Soberón, 2008). Estos bosques albergan especies endémicas de gran relevancia para la investigación científica, de alta importancia por los servicios ecosistémicos que proveen y de alto interés para la economía nacional (Sánchez et al., 2003). Los bosques de *Quercus* junto con los pinares constituyen la mayor parte de la cubierta vegetal de áreas de clima templado y semihumedo, albergando una alta diversidad florística en México (Rzedowski, 2006).

México es considerado como un país de alta riqueza florística, con 23,314 especies de plantas registradas hasta el 2016 (Villaseñor et al., 2016). Una parte importante de esta riqueza se encuentra en los bosques templados. México alberga la más alta riqueza de pinos en el planeta con 49 especies, que representan 40% de los pinos conocidos mundialmente (Gernandt & Pérez-de la Rosa, 2014). Así mismo, se encuentran 161 especies de encinos en el país, lo que convierte a México en el centro de diversidad más importante para el género *Quercus* (Valencia, 2004).

Similar a lo que ocurre en el mundo, en México se ha observado una disminución en la superficie boscosa. De 1976 a 2007 se perdieron 8806 km<sup>2</sup> de esta vegetación (Rosete-Vergés et al., 2014), lo que amenaza su conservación, ya que son ecosistemas vulnerables a disturbios antrópicos, como la extracción de madera, la ganadería e incendios forestales (Challenger, 2003; Rzedowski 2006).

A causa de lo anterior, el manejo forestal y ambiental enfrentan el reto de generar esquemas que garanticen el mantenimiento de la diversidad biológica, la conservación de la variabilidad genética y de ecosistemas así como todas las funciones ecológicas, antes de que el deterioro continúe aumentando por causas antropogénicas (Aguirre-Calderón, 1997; Carabias et al., 2007). Una solución relativamente simple es a través de la reintroducción de especies nativas: resiembras de pastizales, trasplantes de arbustivas o reforestación en áreas

boscosas (Melgoza et al., 2007). Es conveniente elegir las especies de la región que mejor se adapten a las condiciones actuales del ecosistema en cuanto a suelo, clima, topografía, disponibilidad de agua, vegetación natural y los objetivos de la plantación, entre otras, seleccionando aquellas con posibilidades de cubrir más rápidamente las superficies desprovistas de vegetación (Comisión Nacional Forestal [CONAFOR] 2010). No obstante, a fin de fundamentar medidas y prácticas para la conservación, restauración y aprovechamiento racional, es necesario aumentar el conocimiento ecológico y biológico, generando información aplicable para la restauración ecológica, siendo una disciplina emergente en México (Calva & Pavón, 2018).

En el estado de Aguascalientes la vegetación de clima templado cubre el 30.48 % de su superficie total, siendo los bosques mixtos y de encino los más abundantes, gran parte de ellos en el ANP Sierra Fría (Siqueiros et al., 2016). Estos bosques templados han estado sujetos a actividades antrópicas a lo largo de su historia, principalmente ocurridas a principios del siglo pasado, sobre todo en las zonas accesibles, causando un cambio en la vegetación dejando parches desprovistos de cobertura (Minnich et al., 1994; Chapa-Bezanilla et al., 2008). Aunque la mayoría de los parches han experimentado una recuperación de cobertura vegetal, el desplazamiento de bosques que se cree que originalmente eran de encino (*Quercus* spp.) y pino (*Pine* spp.), y la colonización de estos sitios por las comunidades de *Juniperus deppeana* y *Arctostaphylos pungens* pueden reducir la disponibilidad de hábitat y alimentos para la fauna que depende de las coníferas y encinos, como el búho punteado, pavo salvaje y el venado cola blanca. Además, parches con cobertura vegetal menor al 10% no han presentado recuperación, lo que haría necesario pensar en técnicas de restauración activa (Díaz-Nuñez et al., 2016).

Díaz-Nuñez et al., (2016) sugieren realizar investigaciones para entender porque los pinos y encinos no han recuperado dominio, evaluando si el dominio de *Juniperus deppeana* y *Arctostaphylos pungens* inhibe el establecimiento y la supervivencia de las plántulas de pino y encino. De la misma manera evaluar el impacto del ganado en el establecimiento del pino y encino

## **JUSTIFICACIÓN**



La restauración ecológica al ser una disciplina emergente en México, cuenta con relativamente pocos trabajos que brinden información útil para llevar a cabo proyectos exitosos, siendo necesario generar información ecológica, productiva y de acciones de restauración. Aunque en el estado de Aguascalientes se han desarrollado trabajos ecológicos sobre los bosques templados, existen pocos trabajos que brinden información sobre la propagación de las plantas nativas presentes en sus bosques templados, de la misma manera que en el resto del país no se cuenta con estudios que nos permitan establecer reforestaciones exitosas, siendo uno de los estados donde menos se ha abordado esta problemática cada día más necesaria de resolver.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

Restaurar ecosistemas perturbados por medio de la propagación y establecimiento de especies nativas en los bosques templados de Aguascalientes.

### **Objetivos particulares:**

- Evaluar la germinación y número de semillas extraídas por fruto de dos especies de bosque templado (*Arbutus xalapensis* y *A. pungens*), así como la propagación asexual de *A. pungens*.
- Aplicar estrategias de restauración por medio de reforestación en sitios de poca cobertura arbóreo-arbustiva con especies nativas y siembra directa de especies de *Quercus* en cielo abierto y vegetación secundaria dominada por *A. pungens* y *J. deppeana*.

## **HIPOTESIS**

1. El tiempo de almacenamiento afecta la germinación *A. xalapensis* y los tratamientos pre-germinativos pueden ayudar a mejorar su germinación. Las semillas de *A. pungens* requieren tratamientos pre-germinativos que degraden su testa o las

despierten de su dormancia, así mismo la propagación asexual puede ser una alternativa para esta especie que presentan semillas con baja germinación.

2. El nodrizaje con especies arbustivas pioneras y la protección mecánica contra la depredación aumenta la supervivencia en reforestaciones. Estas especies pioneras (Táscate y Manzanita) no necesitan nodriza, las especies de encinos requieren nodriza para establecerse. Estamos considerando semillas (germinación) y plántulas (establecimiento).

## REFERENCIAS

- Aguirre-Calderón, O. (1997). Hacia el manejo de ecosistemas forestales. *Madera y Bosques*, 3(2), 3-11.
- Calva-Soto, K., & Pavón, N. P. (2018). La restauración ecológica en México: una disciplina emergente en un país deteriorado. *Madera y Bosques*, 24(1), 2411135. doi: 10.21829/myb.2018.2411135
- Carabias, J., Arriaga, V., & Cervantes-Gutiérrez, V. (2007). Las políticas públicas de la restauración ambiental en México: limitantes, avances, rezagos y retos. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 80(Suplemento), 85-100. doi:10.17129/botsci.1759
- Comisión Nacional Forestal. México [CONAFOR]. (2010). *Prácticas de reforestación. Manual básico*. Jalisco, México. Autor.
- Chapa-Bezanilla D., J. Sosa-Ramírez y A. de Alba-Ávila. 2008. Estudio multitemporal de fragmentación de los bosques en la Sierra Fría, Aguascalientes, México. *Madera y Bosques* 14:37-51.
- Challenger, A. 2003. Conceptos generales acerca de los ecosistemas templados de montaña de México y su estado de conservación. En: Sánchez, Ó., E. Vega, E. Peters, y O. Monroy-Vilchis. Conservación de ecosistemas templados de montaña en México. Instituto Nacional de Ecología (INE, SEMARNAT)/SyG. Ciudad de México. 316 pp.

- Díaz-Núñez, V., Sosa-Ramírez, J., & Pérez-Salicrup, D. R. (2016). Vegetation patch dynamics and tree diversity in a conifer and oak forest in central Mexico. *Botanical Sciences*, 94(2), 229–240.
- Minnich, R. A., J. Sosa Ramírez, V. E. Franco, W. J. Barry y M. E. Siqueiros. 1994. Reconocimiento preliminar de la vegetación y de los impactos de las actividades humanas en la Sierra Fría, Aguascalientes, México. *Investigación y Ciencia*, UAA, 12:23-29.
- Challenger, A y J. Soberón, 2008. Los ecosistemas terrestres de México. En: *Capital natural de México*, Vol. I. conocimiento actual de la biodiversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento de la Biodiversidad-CONABIO. Ciudad de México, México. 87-108 pp.
- Rosete-Vergés, F. A., J. L. Pérez-Damián, M. Villalobos-Delgado, E. N. Navarro-Salas, E. Salinas-Chávez, y R. Remond-Noa. 2014. El avance de la deforestación en México 1976-2007. *Madera y Bosques* **20(1): 21-35**.
- Rzedowski, J. 2006. Vegetación de México. Ciudad de México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Recuperado de <http://www.biodiversidad.gob.mx>
- Valencia, A.S. 2004. Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 75: 33-53.
- Villaseñor, J. L. 2016. Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87: 559-902.

## **CAPITULO II. Effect of storage and pre-germination treatments on seeds of *Arbutus xalapensis* from north-central Mexico.**

### **ABSTRACT**

*Arbutus xalapensis* is the species of the genus with the greatest distribution in Mexico. Despite this, knowledge about its seeds and propagation is scarce. The objective of the present study was to observe the effect of storage on the germination of *A. xalapensis* seeds and the effect of pre-germination treatments on stored seeds. The seeds were stored at room temperature for a period of 24 months, and germination tests were performed at 0, 6, 12, 18 and 24 months. Four pre-germination treatments were tested on seeds previously stored for 12 and 24 months. These treatments consisted of control, immersion in gibberellic acid for 24 h, cold stratification for 30 days and a combination of cold stratification for 30 days and gibberellic acid for 24 h. The germination percentage and mean germination time (MGT) were analyzed. Germination decreased from 93% to 52% between the periods studied, reducing by approximately 10% every six months. In the MGT, an increase in the time necessary to initiate germination was observed. Pre-germination treatments with gibberellic acid reduced MGT, but no significant increase in germination was observed with the treatments. Seeds of *A. xalapensis* are sensitive to storage, losing viability and causing higher MGT. Pre-germination treatments mainly helped to reduce MGT. It is necessary to conduct further studies in order to increase knowledge of this species and the genus *Arbutus* L. in Mexico.

**Keywords:** Madroño, Ericaceae, temperate forests, gibberellic acid, propagation, germination.

### **INTRODUCTION**

Mexico has approximately 23,314 species of vascular plants, around 7,151 of which are shrubby, and 4,044 trees, mainly distributed in the temperate forests of the country (Villaseñor and Ortiz 2014; Villaseñor 2016). Despite this great floristic diversity, studies of propagation are scarce (Vázquez-Yanes et al. 2001; Bonfil and Trejo 2010; Cervantes et al. 2014). This represents a problem, since adequate information regarding the propagation of

native flora is essential to the success of projects of conservation, restoration, and reintroduction of species (Vázquez-Yanes et al. 2001; Bonfil and Trejo 2010; Núñez-Cruz et al. 2018). Mexico is considered to present problems of environmental deterioration, and restoration of its ecosystems is therefore required (Calva-Soto and Pavón, 2018).

The effect of storage time on seeds varies according to species and seed type (orthodox or recalcitrant), as well as the storage conditions. In some cases, storage of long duration can cause a reduction in the subsequent percentage of germination (Pasquini and Defossé, 2012; Bertsouklis and Papafotiou 2013; Cervantes et al. 2014; Ríos García et al. 2018), which directly affects the production of seedlings required for reforestation of degraded sites. However, the use of pre-germination treatments can to some degree mitigate these reduced percentages in stored seeds (Pasquini and Defossé 2012; Bertsouklis and Papafotiou 2013).

Temporal changes in seed germination in different species have rarely been studied (Cervantes et al. 2014). In the case of species from temperate ecosystems, there is usually a scarcity of available information. The *Quercus* L. has been the genus mainly addressed, due to the inherent storage difficulty of its recalcitrant seeds (Zavala-Chávez 2004; Díaz-Pontones and Reyes-Jaramillo 2009), but there remains insufficient information for other genera in the country. Most forest nurseries in Mexico are rural and lack facilities for the adequate storage of seeds. Storage is therefore commonly conducted at room temperature in cans or glass jars. This necessitates the generation of information regarding the effects of storage on seed germination that could allow improved management of germplasm under low-tech conditions (Cervantes et al. 2014).

The Ericaceae family is one of great ecological, ethnobotanic and economic importance in the mountainous areas of Mexico, since various species are used for medicinal and food purposes, as well as having considerable potential value as ornamentals (González-Elizondo et al. 2004; García-Regalado 2014; González-Elizondo and González-Elizondo 2014). The genus *Arbutus* L. is an important component of temperate climate forests, comprising approximately 12 known species in the world, seven of which are distributed in Mexico. Five of these seven species are endemic to the country (González-Elizondo and González-Elizondo 2014); however, it remains a poorly studied genus despite its importance and high diversity at the national level.

*Arbutus xalapensis* Kunth is the most variable and widely distributed species of the genus; its distribution area extends from the southwestern United States to Honduras and El Salvador. It is found in tropical montane cloud, humid oak, pine, pine-oak, cedar, oak and fir forests, as well as in secondary vegetation derived from pine-oak forest at 1600 – 3000 m asl in elevation (González-Elizondo and González-Elizondo 2014). This species has barely been studied and aspects such as its reproduction and propagation are unknown, apart from the effect of fruit ripening in relation to its germination (Tovar-Rocha et al. 2014). On the other hand, the effect of seed storage and how it can affect subsequent germination of the species has never been studied. This information would be important for its production in forest nurseries and use in restoration, reintroduction and conservation programs.

The objective of this study was therefore to observe the effect of storage on the germination of *A. xalapensis* seeds and the effect of pre-germination treatments on seeds with storage. The hypothesis is that *A. xalapensis* seeds will be affected by the storage period, producing a reduced percentage of germination, and that pre-germination treatments will help to increase germination in seeds that have undergone a period of storage.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Collection of biological material.** Ripe fruits of red and orange coloration were collected (Fig. 2. 1: Tovar Rocha et al. 2014). The fruits were taken directly from the canopy of 15 adult specimens of *A. xalapensis*, 7 - 9.5 m in height and 20 - 35 cm in diameter at breast height (DBH). Collection was conducted within two sites of the “Monte Grande” communal property (22°16'14.46"N, 102°37'0.15"W, 2890 m asl and 22°16'42.13"N, 102°36'28.37"W, 2950 m asl) within the Sierra Fría Protected Natural Area, in the state of Aguascalientes, Mexico. The collection site is in an oak forest site with an abundance of specimens of the study species (Martínez-Calderón et al. 2021). Fruit collection was completed at the beginning of October 2019.

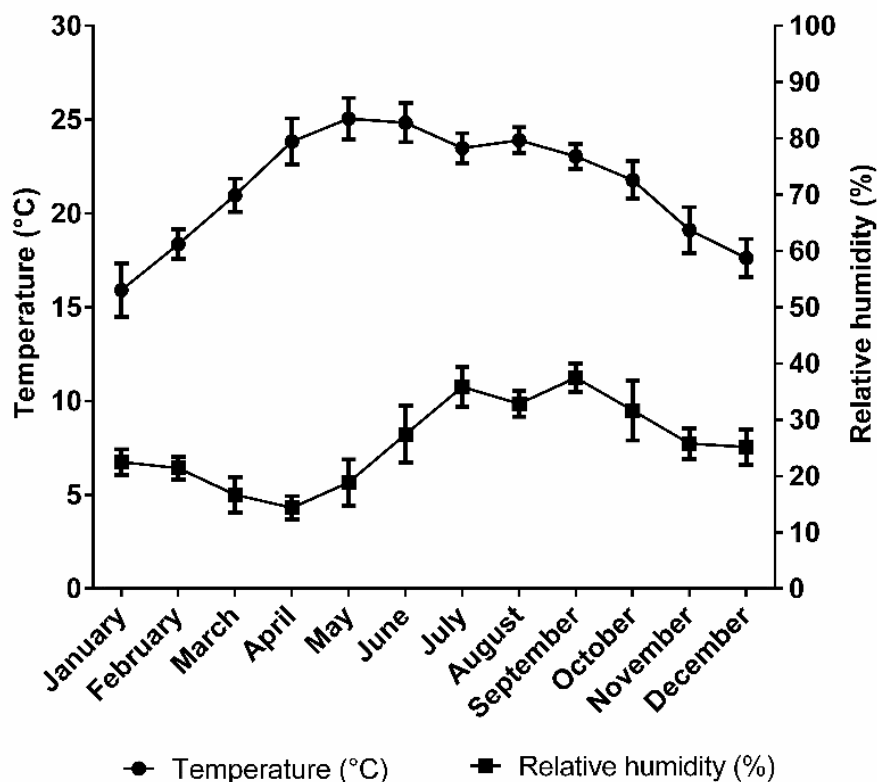


**Figure 2. 1** Details of *Arbutus xalapensis* Kunth. A) Specimen in the field, B) Detail of bark, C) Ripe fruits, D) Seeds.

To obtain morphometric information on the fruits, as well as the number of seeds they contain, a random sample of 100 fruits was taken, and width and height measured using a digital vernier (Surtek 122200). The fruits were weighed on an analytical balance (Precisa XT220A) and the seeds manually extracted from each fruit for quantification (Martínez-Calderón et al. 2020). To obtain the weight of the seeds, 10 replicates of 100 seeds (n=1000) were weighed using an analytical balance (Apodaca-Martínez et al. 2019).

**Storage effect.** To observe the effect of storage on seed germination, the seeds were stored in glass jars with hermetic caps at room temperature (Cervantes et al. 2014) (Fig. 2. 2). Only seeds that sank in an immersion test once separated from the fruit ( $\approx 95$  % of the total) were

stored, assuming these seeds to be viable. To evaluate changes in germination over time, seed germination was measured after 0, 6, 12, 18 and 24 months of storage (Cervantes et al. 2014). The first germination test was carried out one week after collection, and these seeds were considered the control of 0 months of storage.



**Figure 2. 2** Monthly temperature and relative humidity in the storage room. Mean  $\pm$  standard deviation

**Pre-germination treatments.** To break possible dormancy caused by seed storage (Bertsouklis and Papafotiou 2013), the following four pre-germination treatments were used on seeds with 12 and 24 months of storage: 1) Control, 2) immersion in 500 ppm of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) for 24 h, 3) cold stratification for 30 days and 4) cold stratification for 30 days plus immersion in 500 ppm of GA<sub>3</sub> for 24 h. For cold stratification, the seeds were placed in paper envelopes and stored in a refrigerator at 4 °C. These pre-germination treatments have been used in *Arbutus* species, obtaining an increase in germination of seeds with apparent physiological dormancy (Bertsouklis and Papafotiou 2013; Smiris et al. 2006; Pipinis et al. 2017; Tilki 2004). Only storage times of 12 and 24 months (October) were used since this would allow the use of stored seeds to propagate plants with a long production



cycle (9 months), a practice that is commonly employed to produce temperate forest species for restoration purposes in Mexico (De Jesús-Albino et al. 2021; Muñoz et al. 2015).

**Germination tests.** Four replicates of 50 seeds (n=200) were used, with 95 x 15 mm Petri dishes utilized as the experimental unit (Narbona et al. 2003). Prior to planting, the seeds were washed with 10% commercial chlorine for three minutes then placed in Petri dishes on brown paper and cotton. Petri dishes were prepared by first placing a layer of cotton, then brown paper was placed on the cotton previously moistened with 5 ml of distilled water. The fungicide Interguzan 30-30® (12 g/l) was added to the seeds to prevent fungal attack (Martínez-Calderón et al. 2020). The Petri dishes with seeds were maintained at a temperature of 23-25 °C with a photoperiod of eight hours ( $5.67 \pm 2.69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) for a period of 30 days (Tovar-Rocha et al. 2014; Pipinis et al. 2017). Germination was measured every two days, extracting the germinated seeds to facilitate quantification.

At the end of the germination tests, germination percentage and mean germination time (MGT) were measured (Edmond and Drapala 1958):

$$MGT = \frac{\sum XiTi}{\sum Xi}$$

Where Xi is the number of germinated seeds per observation and Ti is the number of days elapsed since sowing.

**Viability tests.** At the end of the testing period (25 months), the physical integrity of the seeds was checked, and viability tests were carried out by immersion in water and a tetrazolium test. To check the physical integrity, longitudinal cuts were made in the seeds in order to verify that the embryo, endosperm and testa were undamaged. The tetrazolium test consisted of a prior 24 h immersion in 1% tetrazolium chloride at 23-25 °C in darkness. Subsequent longitudinal cuts were made using a scalpel, and half of the seed was separated and left immersed in 1% tetrazolium chloride for 2 h. The seed was considered viable when staining of the embryo and part of the endosperm was detected. For the three tests, four replicates of 25 seeds were used (Apodaca-Martínez et al. 2019).

**Statistical analysis.** Means and standard deviations (SD) were calculated from the size and weight values obtained from the 100 fruits and 100 seeds weighed, as well as the germination data. To evaluate the effect of storage and pre-germination treatments on germination, the

percentage values were transformed into proportion values (0 to 1) and subsequently transformed by means of the *Arc sin* function in order to comply with the assumption of normality. Similarly, the MGT was transformed by square root when required. A one-way ANOVA analysis and a comparison of means using the Tukey method ( $p < 0.05$ ) were then performed. These analyses were carried out using the InfoStat program (Di-Rienzo et al 2020).

## RESULTS

The fruits were 10.15 in width and 6.96 mm in length and contained an average of 13 seeds. The seeds are very small in size, with a recorded fresh weight of 0.110 g per 100 seeds (Table 1).

**Table 2. 1** Morphometric data of the fruit, number of seeds and weight of newly collected seeds of *Arbutus xalapensis* Kunth from Sierra Fría, Aguascalientes, Mexico.

Fruit				Seed
Width (mm)	Length (mm)	Weight (g)	Number of seeds	Weight of 100 seeds (g)
10.15 ± 1.37	6.96 ± 1.19	0.48 ± 0.18	13.29 ± 7.47	0.110 ± 0.004

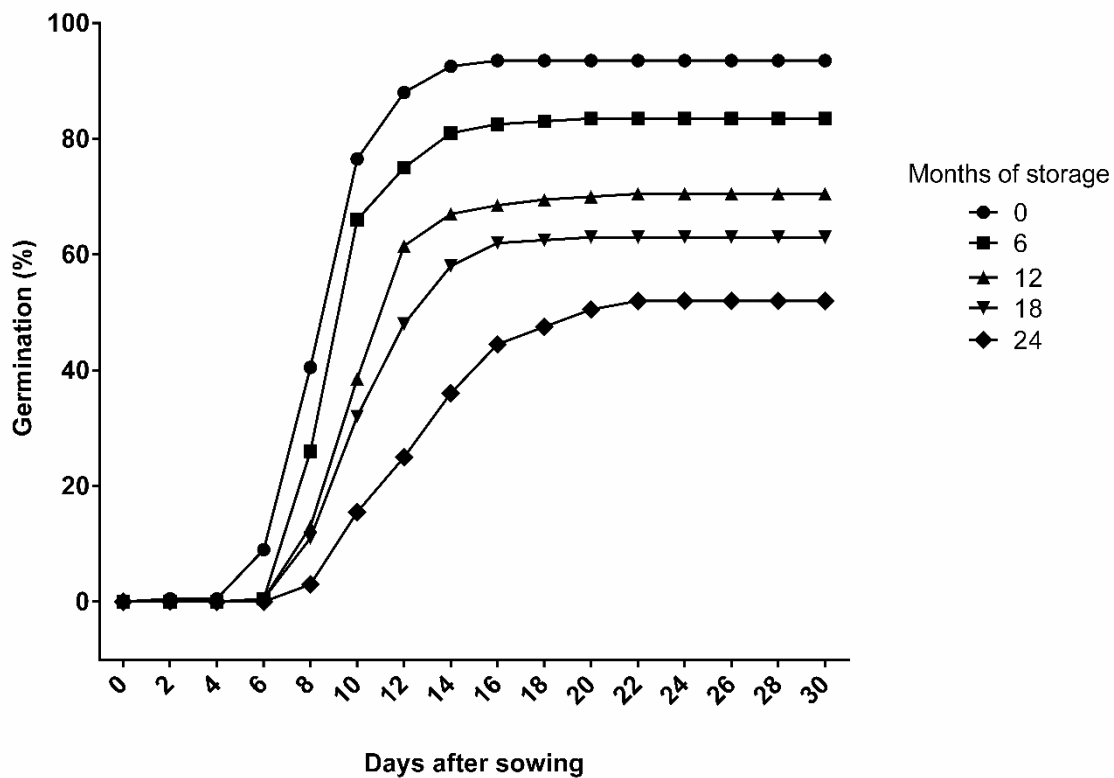
\* Means ± standard deviation.

**Storage effect.** There were significant differences in the percentage of germination ( $F_{4, 15} = 44.82$ ;  $p < 0.001$ ) and MGT ( $F_{4, 15} = 17.19$ ;  $p < 0.0001$ ) among the different storage times studied (Table 2). A reduction in the germination percentage of approximately 10% is observed every six months (Table 2. 2; Fig. 3. 3). Germination decreased by 41.5% in the 24 months of storage. The MGT was affected by storage time, extending the time taken for germination from 9.42 to 13.52 days (Table 2. 2; Fig. 2. 3). In the seeds, weight loss was observed at 24 months relative to that of freshly collected seeds, in which a weight of  $0.0714 \pm 0.0008$  g per 100 seeds was observed.

**Table 2. 2** Effects of storage on the germination of *Arbutus xalapensis* Kunth seeds

Storage time	Germination (%)	MGT (days)
0 months	93.5 ± 1 <sup>a</sup>	9.42 ± 0.22 <sup>c</sup>
6 months	83.5 ± 7.90 <sup>b</sup>	10.12 ± 0.52 <sup>bc</sup>
12 months	70.5 ± 5.74 <sup>c</sup>	10.97 ± 0.11 <sup>b</sup>
18 months	63 ± 3.46 <sup>cd</sup>	11.30 ± 0.52 <sup>b</sup>
24 months	52 ± 2.83 <sup>d</sup>	13.52 ± 1.62 <sup>a</sup>

\* Means ± standard deviation. MGT: Mean germination time expressed in days. Within columns, means that share a lower-case letter do not differ significantly ( $p < 0.05$ ).



**Figure 2. 3** Cumulative germination curve in *A. xalapensis* seeds with different durations of storage

**Effect of pre-germination treatments.** The percentage of germination in seeds stored for 12 months that were subjected to pre-germination treatments differs significantly ( $F_{3, 12} =$

4.41;  $p = 0.0262$ ). Among the pre-germination treatments themselves (Immersion in 500 ppm of GA<sub>3</sub> x 24 h, cold 30 days and cold 30 days + 500 ppm of GA<sub>3</sub> x 24h), however, there were no significant differences in the percentage of germination. The control only differed significantly from the treatment of cold 30 days + 500 ppm of GA<sub>3</sub> x 24h (Table 3).

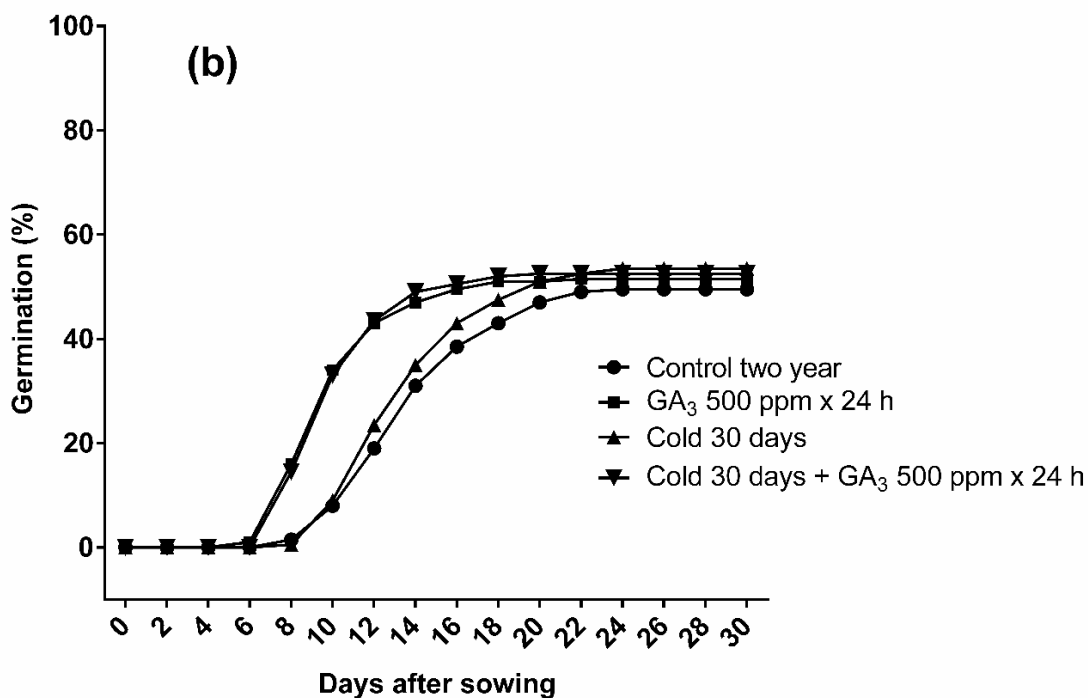
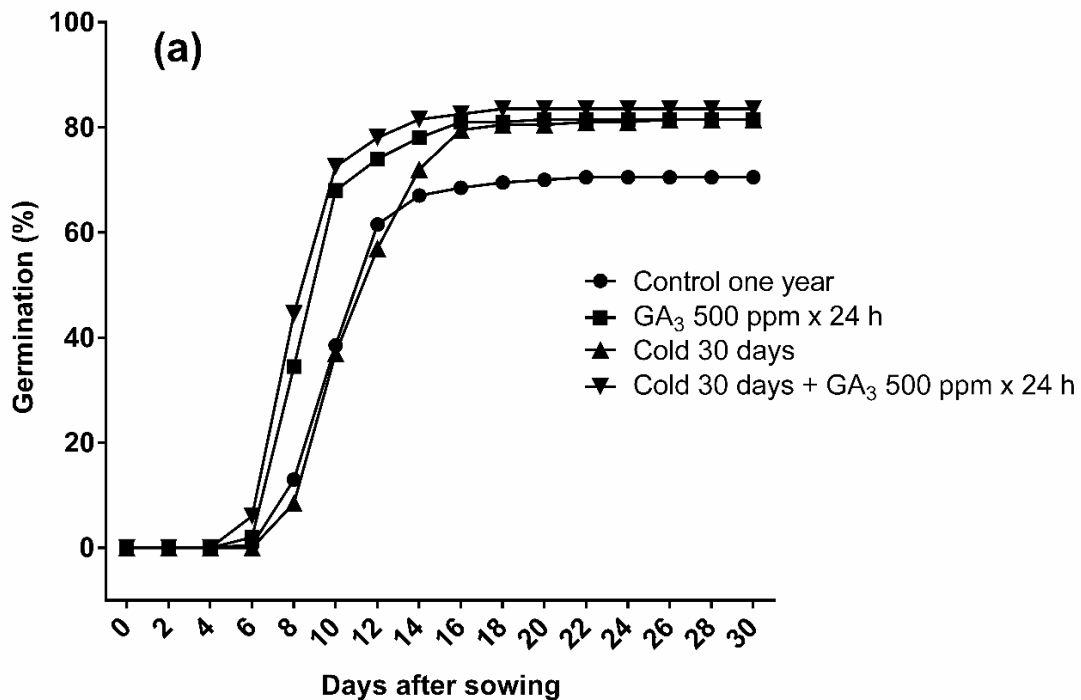
The MGT at 12 months also presented significant differences ( $F_{3, 12} = 118.93$ ;  $p < 0.0001$ ) (Table 3). All treatments were statistically different. The treatment that required the lowest MGT was cold 30 days + 500 ppm of GA<sub>3</sub> x 24h, while the cold 30 days treatment had the longest MGT, followed by the control treatment. Germination began from days 6 and 8, with maximum germination on day 16 in most treatments (Fig. 2. 4 a).

At 24 months of storage, the pre-germination treatments presented no significant differences in germination ( $F_{3, 12} = 0.34$ ;  $p = 0.7968$ ), but did in the MGT ( $F_{3, 12} = 33.17$ ;  $p < 0.0001$ ). The treatments with GA<sub>3</sub> produced the lowest MGT, presenting differences with respect to the control and cold treatments for 30 days (Table 2. 3). Germination began from days 6 and 8, with maximum germination recorded on days 18 and 20 in most treatments (Fig. 2. 4 b).

**Table 2. 3** Effects of pre-germination treatments on the germination of stored seeds of *Arbutus xalapensis* Kunth

Storage time	Treatment	Germination (%)	MGT (days)
12 months	Control	70.5 ± 5.74 <sup>b</sup>	10.97 ± 0.11 <sup>b</sup>
	Immersion in 500 ppm of GA <sub>3</sub> x 24 h	81.5 ± 3 <sup>a b</sup>	9.73 ± 0.21 <sup>c</sup>
	Cold 30 days	81.5 ± 3.42 <sup>a b</sup>	11.82 ± 0.25 <sup>a</sup>
	Cold 30 days + 500 ppm of GA <sub>3</sub> x 24h.	83.5 ± 8.06 <sup>a</sup>	9.26 ± 0.26 <sup>d</sup>
24 months	Control	49.50 ± 7.55 <sup>a</sup>	14.47 ± 1.15 <sup>b</sup>
	Immersion in 500 ppm of GA <sub>3</sub> x 24 h	51.50 ± 5.74 <sup>a</sup>	10.63 ± 0.66 <sup>a</sup>
	Cold 30 days	53.50 ± 4.43 <sup>a</sup>	14.20 ± 0.21 <sup>b</sup>
	Cold 30 days + 500 ppm of GA <sub>3</sub> x 24h.	52.50 ± 5.26 <sup>a</sup>	10.75 ± 0.62 <sup>a</sup>

\* Means  $\pm$  standard deviation. MGT: Mean germination time expressed in days. Within columns, means that share a lower-case letter do not differ significantly ( $p < 0.05$ ).



**Figure 2. 4** Cumulative germination curves in stored seeds of *Arbutus xalapensis* Kunth subjected to pre-germination treatments. a) one year of storage and b) two years of storage

In the viability tests carried out at the end of the evaluation period, the seeds presented 100 % physical integrity in the testa, endosperm, and embryo, with no damage apparent. A mean viability value of  $99 \pm 2\%$  was obtained in the immersion test, and  $52 \pm 7.30\%$  in the tetrazolium test.

## DISCUSSION

In terms of size, the fruits of *A. xalapensis* collected in this study coincide with that previously reported (González-Elizondo and González-Elizondo 2014), and present a diameter similar to that reported by Tovar-Rocha et al. (2014) in individuals of Michoacán, although with a lower weight. The number of seeds per fruit is greater than that reported in other sources (Niembro-Rocas et al. 2010), and further study is therefore necessary in the fruits and seeds of *A. xalapensis*, and in the genus *Arbutus* in general, in order to improve our knowledge regarding the seeds of its species in Mexico. Given that *A. xalapensis* is the species with the greatest distribution and morphological variation within the genus (González-Elizondo and González-Elizondo 2014), the species can present variation in the size of fruits, and number and weight of seeds, as well as in germination according to distribution zone and accession (Cervantes et al. 2014; Pozo-Gómez et al. 2019).

Tovar-Rocha et al. (2014) report fruit collection during May and June, while in the present study collection took place at the beginning of October. This could imply variation between populations, but there is a lack of phenological knowledge regarding the species, which precludes the drawing of real comparisons, since the species may have more than one fruiting season. Information pertaining to fructification, number of seeds per fruit and seed weight is of value to the production of this species in the nursery. The small seeds of *A. xalapensis* make their management a challenge. In these cases, the use of seed pelleting could be recommended in order to facilitate their management in the nursery.

Freshly collected seeds of *Arbutus xalapensis* present a high percentage of germination, particularly during the first year of storage. The germination obtained in this study was higher than that reported by Tovar-Rocha et al. (2014), where percentages of between 76% are

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

reported in seeds from mature fruits. Likewise, higher germination was presented compared to other species of the genus with distribution in Europe such as *Arbutus unedo* L. and *Arbutus andrachne* L., where germination values of 40.5% and 30%, respectively, are reported when germinated at temperatures similar to those used in the present study (Narbona et al. 2003; Bertsouklis and Papafotiou 2013).

Germination decreased as a consequence of storage, as has been reported for various species and, in some cases, viability is lost and the seeds no longer germinate (Bertsouklis and Papafotiou 2013; Cervantes et al. 2014; Becerra-Vázquez et al. 2018). Although the seeds showed a reduction in germination, *A. xalapensis* had greater longevity than that observed for other species of the genus such as *A. unedo* and *A. andrachne*. These latter two species do not present germination at 11 months unless subjected to pre-germination treatments and, after 24 months, their recorded germination is nil (Bertsouklis and Papafotiou 2013). The loss of viability of the seed depends, in part, on the orthodox or recalcitrant nature of the seeds, with the latter being sensitive to moisture loss, as is the case with species of the genus *Quercus* (Zavala-Chávez 2004), which share their habitat with the genus *Arbutus*. This could have occurred with the seeds of *A. xalapensis*, since weight loss of the seeds was observed with respect to storage time at 24 months, and they may have lost moisture and thus viability, which could indicate that they present some degree of recalcitrance.

Another reason for the loss of germination capacity is the storage conditions themselves, which can directly affect the seed conservation (Cervantes et al. 2014; Becerra-Vázquez et al. 2018). In the study site, the predominant climate is temperate semi-dry (Siqueiros-Delgado et al. 2016), implying that conditions are usually drier, which favors seed conservation in some species. This is because their seeds can remain viable for several years when stored at low temperatures and in a dry place (Bonner 2008; Pritchard and Nadarajan 2008). Even when the seeds maintain a good germination capacity at room temperature, it is recommended to carry out studies in which they are stored at lower temperatures in order to determine whether their viability can be prolonged, as has been reported in other species (Becerra-Vázquez et al. 2018).

The pre-germination treatments in *A. xalapensis* increased its germination by only 10% in seeds with 12 months of storage while no significant differences were observed with respect

to the control in seeds with 24 months of storage. It has been stated that seeds can enter dormancy due to storage time, preventing germination from taking place. When this occurs, pre-germination treatments that focus on breaking physiological dormancy can be used (Bertsouklis and Papafotiou, 2013). Physiological dormancy has been observed in other species of *Arbutus*, and can be broken by pre-germination treatments in order to recover germination (Smiris et al. 2006; Bertsouklis and Papafotiou 2013; Pipinis et al. 2017). According to the results obtained and that described above, the lack of germination in *A. xalapensis* could be due to a loss of viability caused by storage rather than the formation of physiological dormancy as in European species; e.g., the case of *Arbutus unedo*. This is confirmed by the tetrazolium test, which produced a percentage of viability similar to that found in the germination tests on seeds with 24 months of storage. The tetrazolium test works by detecting cellular respiration by the embryo through selective staining of tissues that present cellular respiration (Flechas-Bejarano and Medina-Rivera 2021).

The MGT increased according to the storage time. This behavior has been observed in seeds of tropical tree species in the country, although the variable is dependent on the species, storage conditions, batches and years of collection, as well as the physical integrity of the seed (Becerra-Vázquez et al. 2018; Ríos García et al. 2018). Despite the effect of storage on the MGT, this parameter was reduced in the treatments that involved prior immersion in GA<sub>3</sub>. This could be because GA<sub>3</sub> is a hormone that stimulates cell division and germination in seeds, thus replacing normally required external stimuli such as temperature and light (García-Martínez and Gil 2002; Baskin and Baskin 2004). This has been observed in other studies in which this hormone is used to stimulate germination (Tilki 2004; Smiris et al. 2006; Pipinis et al. 2017). Another reason for the reduced MGT could be the form of application of the hormone. Immersion of the seed stimulated germination, initiating the imbibition process of the seed, since the seeds of the *Arbutus* genus appear to have permeable coats.

## **CONCLUSION**

The germination percentage of *A. xalapensis* and the time necessary for initiation of germination of its seeds are both affected by storage time. The pre-germination treatments used in this study mainly helped to reduce the time necessary for germination to take place, since the seeds themselves do not appear to present physiological dormancy. It is



recommended to use seeds within less than one year of collection in order to obtain a high germination percentage (> 80%), and to conduct studies in which seeds are stored at lower temperatures and in more hermetic conditions in order to accurately determine whether their viability can be prolonged.

It is also necessary to continue research into the species, its seeds, phenology, natural regeneration and cultivation. As with the other species of the genus *Arbutus* in Mexico, knowledge about *A. xalapensis* remains scarce despite its wide distribution.

## REFERENCES

- Apodaca-Martínez M, Cetina Alcalá VM, Jasso-Mata J, López-López MÁ, González-Rosas H, Uscanga-Mortera E, García-Esteva A (2019) Ruptura de la latencia física y germinación de semillas de *Chiranthodendron pentadactylon* (Malvaceae). *Botanical Sciences* 97(2): 211. <https://doi.org/10.17129/botsci.2094>
- Baskin JM, Baskin CC (2004) A classification system for seed dormancy. *Seeds Science Research* 14:1-17.
- Becerra-Vázquez ÁG, Sánchez-Nieto S, Coates R, Flores-Ortiz CM, Orozco-Segovia A (2018). Seed Longevity of Five Tropical Species From South-Eastern Mexico: Changes in Seed Germination During Storage. *Tropical Conservation Science* 11. <https://doi.org/10.1177/1940082918779489>
- Bertsouklis KF, Papafotiou M (2013) Seed germination of *Arbutus unedo*, *A. andrachne* and their natural hybrid *A. andrachnoides* in relation to temperature and period of storage. *HortScience* 48(3): 347–351. <https://doi.org/10.21273/hortsci.48.3.347>
- Bonfil C, Trejo I (2010) Plant Propagation and the Ecological Restoration of Mexican Tropical Deciduous Forests. *Ecological Restoration* 28(3): 369-376. <https://doi.org/10.3368/er.28.3.369>
- Bonner FT (2008) Storage of seed. In: Bonner FT, Karrfalt RP (eds) *The woody plant seed manual agriculture Handbook 727*. Department of Agriculture Forest Service, Washington DC, pp 85-96.

- Calva-Soto K, Pavón NP (2018) Ecological restoration in México: An emerging discipline in a deteriorated country. *Madera y Bosques* 24(1): 2411135. doi: 10.21829/myb.2018.2411135
- Cervantes M, Ceccon E, Bonfil C (2014) Germination of stored seeds of four tree species from the tropical dry forest of Morelos, Mexico. *Botanical Sciences* 92(2): 281–287. <https://doi.org/10.17129/botsci.96>
- De Jesús-Albino F, Hernández RI, Trejo D, Caballero LM (2021) *Quercus rugosa* Née seedling quality in a forest nursery. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 12(67): 147–167. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v12i67.967>
- Díaz-Pontones D, Reyes-Jaramillo I (2009) Producción y almacenamiento de bellotas de *Quercus hintonii* Warburg (Fagaceae) de la Depresión del Balsas, México. *Polibotánica* 27: 131–143.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2020) InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Edmond JB & Drapala WJ (1958) The effect of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. *Proceeding of the American Society for Horticultural Science* 71: 428–434.4
- Flechas-Bejarano N, Medina-Rivera R (2021) Efecto del almacenamiento en la viabilidad, germinación y vigor de semillas de *Coffea arabica* L. *Revista Cenicafé* 72(2): e72206. <https://doi.org/10.38141/10778/72206>
- García-Martínez JL, Gil J (2002) Light regulation of gibberellin biosynthesis and mode of action. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 354–368. <https://doi.org/10.1007/s003440010033>
- González-Elizondo MS, González-Elizondo M (2014) Flora del Bajío y de regiones adyacentes. fasciculo Ericaceae. In Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología, A.C.

- González-Elizondo M, López-Enriquez IL, González-Elizondo MS, Tena-Flores JA (2004) Plantas Medicinales del Estado de Durango y Zonas Aledañas. Instituto Politécnico Nacional CIIDIR Durango, Durango.
- García-Regalado G (2014) Plantas Medicinales de Aguascalientes. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes.
- Martínez-Calderón VM, Sosa-Ramírez J, Siqueiros-Delgado ME, Díaz-Núñez V (2021) Composición, diversidad y estructura de especies leñosas en los bosques templados de Monte Grande, Sierra Fría, Aguascalientes, México. *Acta Botanica Mexicana* 128: e1829. <https://doi.org/10.21829/abm128.2021.1829>
- Martínez-Calderón VM, Sosa-Ramírez J, Torres-González JA, Mendieta-Vázquez AG, Sandoval-Ortega MH (2020) Propagación de *Forestiera phillyreoides*: una especie potencial para la restauración en el Centro-Norte de México. *Madera y Bosques* 26(2): 1–13. <https://doi.org/10.21829/myb.2020.2622052>
- Muñoz HJ, Sáenz JT, Coria VM, García JJ, Hernández J, Manzanilla GE (2015) Plant quality in the La Dieta forest nursery in Zitácuaro municipality, Michoacán state. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 6(27): 72–89.
- Narbona E, Arista M, Ortiz PL (2003) Germinación de las semillas del madroño (*Arbutus unedo* L., Ericaceae). *Acta Botanica Malacitana* 28: 73–78. <https://doi.org/10.24310/abm.v28i0.7267>
- Niembro-Rocas A, Vázquez-Torres M, Sánchez-Sánchez O (2010) Árboles de Veracruz, 100 especies para la reforestación estratégica. Gobierno del Estado de Veracruz y Secretaría de Educación del Estado de Veracruz. Xalapa.
- Núñez-Cruz, A., Meave, J. A., & Bonfil, C. (2018). Reproductive phenology and seed germination in eight tree species from a seasonally dry tropical forest of Morelos, Mexico: Implications for Community-Oriented Restoration and Conservation. *Tropical Conservation Science*, 11, 1–14. doi: 10.1177/1940082917749946

- Pasquini NM, Defossé GE (2012) Effects of storage conditions and pre-chilling periods on germinability of *Pinus ponderosa* seeds from Patagonia, Argentina: preliminary study. *Bosque* 33(1): 99–103. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002012000100012>
- Pritchard HW, Nadarajan J (2008) Cryopreservation of Orthodox (Desiccation Tolerant) Seeds. In: Reed BM (ed) *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*: Springer, New York, pp 485-501. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-72276-4\\_19](https://doi.org/10.1007/978-0-387-72276-4_19)
- Pipinis E, Stampoulidis A, Milios E, Kitikidou K, Radoglou K (2017) Effects of Cold Stratification and Ga3 on Germination of *Arbutus Unedo* Seeds of Three Provenances. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines* 14(1): 318–323. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i1.34>
- Pozo-Gómez DM, Orantes-García C, Rioja-Paradela TM, Moreno-Moreno RA, Farrera-Sarmiento O (2019) Diferencias en morfometría y germinación de semillas de *Croton guatemalensis* (Euphorbiaceae), procedentes de poblaciones silvestres de la Selva Zoque, Chiapas, México. *Acta Botánica Mexicana* 126: e1384. <https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1384>
- Ríos-García CA, Orantes-García C, Moreno-Moreno RA, Farrera Sarmiento Ó (2018) Efecto del almacenamiento sobre la viabilidad y germinación de dos especies arbóreas tropicales. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 5(13): 103. <https://doi.org/10.19136/era.a5n13.1161>
- Siqueiros-Delgado ME, Rodríguez-Avalos JA, Martínez-Ramírez J, Sierra-Muñoz JC (2016) Situación actual de la vegetación del estado de Aguascalientes, México. *Botanical Sciences* 94(3): 455–470. <https://doi.org/10.17129/botsci.466>
- Smiris P, Pipinis E, Aslanidou M, Mavrokordopoulou O, Milios E, Kouridakis A (2006) Germination study on *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) and *Podocytisus caramanicus* Boiss. & Heldr. (Fabaceae). *Journal of Biological Research* 5: 85–91.
- Tilki F (2004) Improvement in Seed Germination of *Arbutus unedo* L. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7(10): 1640–1642.

- Tovar-Rocha V, Rocha-Granados M, Delgado-Valerio P (2014) Influencia de la maduración del fruto de *Arbutus xalapensis* kunth sobre la germinación de semillas y embriones cigóticos. *Polibotánica* 37:79–92.
- Vázquez-Yanes C, Batis-Muñoz AI, Alcocer-Silva MI, Gual-Díaz M, Sánchez-Dirzo C (2001) Árboles y arbustos nativos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Villaseñor JL (2016) Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87(3): 559–902. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.017>
- Villaseñor JL, Ortiz E (2014) Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85(SUPPL.): 134–142. <https://doi.org/10.7550/rmb.31987>
- Zavala-Chávez F (2004) Desecación de bellotas y su relación con la viabilidad y germinación en nueve especies de encinos mexicanos. *CIENCIA Ergo-Sum*, 11(2): 177–185.

# TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

## **CAPITULO III. Propagación de *Arctostaphylos pungens* Kunt (Ericaceae) procedente de bosques templados del centro-norte de México.**

### **Resumen**

**Introducción:** *Arctostaphylos pungens* es una especie de amplia distribución en los bosques templados de México, dónde ha sido considerada pionera ya que está adaptada a zonas de alta insolación y a suelos someros. A pesar de ser considerada como una especie con características relevantes para la restauración, hay pocos trabajos sobre su propagación.

**Objetivo:** Evaluar el efecto de tratamientos pre-germinativos, así como el uso de métodos de propagación vegetativa en *A. pungens*.

**Materiales y Métodos:** Se evaluaron ocho tratamientos pre-germinativos que consistieron en escarificación con ácido sulfúrico, inmersión en ácido giberélico, estratificación en frío y shock térmico, así como combinaciones de estos. Se evaluó la propagación vegetativa por medio de esquejes y acodos aéreos.

**Resultados y discusión:** La mayor germinación se presentó con la inmersión en ácido sulfúrico de 5 – 6 hrs, con germinación de hasta  $73.33 \pm 15.63$  %, los tratamientos con shock térmico y estratificación fría presentaron baja o nula germinación. No se consiguió formación de raíz en esquejes, mientras que en acodos aéreos de 20 semanas se observó formación inicial de raíz en el  $37.50 \pm 25$  %.

**Conclusión:** Los mejores tratamientos consistieron en inmersión en ácido sulfúrico. Se recomienda seguir experimentando con la propagación vegetativa dejando los acodos aéreos por más de las 20 semanas utilizadas en este estudio.

**Palabras Clave:** Propagación vegetativa, germinación, restauración, ácido indolbutírico, escarificación y estratificación.

### **INTRODUCCIÓN**

Los bosques templados de México se distribuyen principalmente en las zonas montañosas y representan 16.56 % de la superficie del país, en cual se incluyen los bosques de coníferas y

de encino (Challenger & Soberón, 2008; Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2017). Este tipo de vegetación se encuentra entre los más afectados por el desarrollo y las actividades humanas, siendo susceptibles a incendios forestales, extracción de leña y actividades agrícolas, sobre todo en el centro del país (Challenger, 2003).

En México, la restauración ecológica es una disciplina relativamente reciente (Calva-Soto & Pavón, 2018). Una estrategia viable para la restauración de zonas degradadas es la reforestación con especies nativas que, a largo plazo, favorecen la recuperación de la diversidad y mejoran las condiciones del sitio degradado (Ventura-Ríos, Plascencia-Escalante, Hernández de La Rosa, Ángeles-Pérez, & Aldrete, 2017). Para ello es conveniente la selección de especies nativas adaptadas a las condiciones del sitio a restaurar, obteniendo con ello un mayor porcentaje de éxito (González-Espinosa et al., 2007; Meli, Martínez-Ramos, & Rey-Benayas, 2013). Un impedimento frecuente es no contar con las especies nativas que ayuden a cumplir el objetivo, debido, en parte, a la falta de información biológica. En particular, es fundamental entender los métodos de germinación o reproducción vegetativa (Bonfil & Trejo, 2010; Martínez-Pérez, Orozco-Segovia, & Martorell, 2006; Ramos-Palacios, Orozco-Segovia, Sánchez-Coronado, & Barradas, 2012) y generar información que permita la propagación de especies nativas con características relevantes para la restauración. Las semillas son el medio más común para la reproducción de especies forestales en vivero, por lo que es habitual mejorar la proporción de semillas que germinan por medio de tratamientos pregerminativos (Comisión Nacional Forestal [CONAFOR], 2015; Martínez-Pérez et al., 2006). Otro método es la propagación vegetativa, ya sea por medio de esquejes, estacas o acodos. Lo anterior puede ser una buena opción en la producción de especies con dificultad de reproducción en su hábitat o de difícil germinación en viveros (Delgado, Cuba, Hechenleitner, & Thiers, 2008; Ramos-Palacios et al., 2012)

*Arctostaphylos pungens* Kunt es una especie común en la vegetación de clima templado como los bosques de encino, encino-pino, coníferas y matorrales templados. *A. pungens* se distribuye ampliamente desde el suroeste de Estados Unidos hasta el sur de México en estados como Oaxaca y Chiapas, en altitudes de 1 600 a 3 200 m (González-Elizondo & González-Elizondo, 2014; Martínez-Pérez et al., 2006; Rzedowski, 2006). La especie ha sido mencionada como vegetación secundaria y es considerada pionera después de que ocurre un

disturbio por causas antrópicas o naturales (Díaz-Núñez, Sosa-Ramírez, & Pérez-Salicrup, 2016; Márquez-Linares et al., 2006; Sosa-Ramírez, Moreno-Rico, Sánchez-Martínez, Luna-Ruiz, & Siqueiros-Delgado, 2016), colonizando sitios afectados principalmente por incendios (Márquez-Linares et al., 2006). *A. pungens* es un arbusto, rara vez árbol, de 0.4 a 5 m de altura, de corteza exfoliante y color rojizo a rojo-púrpura. Sus hojas son coriáceas, elípticas y de 1 a 3.3 cm de largo. La flor es urceolada de color blanco a rosa mexicano y agrupada en racimos de cinco a ocho flores. Su fruto es una drupa comestible globosa deprimida, lisa, de 5 a 8 (11) mm, de color anaranjado a rojo oscuro. El número de semillas varía de 4 a 7 (10), con los tegumentos endurecidos, formando huesecillos unidos en grupos de dos a tres. Cada semilla tiene forma de gajo y mide en promedio 3.2 mm de largo y 2.6 mm de ancho (Márquez-Linares, Jurado, & González-Elizondo, 2006).

*A. pungens* tiene potencial para restauración, ya sea por su capacidad de retención de suelo o por su papel en la formación del mismo, con una buena producción de hojarasca (Martínez-Pérez et al., 2006); además, provee otros beneficios a la población a partir de la producción de frutos comestibles y de madera para leña, así como usos con fines medicinales (García-Regalado, 2014; González-Elizondo & González-Elizondo, 2014). Por ser una especie pionera que se encuentra naturalmente en sitios perturbados, probablemente presente mayor resistencia a condiciones poco favorables como el estrés hídrico y suelos deteriorados (Meli et al., 2013). Bajo un régimen de buen manejo, donde los incendios y otros disturbios son controlados, las especies pioneras ayudan al establecimiento de especies consideradas de bosques clímax, como es el caso del género *Quercus* (Márquez-Linares et al., 2006). No hay muchos trabajos sobre la propagación de *A. pungens*, a pesar de su amplia distribución y de ser considerada una especie con características relevantes para la restauración. La mayoría de ellos proviene de manuales que dan poca información sobre su propagación y de artículos que abordan la ecología de las semillas o tratamientos pregerminativos que, además, señalan baja germinación (Jurado, Márquez-Linares, & Flores, 2011; Martínez-Pérez et al., 2006). Esto no implica que se trate de los mejores métodos posibles, ya que no se toman en cuenta otros tratamientos pregerminativos potenciales (Martínez-Pérez et al., 2006). En cuanto al conocimiento de su propagación con métodos alternos como la reproducción por medio de material vegetativo no se tiene información.

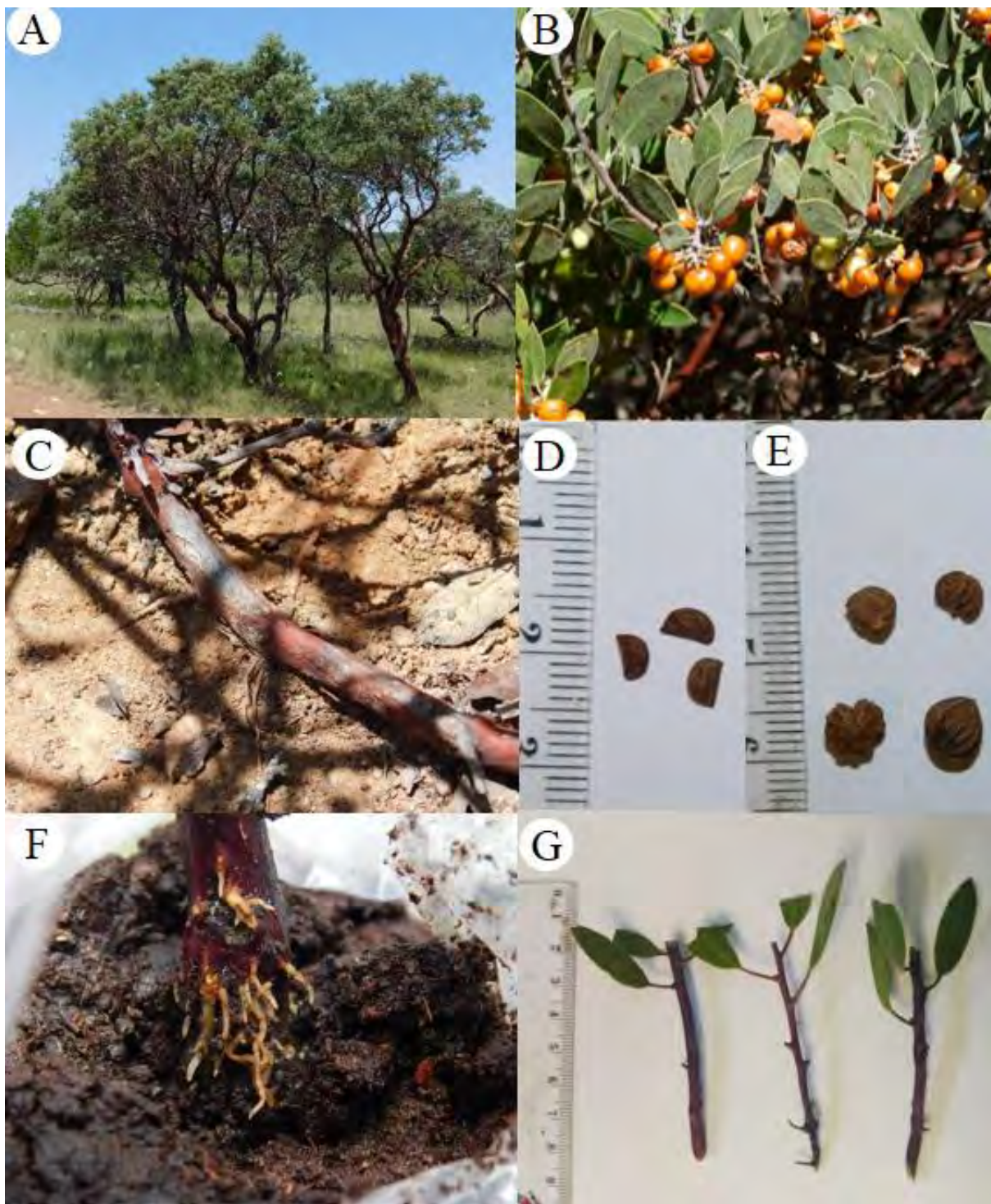


Debido a lo anterior, el objetivo del presente estudio consistió en evaluar la germinación de las semillas de *A. pungens* bajo tratamientos pregerminativos, así como la propagación vegetativa a través de esquejes y acodos aéreos con el fin de encontrar el método más adecuado. La información generada puede ser útil en la obtención de plantas de *A. pungens* para su uso posterior en la restauración de bosques templados.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Colecta del material biológico.**

Siendo otoño una de las temporadas con frutos maduros en la zona (Rubalcaba-Castillo et al., 2020). La estación de otoño es una de las temporadas con presencia de frutos maduros en la zona (Rubalcaba-Castillo et al., 2020). El 6 de diciembre del 2019 se colectaron 100 frutos maduros por ejemplar ( $n = 15$ ) en el bosque templado del Área Natural Protegida (ANP) Sierra Fría, Aguascalientes ( $22^{\circ} 11' 56.07$  "N,  $102^{\circ} 37' 54.88$ " W, 2 670 m) (Figura 3.1). El 21 de abril del 2020 se colectó material vegetal para realizar esquejes, después del crecimiento de las ramillas. La colecta se hizo con tijeras de poda en el predio "Rancho Piletas", dentro del ANP Sierra Fría. El material vegetal se transportó en bolsas de plástico para conservar la humedad.



**Figura 3. 1.** Detalles de *A. pungens* en campo y experimentos. A) Ejemplares en campo, B) Fruto, C) Propagación vegetativa natural, D) Semillas libres, E) semillas fusionadas, F) Formación de raíz en acodo, G) Tamaño de esqueje utilizado en experimento.

## Propagación sexual

### *Caracterización del fruto y semilla.*

Cien frutos se tomaron en forma aleatoria de una muestra compuesta del total de frutos colectados. Los frutos se pesaron en una balanza analítica y se midió el largo y ancho con un calibrador digital (Surtek 122200, China); posteriormente, las semillas se extrajeron manualmente. Las semillas libres extraídas de cada fruto (Figura 3.1D) se contaron y se pesaron 10 réplicas de 100 semillas; asimismo, se midió el largo, ancho y grosor de 100 semillas libres.

### *Germinación*

Los tratamientos consistieron en tratar de romper la latencia física y fisiológica de las semillas. Para ello, se probaron ocho tratamientos pregerminativos con el fin de encontrar el método más eficaz para su propagación (Tabla 3.1). El ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) se utilizó a una concentración de 98 %. La estratificación consistió en almacenamiento en frío ( $4\text{ }^{\circ}C$ ). El choque térmico consistió en colocar las semillas en arena seca a  $100\text{ }^{\circ}C$  por 5 min, como simulación de incendios forestales durante la temporada de sequía (Zuloaga-Aguilar, Briones, & Orozco-Segovia, 2010)

**Tabla 3. 1.** Tratamientos pre-germinativos utilizados en semillas de *A. pungens*

<i>Tratamiento</i>	<i>Descripción del tratamiento</i>
T1	Control
T2	Inmersión en $H_2SO_4$ por 5 h
T3	Inmersión en $H_2SO_4$ por 6 h
T4	Estratificación por 90 días + shock térmico
T5	Estratificación por 60 días + shock térmico
T6	Estratificación por 30 días + shock térmico + estratificación por 30 días + shock térmico
T7	Estratificación 60 días + inmersión en $H_2SO_4$ por 4 h
T8	Inmersión en $H_2SO_4$ por 5 h + inmersión en ácido giberélico ( $GA_3$ ) (1000 ppm) por 24 h

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se utilizó a una concentración de 98 %, la estratificación consistió en almacenamiento en frío (4 °C) y el choque térmico consistió en colocar las semillas en arena seca a 100 °C por 5 min.

En las pruebas de germinación se usaron cuatro réplicas de 30 semillas libres por tratamiento (Jurado et al., 2011). Cada unidad experimental constó de cajas Petri de 95 x 15 mm, con papel estraza y algodón. Las semillas se lavaron con cloro al 10 % por 5 min, posteriormente se sembraron en las cajas Petri; a cada semilla se agregó una gota de fungicida Interguzan 30-30® para prevenir el ataque de hongos. Las semillas se colocaron a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo de 8 h. La germinación se registró cada dos días durante 60 días. Al terminar este periodo se calculó el porcentaje promedio de germinación y tiempo medio de germinación (TMG):

$$TMG = \frac{\sum XiTi}{\sum Xi}$$

Donde Xi es el número de semillas germinadas por observación y Ti son los días transcurridos después de la siembra

## **Propagación asexual**

### ***Esquejes.***

Los esquejes consistieron en brotes de reciente crecimiento (primeros 10 centímetros a partir del ápice), semi-lignificadas, de 6-7 cm de longitud a los cuales se les eliminaron las hojas inferiores dejando únicamente de 2-3 de ellas cercanas al ápice (Delgado et al., 2008; Saldías, 2016). A todos los esquejes se les realizó un corte diagonal en la base para aumentar la superficie de absorción. Antes de colocar los esquejes en el sustrato, fueron tratados con una solución de fungicida captan (1gr/lit) para prevenir hongos, posteriormente el área del corte basal se impregnó con el producto comercial Radix® 10000 (en polvo), el cual tiene como ingrediente activo el ácido indolbutírico (AIB).

El ensayo constó de cuatro réplicas de 30 esquejes cada una. Fueron colocadas en charolas de plástico tipo bisagra para conservar la humedad, usando como sustrato peat-moss previamente humedecido. Se ubicaron en invernadero (temperatura: 15 °C min, 36 °C max, Humedad relativa 30-50%) con riego ligeros los lunes y viernes mediante un atomizador.

Posteriormente, en los cuatro primeros riegos se les aplicó nuevamente captan directamente a la base del esqueje para prevenir formación de hongos.

### ***Acodos aéreos.***

Los acodos aéreos se realizaron debido a que en campo se observó propagación vegetativa natural y se ha mencionado son una forma de natural en la región de colecta (Luna-Ruiz, Moreno-Rico, Sosa-Ramírez, & Sánchez-Martínez, 2016). Se hicieron 10 acodos aéreos en cuatro sitios con poblaciones de *A. pungens* dentro del “Rancho Piletas”, ANP Sierra Fría, cada sitio representando una réplica, los arbustos que se utilizaron presentaron un diámetro a la base mayor a 15 cm y una altura de 1.70 a 2.5 m.

Para realizar los acodos se utilizaron ramas con diámetro de 1 a 2 cm y de aproximadamente 40 a 50 cm de longitud. En cada rama se desprendió un anillo de corteza de 2 a 3 cm. Se aplicó enraizante en pasta preparada con lanolina y el producto Radix® 10000 a una proporción 4:1. Posteriormente se colocó una bolsa transparente (18 x 25 cm) sujeta con cordón para colocar peat moss previamente humedecido como sustrato, cubriendo la totalidad de la corteza desprendida. Los extremos se ataron para evitar la pérdida de humedad. El sustrato se regó con 25 mL de agua cada cinco semanas con ayuda de una jeringa de 5 mL.

### **Análisis estadístico**

Se calcularon medias y desviaciones estándar de los valores obtenidos en la caracterización de frutos, peso de semillas, germinación y propagación vegetativa. El diseño experimental fue completamente al azar. El efecto de los tratamientos pregerminativos se comparó por medio de un análisis de varianza de una vía con comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ); los datos de porcentajes se transformaron previamente con la función Arc sen. El TMG se calculó y comparó (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) entre T2, T3, T7 y T8 que fueron los tratamientos que presentaron germinación. T1 y T4 se excluyeron, ya que solo germinó una semilla en una réplica. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa InfoStat (Dí-Rienzo et al., 2016).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Propagación sexual

Los frutos colectados midieron menos de 1 cm, pesaron  $0.19 \pm 0.04$  g y tuvieron tres semillas libres por fruto. Las semillas fueron de tamaño pequeño con peso de  $1.22 \pm 0.13$  g por 100 semillas (Tabla 3. 2).

**Tabla 3. 2.** Valores morfométricos de fruto y peso de semillas libres. Medias  $\pm$  desviación estándar.

Fruto				Semilla			
Diámetro (mm)	Alto (mm)	Peso (g)	Semillas libres por fruto	Largo (mm)	Ancho (mm)	Grosor (mm)	Peso de 100 semillas (g)
$9.06 \pm 1.22$	$6.65 \pm 0.67$	$0.19 \pm 0.04$	$3.43 \pm 1.98$	$4.20 \pm 0.53$	$2.96 \pm 0.32$	$1.98 \pm 0.30$	$1.22 \pm 0.13$

En el estado de Durango y en el Bajío y sus zonas adyacentes, los frutos de mayor tamaño miden de 5 a 11 mm de diámetro (González-Elizondo & González-Elizondo, 2014; Márquez-Linares et al., 2006). En este estudio, el tamaño de la semilla fue mayor que la de Durango que midió 3.2 mm de largo y 2.6 mm de ancho. Los tamaños del fruto y semilla varían de acuerdo con las condiciones climáticas y edafológicas del sitio en que se desarrollan (Pozo-Gómez, Orantes-García, Rioja-Paradela, Moreno-Moreno, & Ferrera-Sarmiento, 2019). Las zonas comparadas pueden tener climas similares por lo que los tamaños son parecidos. El número de semillas libres también coincide con la descripción realizada para dichas zonas. El peso es una variable que no se toma en cuenta en la descripción botánica, pero es importante para la producción en vivero, ya que permite determinar el número de semillas por kilogramo y la cantidad de semillas a utilizar (Apodaca-Martínez et al., 2019).

### *Germinación.*

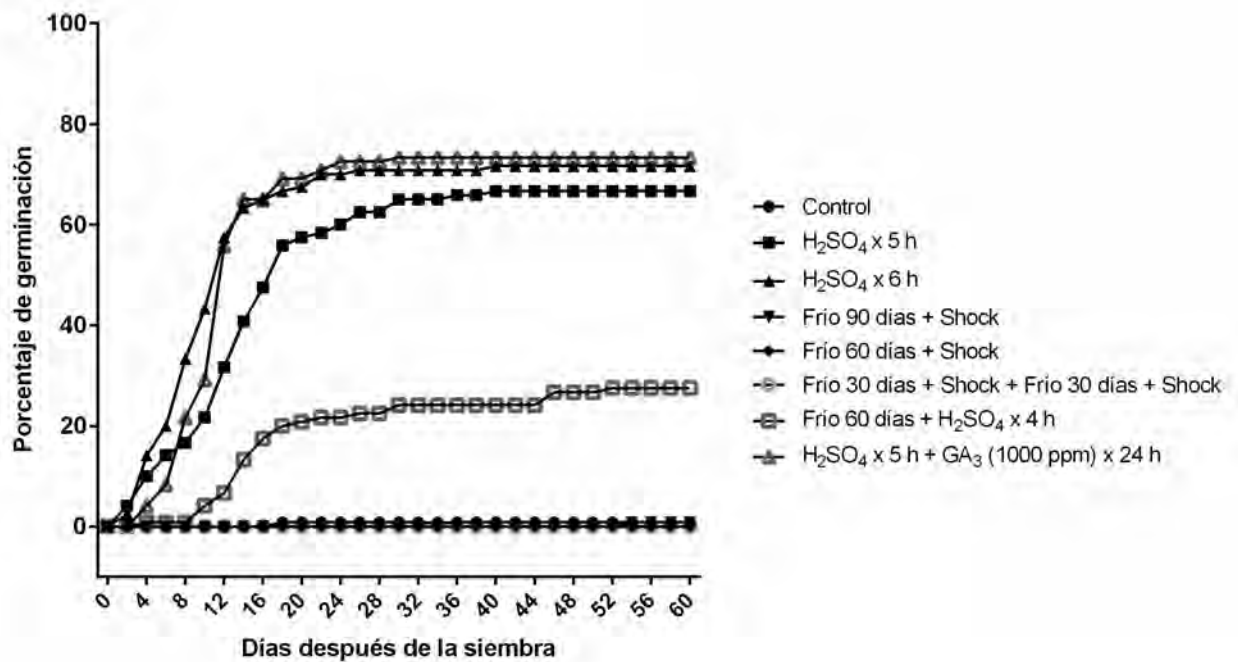
Los resultados de germinación mostraron diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ); estos variaron de 0 a 73.3 % (Tabla 3.3; Figura 3. 2). Las semillas con mayor porcentaje de germinación (66 a 73 %) fueron las sometidas al T8, proceso de escarificación con  $H_2SO_4$

por 5 h + 1 000 ppm de GA3 , siendo similares a los tratamientos T2 y T3 expuestos al ácido durante 5 y 6 h. El T7 (4 °C por 60 días + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 4 h) causó 27. 5 % de germinación y en los tratamientos restantes fue nula o prácticamente nula (Tabla 3. 3)

**Tabla 3. 3.** Germinación y tiempo medio de germinación (TMG) de semillas de *Arctostaphylos pungens* sometidas a tratamientos pregerminativos. Medias ± desviación estándar.

Tratamiento	% Germinación	TMG
T1	0.83 ± 1.67 c	4.5 ± 9 (18) b c
T2	66.67 ± 9.81 a	13.91 ± 1.10 a b
T3	71.67 ± 15.75 a	9.93 ± 1.47 a b c
T4	0.83 ± 1.67 c	13.50 ± 27 (54) b c
T5	0 ± 0 c	0 ± 0 c
T6	0 ± 0 c	0 ± 0 c
T7	27.50 ± 11.01 b	22.02 ± 8.93 a
T8	73.33 ± 15.63 a	11.55 ± 0.37 a b c

\* TMG: Tiempo medio de germinación, expresado en días. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ). Los valores entre paréntesis de TMG para T1 y T4 representan el día de germinación de la única semilla que germinó.



**Figura 3. 2.** Curva de germinación acumulada de los ocho tratamientos pre-germinativos

El H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> es usado comúnmente como tratamiento pregerminativo en especies con cubiertas impermeables que dificultan la entrada de agua a la semilla; este método ha aumentado la germinación en especies de los géneros *Medicago*, *Arctostaphylos* y *Juniperus* (MartínezPérez et al., 2006; Peng, Xiao, Wang, & Yu, 2018; Tilki, 2007). *Arctostaphylos pungens* forma bancos de semillas (Márquez-Linares et al., 2006), indicando que son ortodoxas y su testa impide la entrada y salida de humedad, lo que hace necesaria una degradación de la testa. Los resultados de germinación en semillas tratadas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fueron mayores que los señalados por Martínez-Pérez et al. (2006), quienes mencionan 63 % de germinación con exposiciones al H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 6 h y menores del 10 % con 5 h de inmersión. Asimismo, dichos autores mencionan que la germinación fue nula con inmersiones por menos de 5 h; en el presente estudio, la inmersión por 4 horas causó germinación de 27.50 ± 11.01 %.

Los porcentajes pueden diferir debido a la semilla usada en los experimentos, ya que suelen presentarse libres o fusionadas por dos o más semillas (Jurado et al., 2011). En el presente estudio se utilizaron semillas libres únicamente; en el caso de Martínez-Pérez et al. (2006)



no se menciona si se usaron semillas libres o fusionadas. En estudios con *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. se menciona la dificultad de una germinación homogénea, debido a la variedad de tamaño de las semillas y la complejidad de acertar el tiempo necesario para que el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tenga los efectos deseados, además de que en semillas pequeñas se pueden provocar daños al embrión (García-Fayos et al., 2001). En el caso de *A. pungens* esto puede ocurrir de manera similar, ya que las semillas fusionadas podrían presentar una testa de mayor grosor, lo cual incrementaría el tiempo de inmersión necesario para que el H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> degrade suficientemente la barrera mecánica que representa la testa. Cabe destacar que las diferencias de germinación también podrían deberse a variaciones entre las poblaciones, procedencia y su producción de semillas (Pozo-Gómez et al., 2019). De acuerdo con las observaciones, se recomienda escoger semillas libres de tamaño mayor para evitar posibles daños causados por el tratamiento pregerminativo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

*A. pungens*, además de presentar una testa muy dura, posee una posible latencia fisiológica (Jurado et al., 2011; Martínez-Pérez et al., 2006). Los tratamientos que se enfocaron en romper la latencia fisiológica, basados en estratificación fría junto con choque térmico, no germinaron con excepción de una semilla del T4 (4 °C por 90 días + choque térmico de 100 °C por 5 min). Estos datos son menores que los encontrados por Jurado et al., (2011), quienes se dedicaron a romper la latencia desde un punto de vista de la ecología de la semilla de *A. pungens* y su relación con el fuego, incrementando la germinación hasta en  $29.7 \pm 8.4$  % con una combinación de diversos factores (extracto de carbón vegetal, humo, frío y calor). Cabe destacar que, en dicho estudio, los porcentajes de germinación fueron relativamente bajos con tratamientos similares a los empleados en este trabajo, ya que con 40 días de almacenamiento en frío más choque térmico de 100 °C lograron  $5.7 \pm 4.3$  % de germinación.

Se ha mencionado el efecto positivo de la estratificación en frío sobre la germinación en diversas especies (Baskin & Baskin, 2004) y el de la combinación con GA<sub>3</sub> en especies de la misma familia que *A. pungens* (Ericaceae) como el género *Arbutus* (Bertsouklis & Papafotiou, 2013; Smiris et al., 2006). El frío estimula la ruptura de la latencia fisiológica como llega a ocurrir en la naturaleza por efecto del invierno. Dicha latencia puede ser desde no profunda, intermedia y profunda; está última requiere de tres a cuatro meses de frío (Baskin & Baskin, 2004). Lo anterior podría indicar que *A. pungens* quizá tenga latencia

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

fisiológica profunda y requiera más tiempo de almacenamiento en frío que el utilizado en el presente experimento (90 días).

En este estudio, los tratamientos T7 (4 °C por 60 días + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 4 h) y T8 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 5 h + 1 000 ppm GA<sub>3</sub> por 24 h) buscaron cubrir latencia fisiológica y física. Para el tratamiento T7 pudo haber sido necesario un periodo de almacenamiento en frío más largo, así como mayor tiempo de inmersión en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El tratamiento T8, al cual se le adicionó GA<sub>3</sub> después de la inmersión de 5 h en ácido, aunque no fue estadísticamente diferente, tuvo mayor porcentaje de germinación y un menor TMG que el tratamiento que únicamente constó de inmersión por 5 h en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. En otros estudios se han mencionado los efectos positivos del GA<sub>3</sub> sobre la germinación y el rompimiento de latencia, reemplazando la necesidad de un estímulo ambiental específico como la temperatura o luz (Baskin & Baskin, 2004).

El tiempo necesario para la germinación presentó diferencias (P = 0.0128). Los TMG variaron de 9 a 22 días después de la siembra; los tratamientos con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> presentaron los menores tiempos de germinación, la cual inició antes de los 10 días después de la siembra, mientras que los tratamientos restantes comenzaron en el día 18 y 54 (Tabla 3.3; Figura 3. 2)

El efecto del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> también se reflejó en el tiempo necesario para que la semilla germine, siendo menor en las semillas inmersas por más tiempo. El H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, al reducir la barrera que representa la testa de *A. pungens*, facilita la entrada de agua al embrión para iniciar la imbibición y, consecuentemente, la germinación; asimismo, ayuda a que la radícula rompa la testa (Martínez-Calderón, Sosa-Ramírez, Torres-González, Mendieta-Vázquez, & Sandoval-Ortega, 2020). En otros estudios se menciona un T50 (tiempo necesario para alcanzar 50 % de la germinación total) de 18 días (Martínez-Pérez et al., 2006); en el presente estudio se observaron tiempos un poco menores de 16 días en la curva de germinación (Figura 3. 2).

### ***Propagación asexual***

Los esquejes presentaron supervivencia de 35.78 % a las 12 semanas, pero no formaron callo y raíz. El inicio del desarrollo de yemas axilares se observó a las cuatro semanas, pero no finalizó. Esto contrasta con lo observado por Hart (2005) en otras especies del género *Arctostaphylos* con posibilidad de enraizamiento, difiriendo en el uso del sustrato (agrolita).

Hart (2005) menciona que la buena aeración y drenaje pueden ser factores importantes en la propagación vegetativa y que, en especies arbustivas medianas o arbóreas como *Arctostaphylos grandulosa* Eastw., los esquejes pueden tardar de tres a cinco meses en formar raíces. Esto puede ocurrir con *A. pungens*, siendo una especie arbustiva grande de 3 a 4 m, la formación de raíces tardaría más tiempo.

En los acodos aéreos no se observó muerte de la rama utilizada para realizar el acodo y hubo formación de callo (97.5 %) y raíz (37.50 %). En general, a las 20 semanas, los acodos aéreos tuvieron dos a siete raíces (80 %) formadas recientemente; el resto presentó 10 a 18 raíces (20 %). El tamaño de estas fue en su mayoría menor de 10 mm (78.4 %) y el resto varió de 10 a 25 mm (21.6 %).

Los resultados muestran la posibilidad de inducir la formación de raíces para una propagación vegetativa de la especie como se ha observado en estado silvestre (Luna-Ruiz et al., 2016) por medio de acodos aéreos tratados con AIB. Esta auxina ha sido utilizada de manera exitosa para promover la formación de raíces en especies leñosas de interés alimenticio, ornamental y, en menor medida, en especies forestales silvestres (Abdel-Rahman, Abdul-Hafeez, & Saleh, 2020; RamosPalacios et al., 2012; Sánchez-Urdaneta et al., 2009).

Lo observado en el presente estudio es similar a lo ocurrido en una especie de mangle (*Conocarpus erectus* L.) que formó retoños en esquejes pero no desarrolló raíz, mientras que en acodos aéreos si se logró la formación radicular (Benítez-Pardo, Flores-Verdugo, & Flores-Verdugo, 2002). Esto se puede deber a que la especie requiere más de una estación para lograr la formación de un buen sistema radicular, que por medio de estacas o esquejes no se lograría. Otro factor que influye en el éxito es la estación en la que se realice la práctica de propagación vegetativa (Benítez-Pardo et al., 2002). En el presente trabajo, los acodos se realizaron en primavera llegando al final de su primera etapa de crecimiento y se retiraron en verano cuando estaban en su segunda temporada de crecimiento.

Como se mencionó anteriormente, la formación de callo se observó en  $97.50 \pm 5$  % de los acodos aéreos. En diversas especies, dicho fenómeno puede representar el inicio de la formación radicular como consecuencia de la diferenciación celular (Ikeuchi, Sugimoto, & Iwasec, 2013). La formación de callo es estimulada por la acción de hormonas (auxinas y citoquininas), heridas y genes implicados en el crecimiento, desarrollando una masa de

células indiferenciadas y subsecuente formación de regeneración de órganos de la planta, ya sea formación de brotes o raíz (Ikeuchi et al., 2013; Lozzi, Abdelwahd, Alami-Halimi, Mentag, & Abousalim, 2019; Lu, Liu, Lyu, Yuan, & Wu, 2019). Ikeuchi et al. (2013) mencionan que una proporción intermedia de auxinas y citoquininas estimula la formación de callo, mientras que una proporción mayor de auxinas que citoquininas estimularía la formación de raíces. Esto indicaría que *A. pungens* presenta naturalmente citoquininas que junto con las auxinas utilizadas (AIB) formaron callo en la mayoría de los acodos, contando además el efecto de la herida realizada en el proceso de elaboración del acodo. La formación de callo en acodos aéreos, en otros casos, puede llegar a cubrir el corte y formar una reconexión con la rama donante retrasando la formación de raíces (Sánchez-Urdaneta et al., 2009). Esto pudo ocurrir también en el presente estudio con *A. pungens*.

De acuerdo con los resultados, tanto en esquejes y acodos aéreos, *A. pungens* es una especie que requiere más de una estación para la formación de raíces. Lo anterior hace necesario dejar los acodos aéreos por más de 20 semanas para conseguir formación de raíz que permita la sobrevivencia de la rama después de la separación del arbusto madre, ya que los acodos comenzaron a secarse al mes del corte por no tener raíces suficientemente grandes para mantener a la rama. Cabe resaltar que no se cuenta con estudios sobre la propagación vegetativa de *A. pungens*, algo común en las especies forestales silvestres, a pesar de que tal forma de reproducción puede ser una alternativa para especies con problemas de propagación por semilla (Benítez-Pardo et al., 2002; Ramos-Palacios et al., 2012). Los resultados permiten el entendimiento de *A. pungens* y el conocimiento para la mejora de la propagación en programas de reforestación y restauración. Aun así, hacen falta más estudios para tener los resultados deseados, sobre todo contemplando la variedad de tamaños en las semillas y su comportamiento en cada región, dada su amplia distribución en el país. La propagación vegetativa de *A. pungens* debe ser más explorada, siendo este estudio un primer paso y sabiendo que, en algunas zonas, es el principal medio de reproducción. Sería recomendable continuar las investigaciones sobre el cultivo de *A. pungens* en vivero contemplando emergencia, supervivencia, uso de sustratos y fertilización para completar un esquema de propagación ideal.

## CONCLUSIONES

La germinación de *Arctostaphylos pungens* mejora con la degradación de la testa por un tiempo prolongado en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se recomienda la selección de semillas de mayor tamaño para evitar posibles daños causados por el ácido o probar con otras concentraciones de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para lograr la degradación de la testa sin tener que descartar semillas pequeñas, de tal forma que se conserve la diversidad genética de la especie. El acodo aéreo puede funcionar como método alternativo a la semilla, dejándolo por más de 20 semanas para lograr una mejor formación de la raíz. Se recomienda seguir experimentando en la propagación vegetativa con el fin de encontrar el mejor método, probando diferentes concentraciones del ácido indolbutírico, estaciones del año y sustratos que permitan mayor aireación y drenaje.

## REFERENCIAS

- Abdel-Rahman, S., Abdul-Hafeez, E., & Saleh, A. (2020). Improving Rooting and Growth of *Conocarpus Erectus* Stem Cuttings Using Indole-3-Butyric Acid (Iba) and Some Biostimulants. *Scientific Journal of Flowers and Ornamental Plants*, 7(2), 109–129. doi:10.21608/sjfop.2020.96213
- Apodaca-Martínez, M., Cetina Alcalá, V. M., Jasso-Mata, J., López-López, M. Á., González-Rosas, H., Uscanga-Mortera, E., & García-Esteva, A. (2019). Ruptura de la latencia física y germinación de semillas de *Chiranthodendron pentadactylon* (Malvaceae). *Botanical Sciences*, 97(2), 211. <https://doi.org/10.17129/botsci.2094>
- Baskin J. M. & Baskin C. C. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seeds Science Research*, 14,1-17. doi:10.1079/SSR2003150
- Benítez-Pardo, D., Flores-Verdugo, F., & Valdez-Hernández, J. I. (2002). Reproducción vegetativa de dos especies arbóreas en un manglar de la costa norte del Pacífico mexicano. *Madera y Bosques*, 8(2), 57–71. doi:10.21829/myb.2002.821301
- Bertsouklis, K. F., & Papafotiou, M. (2013). Seed germination of *Arbutus unedo*, *A. andrachne* and their natural hybrid *A. andrachnoides* in relation to temperature and period of storage. *HortScience*, 48(3), 347–351. doi:10.21273/hortsci.48.3.347

- Bonfil, C., & Trejo, I. (2010). Plant Propagation and the Ecological Restoration of Mexican Tropical Deciduous Forests. *Ecological Restoration*, 28(3), 369–376. doi:10.3368/er.28.3.369
- Calva-Soto, K., & Pavón, N. P. (2018). Ecological restoration in México: An emerging discipline in a deteriorated country. *Madera Bosques*, 24(1). doi:10.21829/myb.2018.2411135
- Challenger, A. (2003). Conceptos generales acerca de los ecosistemas templados de montaña de México y su estado de conservación. En: Ó., Sánchez, E. Vega, E. Peters, y O. Monroy-Vilchis (Eds). *Conservación de ecosistemas templados de montaña en México*. (pp 316). Ciudad de México: Instituto Nacional de Ecología (INE, SEMARNAT)/SyG.
- Challenger, A. & Soberón, J. (2008). Los ecosistemas terrestres de México. En: CONABIO (Ed). *Capital natural de México, Vol. I. conocimiento actual de la biodiversidad*. (pp 87-108). Ciudad de México, México: Comisión Nacional para el Conocimiento de la Biodiversidad-CONABIO.
- Comisión Nacional Forestal [Conafor]. (2015). Manual de restauración forestal y reconversión productiva. Jalisco, México: Autor.
- Delgado, M. F., Cuba, M., Hechenleitner, P., & Thiers, O. (2008). Propagación vegetativa de taique (*Desfontainia spinosa*) y tepa (*Laureliopsis philippiana*) con fines ornamentales. *Bosque*, 29(2), 120–126. doi:10.4067/s0717-92002008000200004
- Díaz-Núñez, V., Sosa-Ramírez, J., & Pérez-Salicrup, D. R. (2016). Vegetation patch dynamics and tree diversity in a conifer and oak forest in central Mexico. *Botanical Sciences*, 94(2), 229–240. doi:10.17129/botsoci.284
- Di-Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2016). InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Recuperado de <http://www.infostat.com.ar>
- García-Fayos, P., Gulias, J., Martínez, J., Marzo, A., Melero, J. P., Traveset, A., Veintimilla, P., Verdú, M., Cerdán, V., Gasque, M., & Medrano, H. (2001). *Bases ecológicas*

- para la recolección, almacenamiento y germinación de semillas de especies de uso forestal de la Comunidad Valenciana*. España: Banc de Llavors Forestals (Conselleria de Medi Ambient, Generalitat Valenciana).
- García-Regalado, G. (2014). *Plantas medicinales de Aguascalientes*. México: Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- González-Elizondo, M. S., & González-Elizondo, M. (2014). *Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 183 Ericaceae*. México: Instituto de Ecología, A.C.
- González-Espinosa, M., Ramírez-Marcial, N., Camacho-Cruz, A., Holz, S. C., Rey-Benayas, J. M., & Parra-Vázquez M. R. (2007). Restauración de bosques en territorios indígenas de Chiapas: modelos ecológicos y estrategias de acción. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 80S: S11-S23. doi: 10.17129/botsoci.1753
- Hart, L. 2005. Propagating and cultivation of *Arctostaphylos* in relation to the environment in its natural habitat in California, USA. *The International Plant Propagators' Society Combined Proceedings* 55, 291–294. Recuperado de <https://rngr.net/publications/fnn/2007-winter/new-nursery-literature/propagation-and-cultivation-of-arctostaphylos-in-relation-to-the-environment-in-its-natural-habitat-in-california-u-s-a.a9/?searchterm=>
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant callus: Mechanisms of induction and repression. *Plant Cell*, 25(9), 3159–3173. doi:10.1105/tpc.113.116053
- Jurado, E., Márquez-Linares, M., & Flores, J. (2011). Effect of cold storage, heat, smoke and charcoal on breaking seed dormancy of *Arctostaphylos pungens* HBK (Ericaceae). *Phyton*, 80, 101–105. Recuperado de <http://www.revistaphyton.fundromuloraggio.org.ar/vol80.html>
- Lozzi, A., Abdelwahd, R., Alami-Halimi, D., Mentag, R., & Abousalim, A. (2019). Optimization of a mature cotyledons-based in vitro culture system for embryogenic-callus induction in carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 25(1), 71–84. doi:10.5154/r.rchscfa.2018.06.053

- Lu, Y., Liu, Z., Lyu, M., Yuan, Y., & Wu, B. (2019). Characterization of JsWOX1 and JsWOX4 during callus and root induction in the shrub species *Jasminum sambac*. *Plants*, 8(4), 1–13. doi:10.3390/plants8040079
- Luna-Ruiz, J. de J., Moreno-Rico, O., Sosa-Ramírez, J., & Sánchez-Martínez, G. (2016). Fenología y estrategias de propagación de la manzanita en la Sierra Fría, Aguascalientes. In J. Sosa-Ramírez, O. Moreno-Rico, G. Sánchez-Martínez, J. de J. Luna-Ruiz, & M. E. Siqueiros-Delgado (Eds.), *Contribución al conocimiento ecológico del chaparral de manzanita (Arctostaphylos pungens Kunth) en la Sierra Fría, Aguascalientes* (p. 104). México. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Márquez-Linares, M., Jurado, E., & González-Elizondo, S. (2006). Algunos aspectos de la biología de la manzanita (*Arctostaphylos pungens* HBK) y su papel en el desplazamiento de bosques templados por chaparrales. *Ciencia UANL*, 9(2), 57–64. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/402/40290111.pdf>
- Martínez-Calderón, V. M., Sosa-Ramírez, J., Torres-González, J. A., Mendieta-Vázquez, A, G., & Sandoval-Ortega, M. H. (2020). Propagación de *Forestiera phillyreoides*: una especie potencial para la restauración en el Centro-Norte de México. *Madera y Bosques*, 26(2), e2622052. doi:10.21829/myb.2020.2622052
- Martínez-Pérez, G., Orozco-Segovia, A., & Martorell, C. (2006). Efectividad de algunos tratamientos pre-germinativos para ocho especies leñosas de la Mixteca Alta oaxaqueña con características relevantes para la restauración. *Boletín de La Sociedad Botánica de México*, 79, 9–20. doi:10.17129/botsoci.1729
- Meli, P., Martínez-Ramos, M. & Rey-Benayas, J. M. (2013). Selecting Species for Passive and Active Riparian Restoration in Southern Mexico. *Restoration Ecology* 21(2) 163–165. doi: 10.1111/j.1526-100X.2012.00934.x
- Peng, Z., Xiao, H., Wang, F., & Yu, X. (2018). Seed germination tests of *Medicago ruthenica* (Leguminosae). *Seed Science and Technology*, 46(1), 149–156. doi:10.15258/sst.2018.46.1.15
- Pozo-Gómez, D. M., Orantes-García, C., Rioja-Paradela, T. M., Moreno-Moreno, R. A., & Farrera-Sarmiento, O. (2019). Diferencias en morfometría y germinación de



semillas de *Croton guatemalensis* (Euphorbiaceae), procedentes de poblaciones silvestres de la Selva Zoque, Chiapas, México. *Acta Botánica Mexicana*, 126: e1384. doi: 10.21829/abm126.2019.1384

Ramos-Palacios, R., Orozco-Segovia, A., Sánchez-Coronado, M. E., & Barradas, V. L. (2012). Vegetative propagation of native species potentially useful in the restoration of Mexico City's vegetation. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83(3), 809–816. doi:10.7550/rmb.21610

Rubalcava-Castillo, F., A., Sosa-Ramírez, J., Luna-Ruiz, J., J., Valdivia-Flores, A., G., Díaz-Núñez, V., & Íñiguez-Dávalos, L., I. (2020). Endozoochorous dispersal of forest seeds by carnivorous mammals in Sierra Fría, Aguascalientes, Mexico. *Ecology and Evolution*, 10(6):2991-3003. doi:10.1002/ece3.6113

Rzedowski, J. (2006). *Vegetación de México*. México: Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad.

Saldías, G. (2016). Propagación vegetativa por esquejes de *Monttea chilensis* Gay. *Gayana Bot.*, 73(1), 25–31. doi:10.4067/S0717-66432016000100004

Sánchez-Urdaneta, A. B., Suárez, E., González, M. R., Amaya, Y., Comenares, C. B., & Ortega, J. (2009). Efecto del ácido indolbutírico sobre el enraizamiento de acodos aéreos de guayabo (*Psidium guajava* L.) en el municipio Baralt, Venezuela. Evaluación preliminar. *Revista UDO Agrícola*, 9(1), 113–120. Recuperado de <http://www.bioline.org.br/pdf?cg09016>

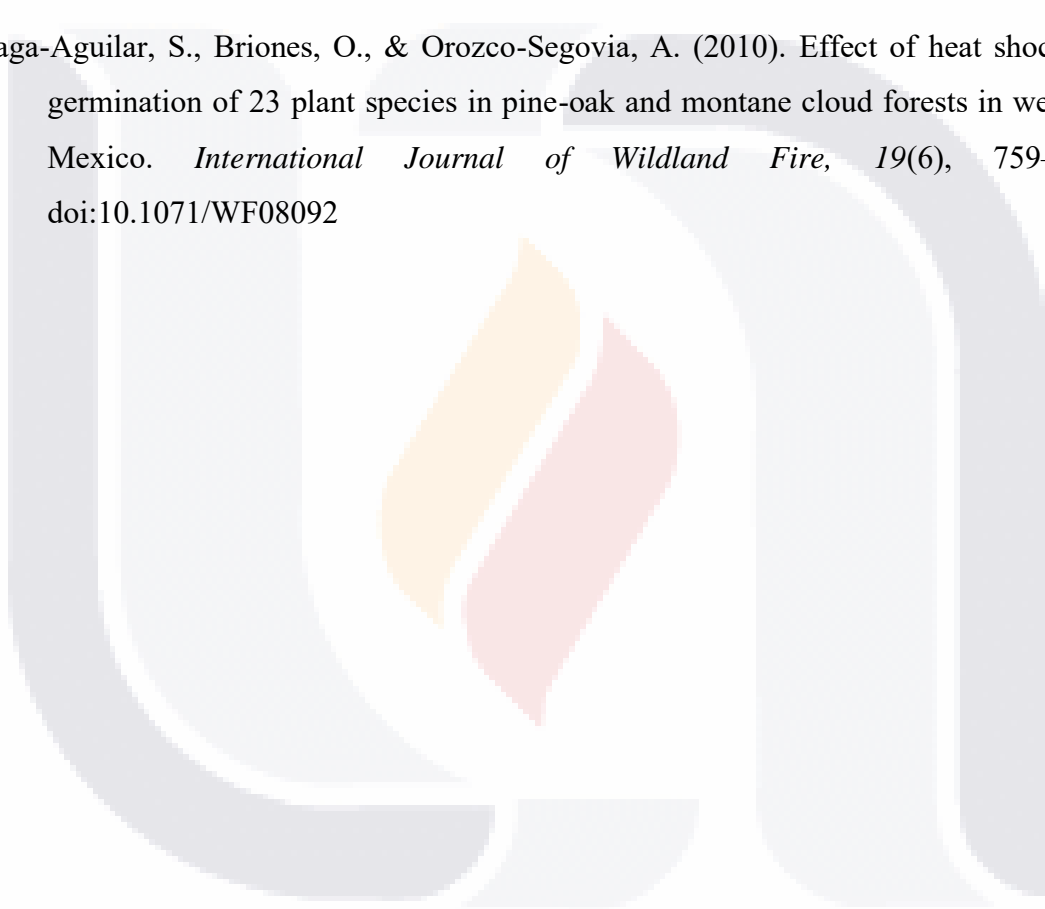
Smiris, P., Pipinis, E., Aslanidou, M., Mavrokordopoulou, O., Milios, E., & Kouridakis, A. (2006). Germination study on *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) and *Podocytisus caramanicus* Boiss. & Heldr. (Fabaceae). *Journal of Biological Research*, 5, 85–91. Recuperado de <http://www.jbr.gr/papers20061/09-Smiris.pdf>

Sosa-Ramírez, J., Moreno-Rico, O., Sánchez-Martínez, G., Luna-Ruiz, J. de J., & Siqueiros-Delgado, M. E. (2016). *Contribución al conocimiento ecológico del chaparral de manzanita (Arctostaphylos pungens Kunth) en la Sierra Fría, Aguascalientes*. México: Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Tilki, F. (2007). Preliminary results on the effects of various pre-treatments on seed germination of *Juniperus oxycedrus* L. *Seed Science and Technology*, 35(3), 765–770. [doi:10.15258/sst.2007.35.3.25](https://doi.org/10.15258/sst.2007.35.3.25)

Ventura-Ríos, A., Plascencia-Escalante, F. O., Hernández De La Rosa, P., Ángeles-Pérez, G., & Aldrete, A. (2017). ¿Es la reforestación una estrategia para la rehabilitación de bosques de pino? Una experiencia en el centro de México. *Bosque*, 38(1), 55–66. [doi:10.4067/S0717-92002017000100007](https://doi.org/10.4067/S0717-92002017000100007)

Zuloaga-Aguilar, S., Briones, O., & Orozco-Segovia, A. (2010). Effect of heat shock on germination of 23 plant species in pine-oak and montane cloud forests in western Mexico. *International Journal of Wildland Fire*, 19(6), 759–773. [doi:10.1071/WF08092](https://doi.org/10.1071/WF08092)



## **CAPITULO IV. Aplicación de estrategias de restauración.**

### **INTRODUCCIÓN**

Se estima que los bosques del planeta han sufrido una deforestación a una tasa de 10,2 millones de ha por año del 2015 al 2020, donde el bosque templado ha presentado una tasa de 0.31 millones de ha por año (FAO, 2020). En México se menciona una pérdida en la cobertura forestal aproximada de 500 mil ha por año, principalmente al cambio de uso de suelo a áreas agrícolas y urbanas (Rosete-Vergés et al., 2014). Por lo anterior, y debido a diversos factores, México ha sido mencionado como un país con problemas de deterioro donde la restauración ecológica es una disciplina emergente y cada vez más necesaria (Calva-Soto & Pavón, 2018).

Por lo anteriormente mencionado, es necesario el desarrollo de estrategias de restauración que faciliten la recuperación de la cobertura forestal y que a su vez estimulen la sucesión y recuperación a bosques maduros (Bonilla-Moheno & Holl, 2010). En México, al igual que en otras partes del mundo, la reforestación es una de las principales formas de restauración, introduciendo especies leñosas para recuperar cobertura y aumentar la diversidad de especies (Chillo et al., 2022; Rivas-Rivas et al., 2017; Ventura-Ríos et al., 2017). A pesar de lo anterior, la reforestación tradicional implica grandes costos, que van desde la producción de especies en vivero, que implican uso de fertilizantes, sustratos y mano de obra, así como los costos de transporte, siembra en los sitios a restaurar y el manejo posterior a la siembra para aumentar la supervivencia (Keyes-Hennin & Anduaga-Muñoz, 1997; Reyes et al., 2018; Salcido Ruiz et al., 2021). Además de que esta práctica frecuentemente es limitada a la disponibilidad de especies en los viveros, donde muchas veces no se tiene la información para su propagación (Atondo-Bueno et al., 2018; Martínez-Calderón et al., 2020)

Por otra parte, además de la reforestación tradicional, existe la siembra directa que ha sido mencionada como una alternativa de bajo costo a la reforestación tradicional (Atondo-Bueno et al., 2016, 2018; Ceccon et al., 2016; Löf et al., 2019). La siembra directa es una forma más efectiva de enriquecer un sistema existente (Cole et al., 2011). La siembra directa implica diversos retos y problemas que pueden impedir el éxito de esta técnica. Estos pueden ir desde la baja viabilidad y germinación de las semillas, la depredación, la competencia entre la

vegetación existe y la mortandad alta de las plántulas recién emergidas (Cecon et al., 2016; Löff et al., 2019). En el caso particular del género *Quercus*, uno de los principales problemas es la depredación y remoción de las semillas por parte de roedores (Löff et al., 2019).

Pese a sus beneficios de ambas técnicas (reforestación tradicional y siembra directa), se tienen pocos estudios sobre el tema en el país. Dejando la necesidad de información que nos permita realizar prácticas de restauración de manera exitosa. En el estado de Aguascalientes se cuenta con muy poca información documentada sobre trabajos de restauración y no se tiene información que nos permita aplicar técnicas como la siembra directa, ver si posibilidad de uso en el estado, así como que tan viable puede ser en la zona. Por otra parte, la reforestación a pesar de ser realizada de manera continua no se tienen estudios que documenten su eficiencia.

En cuanto a la restauración con encinos es poca la información que se cuenta para el país y para la región, siendo los estudios de referencia los realizados en estados de San Luis Potosí que cuentan con algunas especies similares y en donde se han realizado experimentos similares usando la siembra directa y reforestaciones.

Los objetivos del presente estudio fueron: 1) determinar la posibilidad de usar la siembra directa como forma de restauración de *Q. eduardii*. Observar el efecto de dos especies leñosas pioneras como nodrizas y la necesidad del uso de protección contra la depredación para su establecimiento. 2) Observar la supervivencia y desarrollo de dos especies de encino utilizando dos especies pioneras como nodrizas.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **SIEMBRA DIRECTA**

#### ***Sitio de estudio.***

El experimento fue llevado a cabo en Mesa del Águila (22°12'29.32"N, 102°36'8.22"W), dentro del ANP Sierra Fría, Aguascalientes. Sierra Fría presenta un clima de templado semiárido con lluvias en verano, con un promedio anual de lluvias de 600 a 700 mm y temperatura media anual de 12 a 18 °C (SEDES, 1995). Mesa del Águila presenta una

cobertura vegetal abierta, dominada principalmente por *J. deppeana* y *A. pungens*, así como se presentan ejemplares de *Pinus spp* y *Quercus spp*.

**Colecta de material biológico y selección de semillas.** Se colectaron semillas de *Quercus eduardii* el 3 de septiembre 2020, en el camino a Barranca Piletas, Sierra Fría (22°11'34.59"N, 102°35'33.86"W, 2477 msnm). Las semillas se colectaron directamente del árbol para evitar colectar semillas con daños o tiempo de desecación (Zavala-Chavez y Garcia-Moya, 1997) y se transportaron en bolsas de plástico cerradas. El mismo día de colecta fueron lavadas con cloro comercial al 10% por tres minutos, colocadas en bolsas cerradas Ziploc® y almacenadas en refrigeración (5-7 °C) para evitar pérdida de viabilidad por desecación, ya que son consideradas muy recalcitrantes (Badano et al., 2018). Se utilizaron únicamente semillas viables, para esto se sometieron a una prueba de inmersión y fueron almacenadas las semillas que se hundieron a primera inmersión (≈98 %).

**Vivero.** Para comprobar la calidad de la semilla colectada y descartar problemas de viabilidad o falta germinación fuera debido a la semilla, se realizó una prueba de germinación en vivero con malla de 50% sombra. Para la prueba de germinación se utilizaron tres réplicas de 20 semillas sometidas a un remojo previo de 12 hrs en agua común como tratamiento pre-germinativo, al igual que en el experimento en campo. Las semillas fueron sembradas superficialmente en una bandeja de germinación usando peat-moss como sustrato. La germinación fue monitoreada cada dos días durante 30 días, tomando como germinación la emergencia de la radícula de 5 mm (Zavala-Chávez, 2004). Durante la prueba, el vivero presentó una temperatura mínima de 13°C y máxima de 27 °C.

La emergencia también fue revisada en vivero, para esto se utilizaron tres réplicas de 20 semillas sometidas a un remojo previo de 12 hrs en agua común. Fueron sembradas en tubetes forestales intercambiables de 380 ml, a una profundidad de 3 cm, usando como sustrato una mezcla de 50 % materia orgánica de encino (Hojarasca) y 50 % peat-moss. Se realizaron observaciones cada dos semanas durante ocho semanas, considerando como emergencia la visualización de la plántula sobre el sustrato (García-De La Cruz et al., 2016).

**Campo.** El experimento fue llevado a cabo 8 días después de la colecta. Se seleccionaron tres individuos de *A. pungens* y *J. deppeana* para ser utilizados como nodrizas, cada individuo a manera de réplica. Así mismo el control que consistió en semillas colocadas fuera del dosel

de los individuos seleccionados (sin cobertura arbórea o arbustiva). Los individuos de *A. pungens* presentaron una altura de  $2.27 \pm 0.25$  m y un diámetro de la copa de  $3.60 \pm 0.55$  m mientras que los individuos de *J. deppeana* presentaban una altura de  $3.57 \pm 0.40$  m y un diámetro de la copa de  $4.56 \pm 1.24$  m.

Se utilizaron tratamientos con y sin protección, con el fin de evaluar la necesidad de usar protección en la siembra directa. Para el tratamiento con protección se utilizaron jaulas circulares de 30 cm de diámetro y 23 cm de alto, hechas de malla de criba (4\*4 mm), que fueron enterradas a una profundidad de 3-5 cm, con el fin de evitar daños por la fauna, como la remoción de semillas por roedores (Löf et al., 2019). A una distancia de 50-70 cm de la jaula, se colocó un círculo de malla de 10 cm a manera de tratamiento sin protección, únicamente para marcar un área igual y evitar que las semillas fueras removidas por escorrenría.

Se utilizaron 20 semillas sometidas a un remojo previo de 12-16 hrs en agua común. Las semillas fueron sembradas a 3 cm de profundidad. En el caso de las nodrizas fue removido el pasto y la hojarasca para la siembra y posteriormente se volvió a cubrir el suelo con la hojarasca.

Se monitorio la emergencia de las plántulas cada dos semanas durante ocho semanas posteriores a la siembra. Al terminar el periodo de emergencia se monitorio la supervivencia de las plántulas emergidas una vez por mes hasta el mes de Julio, después de que comenzaron las lluvias de verano.

Aunque no se observó supervivencia a partir de mayo se siguió monitoreando dos meses más, ya comenzadas las lluvias para observar un posible rebrote.

### ***Variables ambientales***

Se midió la radiación fotosintéticamente activa (PAR) disponible en las distintas condiciones, esta se midió a 30 cm del suelo una vez por mes, medida por medio de un medidor cuántico (MQ-200 apogee). Se midió la humedad del suelo una vez por mes tomando una muestra por tratamiento nodriza y sol, así como la temperatura del suelo una vez por mes a una profundidad de 7-10 cm. La humedad del suelo fue calculada por medio de gravimetría, secando la muestra durante 72 hrs a 105 °C en un horno de secado. Se reviso condiciones de

temperatura y precipitación por medio de estaciones meteorológicas cercanas al sitio de estudio una vez por mes.

## **REFORESTACION**

### ***Sitio de estudio.***

Se seleccionaron dos sitios con vegetación de sucesión secundaria: 1) bosque de *J. deppeana* (22° 9'46.06"N, 102°32'59.35"O, 2498 m) y 2) matorral de *A. pungens* (22°12'22.38" N, 102°35'50.5"O, 2586 m), dentro de vegetación templada del ANP Sierra Fría, Aguascalientes como sitios a reforestar.

### ***Especies de estudio y diseño de reforestación.***

Se utilizaron dos especies nativas: 1) *Q. eduardii*, de 10 meses y 2) *Quercus potosina*, 24 meses. Estas son las especies de encino con mayor distribución dentro del estado de Aguascalientes (Martínez-Calderón et al., 2017). *Q. potosina* fue donado por parte de CONAFOR Aguascalientes y al momento de la reforestación se presentaban en bolsas de vivero (15\*30 cm) y *Q. eduardii* fue cultivado en tubetes intercambiables de 380 ml de capacidad en el Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes.

La siembra de plántulas se llevó cabo el 20 y 21 de Julio del 2021, cuando ya se ha comenzado la temporada de lluvias (Rivas-Rivas et al., 2017). En cada sitio se seleccionaron 15 árboles que funcionaron como nodriza, *J. deppeana* y *A. pungens* respectivamente, así mismo dentro de ambos sitios se buscaron claros para usarlos a manera de control. En cada condición se usaron tres réplicas de 5 plántulas por especie a evaluar. Bajo de cada nodriza se plantó un individuo de cada especie (2 plántulas por nodriza) orientados a la zona norte de la copa. Las plántulas presentaron una separación de 1.5 m entre ellas y de 1.20-1.50 m al tronco base de la nodriza. En los claros se usó una separación de 1.5-2 m entre individuos.

***Variables de medición.*** Se midió la supervivencia cada mes y crecimiento (diámetro basal y altura) de cada individuo cada tres meses durante un año (Salcido Ruiz et al., 2021). La primera medición se llevó cabo después del trasplante, esta fue considerado el punto de inicio del experimento (Rivas-Rivas et al., 2017). Cada planta fue numerada y para facilitar la

medición del diámetro basal se colocó un marca permanente en la base (Chávez-García & Mendoza, 2017).

**Variables ambientales:** Se tomó la profundidad del suelo, temperatura y muestras de suelo para observar contenido de humedad. Para el contenido de humedad y temperatura, se tomaron muestras en cada mes durante el año de experimento. Para la humedad de suelo se formaron tres muestras compuestas en las distintas condiciones, tanto debajo de las nodrizas y en claros usados, estas fueron tomadas a una profundidad de 10 cm. Se calculó el contenido de humedad por medio del método gravimétrico, para ello se pesaron las muestras recién colectadas y se secaron en un horno a 105 °C durante 72 h y posteriormente pesadas. Se midió la cantidad de luz disponible, midiendo radiación fotosintéticamente activa (PAR) por medio de un medidor cuántico (MQ-200 apogee) que mide la densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos (DFFA), una vez por mes. Se monitorearon variables ambientales como precipitación, humedad relativa y temperatura a lo largo del año de experimento por medio de las estaciones meteorológicas dentro de Sierra Fría.

## RESULTADOS

### SIEMBRA DIRECTA.

Las semillas colectadas de *Q. eduardii* presentaron un alto porcentaje de germinación de  $98.33 \pm 2.89$  % y una emergencia del 100 % en condiciones de vivero. En campo la emergencia también fue considerable, encontrándose porcentajes de 46.67 % bajo el dosel de *A. pungens* y de hasta 80 % bajo el dosel de *J. deppeana* (Tabla 4.1).

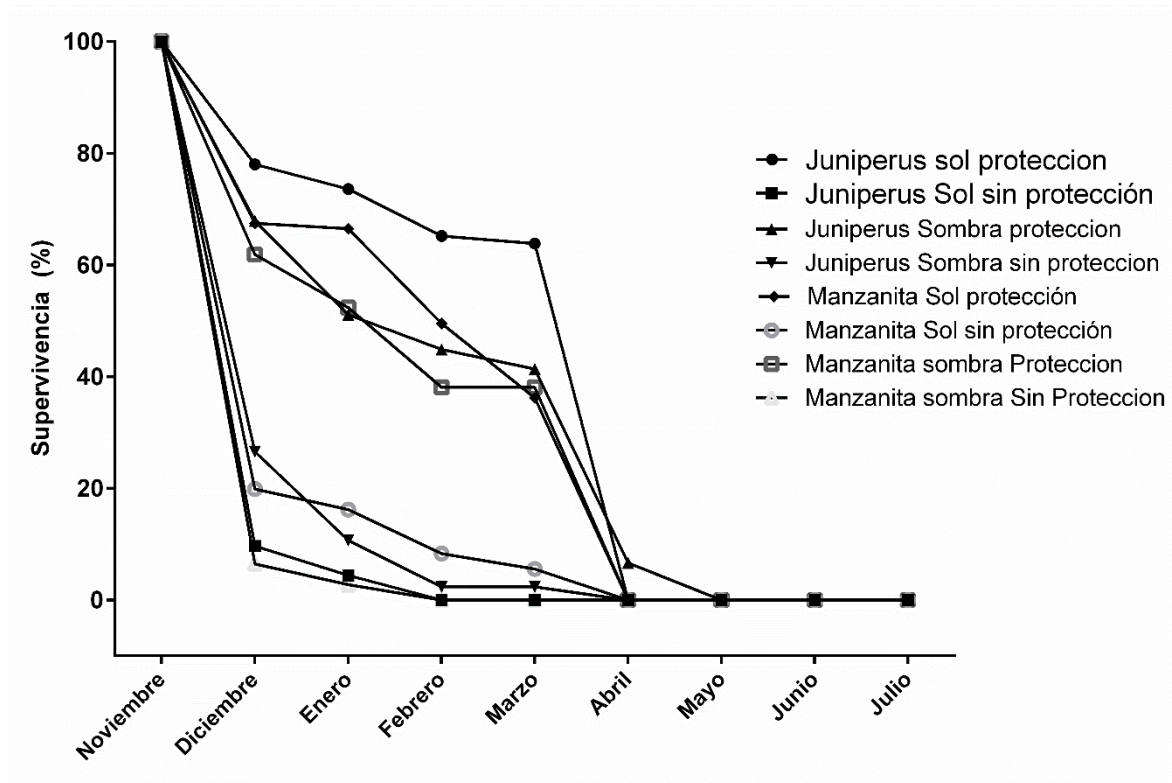
**Tabla 4.1.** Porcentajes de emergencia en vivero y campo. Medias  $\pm$  desviación estándar

Tratamiento	Nodrizas	condición	Protección	Emergencia (%)
Control	Vivero	Malla sombra 50%	-	100 $\pm$ 0
1	<i>A. pungens</i>	Sol	Protección	60 $\pm$ 10
2			Sin protección	48.33 $\pm$ 10.41
3		dosel	Protección	46.67 $\pm$ 20.21
4	<i>J. deppeana</i>	Sol	Sin protección	50 $\pm$ 8.66
5			Protección	80 $\pm$ 13.23



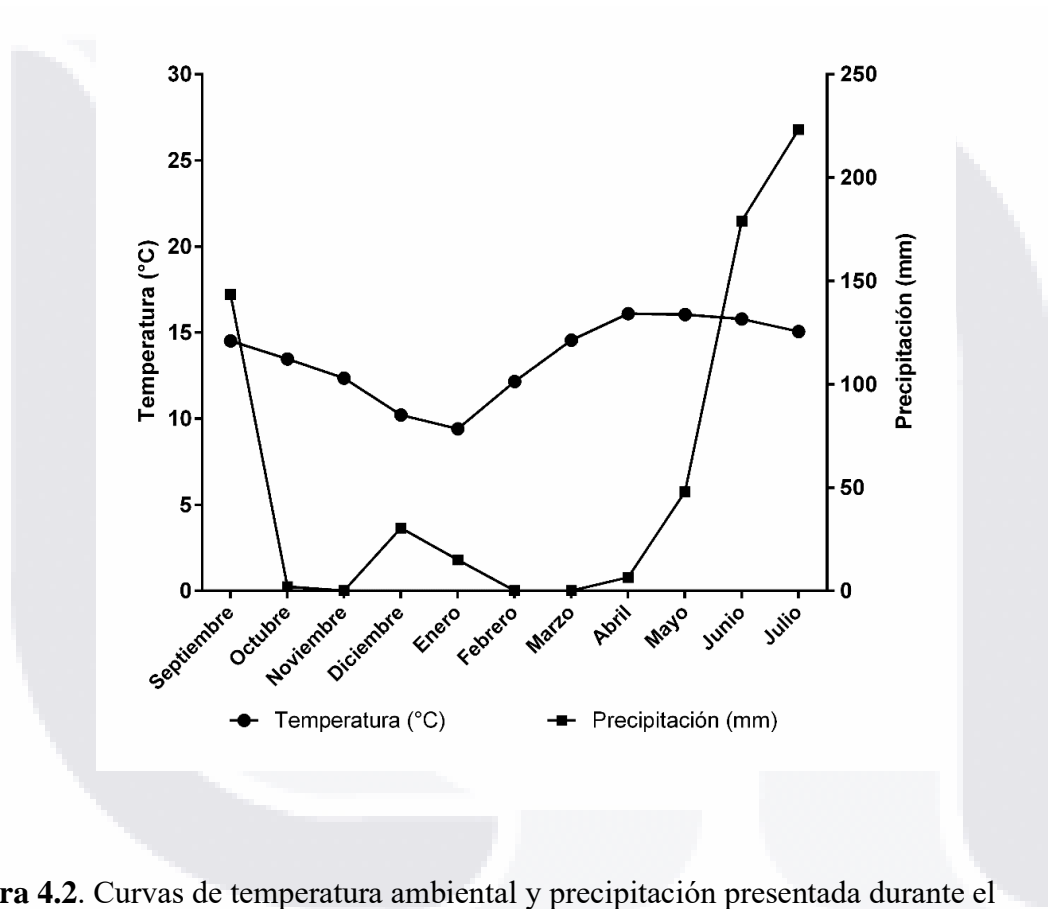
6		Sin protección	66.67 ± 10.41
7	dosel	Protección	83.33 ± 10.41
8		Sin protección	70 ± 10

Las plántulas emergidas presentaron una supervivencia de 80% en los primeros meses, esta fue bajando conforme el avance de los meses hasta el mes de abril en el cual la supervivencia decreció drásticamente hasta 0% (Figura 4.1). Se observó un efecto positivo del uso de las jaulas a manera de protección contra la depredación. Las plántulas emergidas en los tratamientos sin protección de jaula sufrieron depredación por parte de conejos.

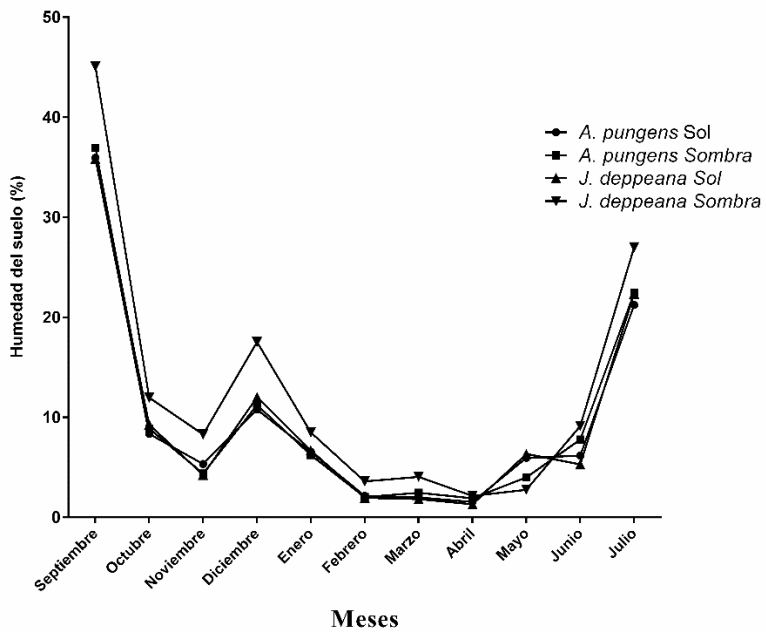


**Figura 4. 1.** Supervivencia de plántulas en distintos tratamientos de nodriza y protección mecánica.

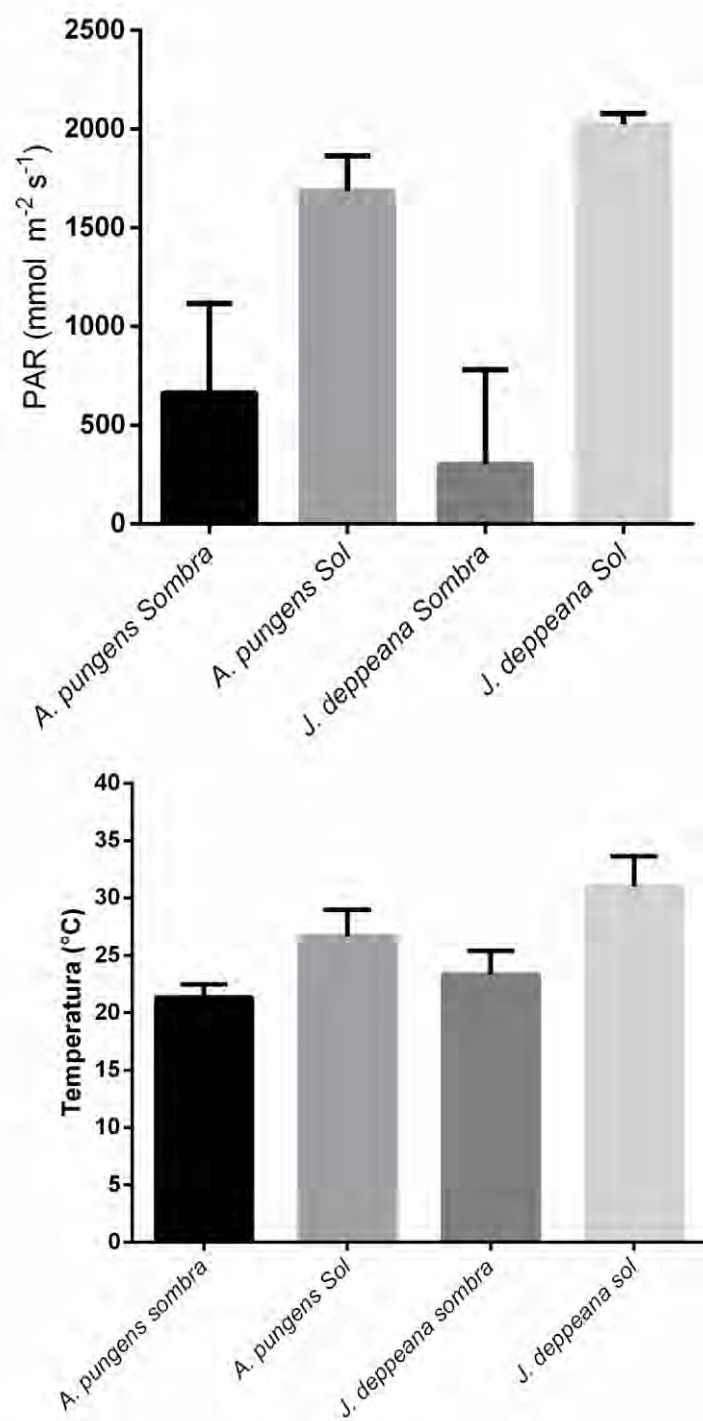
La mortandad que se presentó fue principalmente por dos motivos, la alta tasa de depredación en los tratamientos sin protección y seguido de esto por la falta de lluvia que se presentó en el periodo evaluado (Figura 4. 2). Las nodrizas ayudaron a conservar la humedad del suelo, más sin embargo no aumentó la supervivencia de las plántulas. Se observó que *J. deppeana* presenta un dosel más cerrado, presentó una redacción solar menor que bajo el dosel de *A. pungens*, al igual que una menor temperatura en el suelo, y con ello la humedad se conservó más bajo el dosel de *J. deppeana* (Figura 4.3 y 4.4).



**Figura 4.2.** Curvas de temperatura ambiental y precipitación presentada durante el experimento (septiembre 2020-julio 2021).



**Figura 4. 3.** Curva de porcentaje de humedad del suelo en tratamientos durante los meses de experimento.

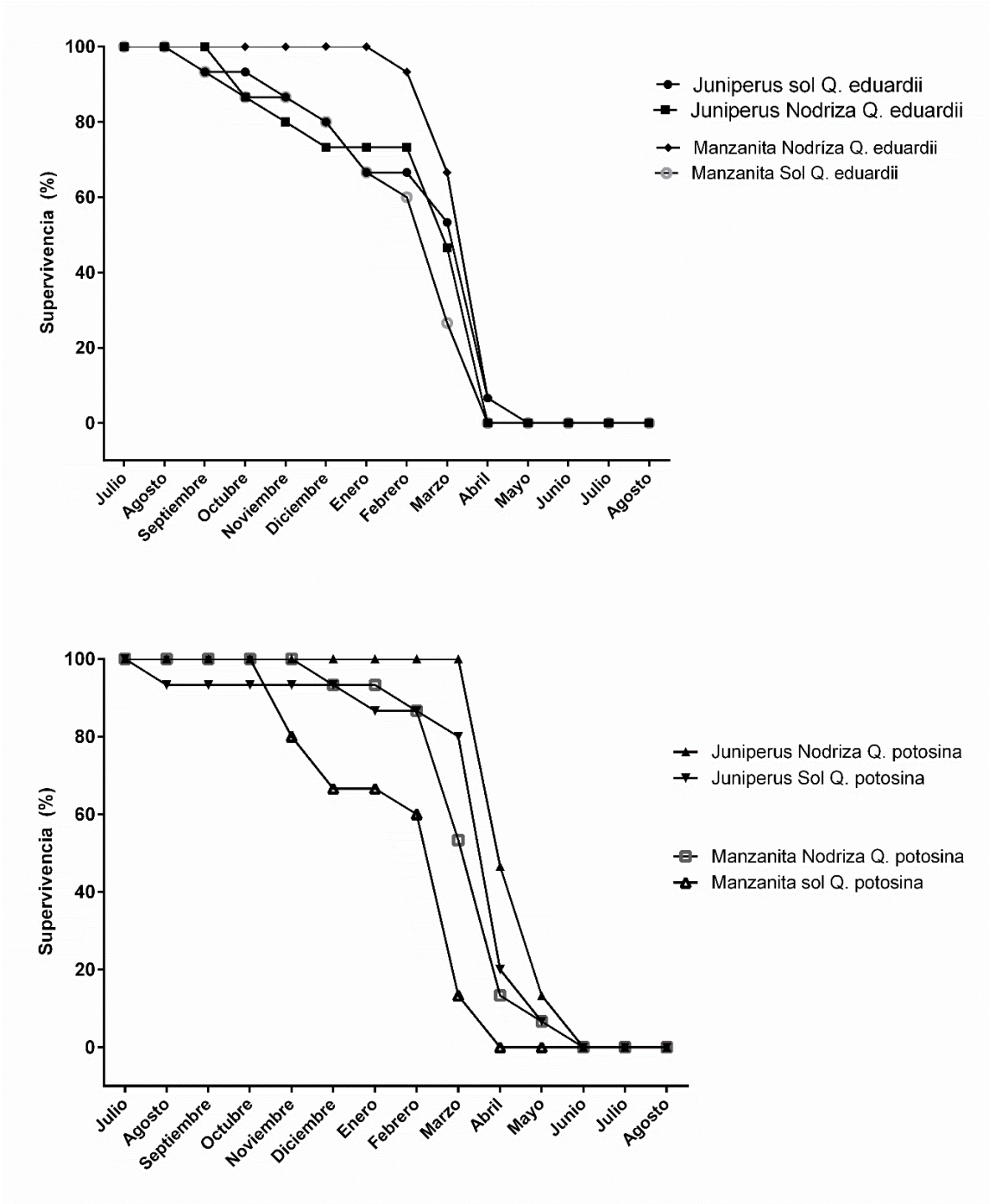


**Figura 4.4.** Radiación fotosintéticamente Activa y Temperatura de suelo en distintas condiciones durante el mes de abril del 2021.

## REFORESTACION

El experimento de reforestación con plántulas de *Q. eduardii* y *Q. potosina*, presentó una alta supervivencia durante los primeros seis meses de plantación, observándose una supervivencia ligeramente mayor en los ejemplares que se sembraron debajo de las nodrizas (*A. pungens* y *J. deppeana*) observándose mayormente bajo el dosel de *A. pungens* (Fig. 4.5). *Q. potosina* presentó mayor resistencia que *Q. eduardii*, posiblemente a que eran plantas con mayor edad y por ser una especie que se distribuye en sitios con menor cantidad de humedad. Al final de la evaluación, a los 13 meses después de la plantación, las dos especies presentaron una mortandad del 100 %.

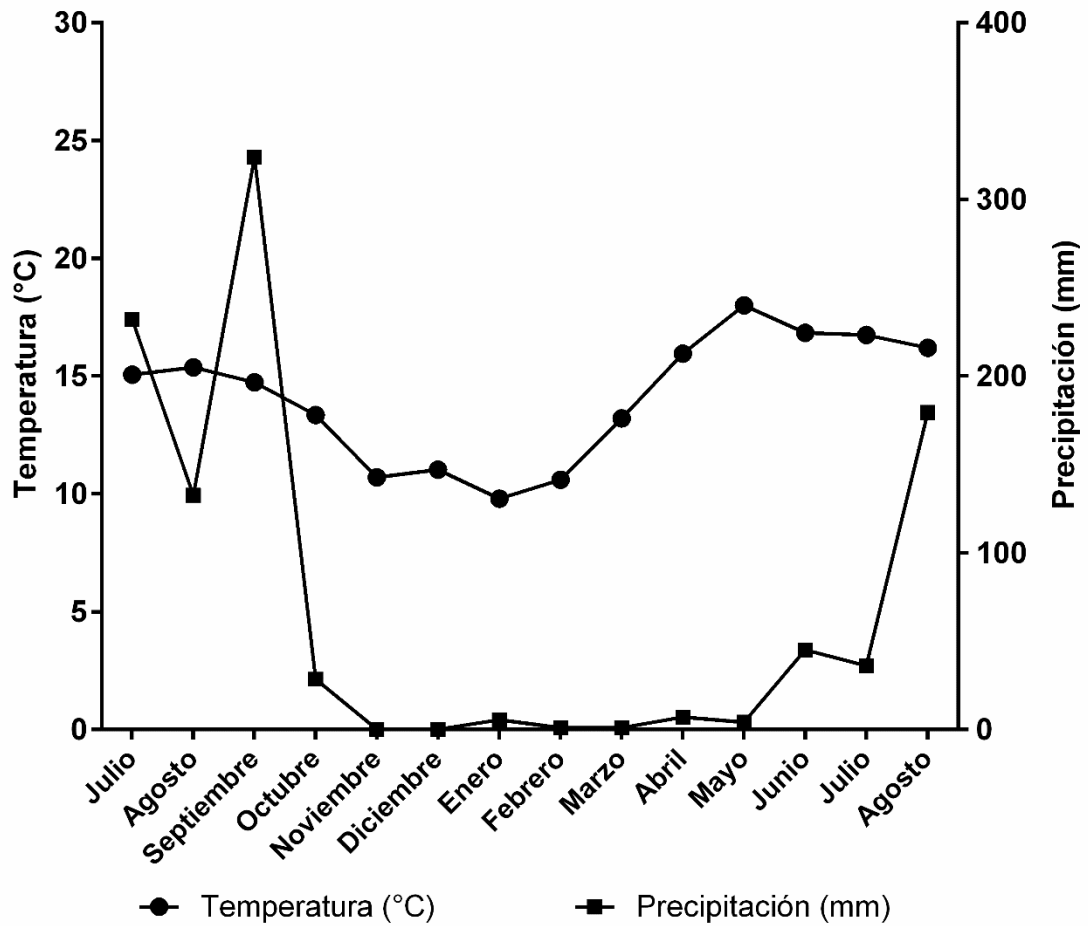




**Figura 4.5.** Supervivencia de plántulas en distintos tratamientos de nodriza y sol directo de *Q. eduardii* y *Q. potosina*.

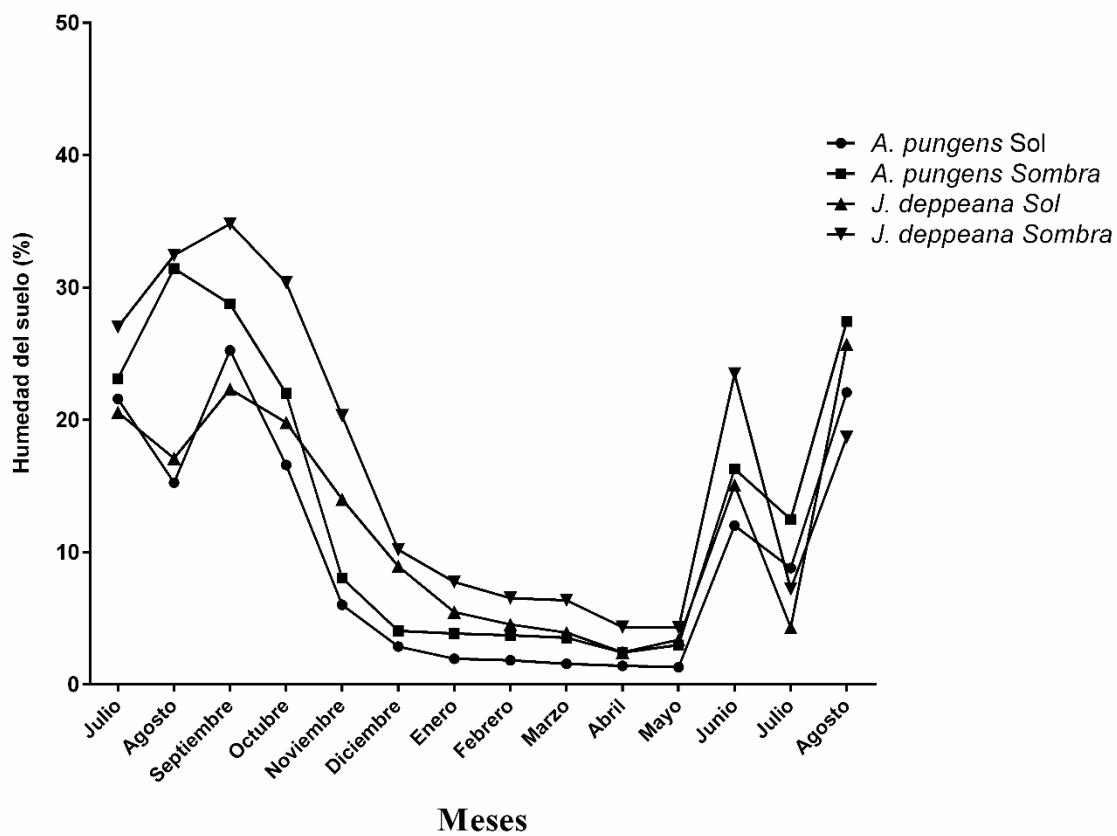
En variables ambientales se ha observado una temporada de sequia de seis meses, con ausencia de lluvias en verano, a esto se le adjudica la principal causa de mortandad en las plantas (Fig. 4.5 y 4.6),

dado que el porcentaje de supervivencia cayó drásticamente en el mes de abril. En la humedad del suelo se ha observado que bajo el dosel de las nodrizas se ha conservados mayor humedad (Fig. 4.7), sin embargo, no parece ser suficiente para que se mantengan sanas las plantas.



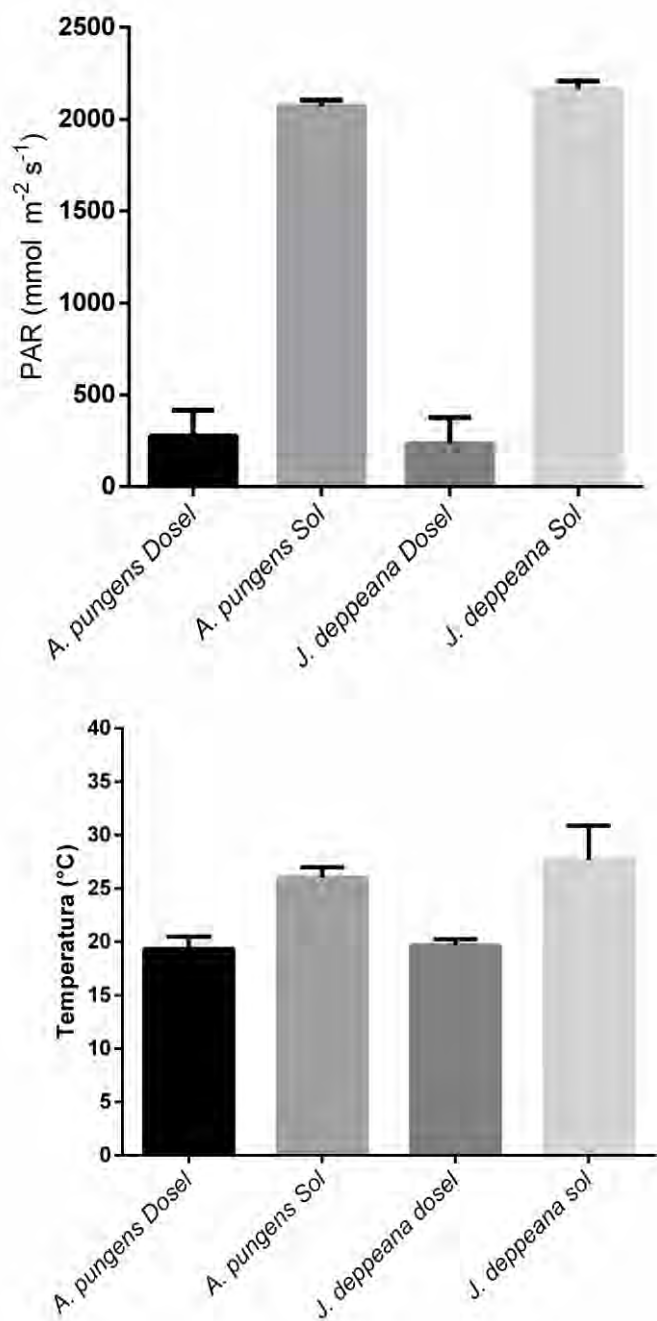
**Figura 4.6.** Curvas de temperatura ambiental y precipitación presentada durante el experimento de reforestación con plántulas (julio 2021-agosto 2022).

La radiación solar entre nodrizas es similar, siendo de 237 a 275  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  comparada con la radiación solar directa en sitios sin nodriza que fue de 2068 a 2165  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , esto durante el mes de abril, cuando se presentó la mortandad de las plántulas. La temperatura del suelo presento una diferencia de 6 a 7 °C entre las nodrizas y los tratamientos sin nodriza (Fig. 4.8).



**Figura 4.7.** Curva de porcentaje de humedad del suelo en tratamientos durante los meses de experimento.





**Figura 4.8.** Radiación fotosintéticamente Activa y Temperatura de suelo en distintas condiciones durante el mes de abril del 2022.

## DISCUSIÓN

Los porcentajes de germinación y emergencia en campo fueron altos, en campo son similares a los encontrados por Badano et al. (2018) en un experimento realizado en San Luis Potosi. En cuanto a los datos en vivero no existe otros estudios que mencionen estos datos, por lo cual es necesario realizar investigación básica sobre características ecológicas y funcionales de las semillas.

La supervivencia de las especies forestales en campo depende de diversos factores bióticos y abióticos en los que se llega a instalar el árbol, entre los cuales está la depredación y competencia entre especies vegetales y variables de sitio como el suelo, la humedad disponible, radiación solar y nutrientes (Atondo-Bueno et al., 2016; Badano et al., 2015; Rivas-Rivas et al., 2017). Lo anterior se aplica tanto para la regeneración natural como los esfuerzos de restauración de especies leñosas en reforestaciones, lo cual dificulta en gran medida las restauraciones exitosas. En los experimentos planteados, tanto en siembra directa como en la reforestación tradicional se observó lo anteriormente mencionado, la supervivencia fue nula en gran parte por la falta de lluvia y con esto la falta de humedad del suelo.

La supervivencia observada en ambos experimentos resultó ser menor a la observada en otros estudios de siembra directa y reforestación tradicional realizados con especies del género *Quercus* (Badano et al., 2015; Rivas-Rivas et al., 2017). En estos trabajos se realizó las reforestaciones en sitios que llegan a presentar una mayor precipitación pluvial, lo cual puede ser una causa de la diferencia de supervivencia. Los años en los que se realizó el presente trabajo fueron considerados años de sequía. Se ha mencionado que especies de encino como *Q. eduardii* puede ser susceptible a efectos por cambio climático, en panoramas de mayor temperatura y menor precipitación, reduciendo su capacidad de reclutamiento (Badano et al., 2018). En el caso de Aguascalientes, tomando en cuenta el panorama de precipitación actual, se podría recomendar riegos de auxilio.

En el experimento planteado sobre siembra directa no se observó remoción de semillas por roedores, siendo este uno de los principales problemas (Löff et al., 2019). Mas sin embargo si se observó una depredación de las plántulas emergidas, siendo depredadas en un 100 %, cabe resaltar que esto no causo la mayor mortandad, ya que se observó rebrote por parte de la

especie. Se ha mencionado que la depredación de plántulas influye en el éxito de técnicas como la siembra directa (Atondo-Bueno et al., 2016; Löff et al., 2019).

En cuanto al costo beneficio de ambas técnicas se reconoce que la siembra directa es una técnica mucho menos costosa que la reforestación tradicional (Ceccon et al., 2016). Aunque se menciona diversos inconvenientes como la depredación y por lo general se ha observado una mayor supervivencia de plántulas reforestadas de manera tradicional (Atondo-Bueno et al., 2018), a pesar de esto se considera una técnica viables (Ceccon et al., 2016; Cole et al., 2011)

El uso de nodrizas se ha utilizado en distintas especies y se reconoce, en la mayoría de las ocasiones, un efecto favorable en el establecimiento de diversas especies (Peláez et al., 2019; Valiente-Banuet et al., 1991). Se encontró que la humedad del suelo fue ligeramente mayor bajo el dosel de las nodrizas, principalmente en *J. deppeana*, también se observó una mayor supervivencia en los meses iniciales de los individuos reforestados de manera tradicional bajo el dosel de las nodrizas, ya que guardaron humedad por mayor tiempo. Las especies utilizadas son pioneras (Díaz-Núñez et al., 2016) y pueden llegar a presentar un rol de nodrizas de manera natural en la zona, dejando una isla de fertilidad y generando suelo debido a la hojarasca que generan estos individuos. Como se había mencionado anteriormente, se podría usar un riego de auxilio en los meses de invierno además del uso de nodrizas para aumentar el éxito de las reforestaciones futuras.

## CONCLUSIÓN

La germinación de las semillas de *Q. eduardii* fue alta con un 98% y con una alta tasa de emergencia en vivero y en campo. La supervivencia al final de los periodos evaluados, tanto como para *Q. eduardii* y *Q. potosina*, fue del 0% en ambas técnicas. La siembra se dificulta por la temporada en la que los encinos de la región presentan semillas, al final de la lluvia, para que la técnica sea viable se requiere un riego de auxilio. Las principales causas de mortandad en los experimentos fueron la falta de lluvia y la principal afectación fue la depredación, principalmente en plántulas recién emergidas. Se recomienda seguir experimentando con diversas técnicas con el fin de encontrar la mejor manera de aumentar la supervivencia. Es recomendable aplicar riegos de auxilio.

## REFERENCIAS

- Atondo-Bueno, E. J., Bonilla-Moheno, M., & López-Barrera, F. (2018). Cost-efficiency analysis of seedling introduction vs. direct seeding of *Oreomunnea mexicana* for secondary forest enrichment. *Forest Ecology and Management*, 409(May 2017), 399–406. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.11.028>
- Atondo-Bueno, E. J., López-Barrera, F., Bonilla-Moheno, M., Williams-Linera, G., & Ramírez-Marcial, N. (2016). Direct seeding of *Oreomunnea mexicana*, a threatened tree species from Southeastern Mexico. *New Forests*, 47(6), 845–860. <https://doi.org/10.1007/s11056-016-9548-2>
- Badano, E. I., Guerra-Coss, F. A., Gelviz-Gelvez, S. M., Flores, J., & Delgado-Sánchez, P. (2018). Functional responses of recently emerged seedlings of an endemic Mexican oak (*Quercus eduardii*) under climate change conditions. *Botanical Sciences*, 96(4), 582–597. <https://doi.org/10.17129/botsci.1988>
- Badano, E. I., Samour-Nieva, O. R., Flores, J., & Douterlungne, D. (2015). Microclimate and seedling predation as drivers of tree recruitment in human-disturbed oak forests. *Forest Ecology and Management*, 356(December 2018), 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.07.031>
- Bonilla-Moheno, M., & Holl, K. D. (2010). Direct Seeding to Restore Tropical Mature-Forest Species in Areas of Slash-and-Burn Agriculture. *Restoration Ecology*, 18(SUPPL. 2), 438–445. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2009.00580.x>
- Calva-Soto, K., & Pavón, N. P. (2018). Ecological restoration in Mexico: An emerging discipline in a deteriorated country. *Madera Bosques*, 24(1). <https://doi.org/10.21829/myb.2018.2411135>
- Ceccon, E., González, E. J., & Martorell, C. (2016). Is Direct Seeding a Biologically Viable Strategy for Restoring Forest Ecosystems? Evidences from a Meta-analysis. *Land Degradation and Development*, 27(3), 511–520. <https://doi.org/10.1002/ldr.2421>
- Chávez-García, E., & Mendoza, A. (2017). Restoration of a degraded oak forest in Mexico City by introducing tree native species. *Botanical Sciences*, 95(4), 595–609.

<https://doi.org/10.17129/botsci.903>

- Chillo, V., Amoroso, M., Arpigliani, D., & Rezzano, C. (2022). Forest active restoration for silvopastoral use in Northwestern Patagonia: relative importance of the nurse effect. *New Forests*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s11056-022-09914-0>
- Cole, R. J., Holl, K. D., Keene, C. L., & Zahawi, R. A. (2011). Direct seeding of late-successional trees to restore tropical montane forest. *Forest Ecology and Management*, 261(10), 1590–1597. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2010.06.038>
- Delgado, M. F., Cuba, M., Hechenleitner, P., & Thiers, O. (2008). Propagación vegetativa de taique (*Desfontainia spinosa*) y tepa (*Laureliopsis philippiana*) con fines ornamentales. *Bosque*, 29(2), 120–126. <https://doi.org/10.4067/s0717-92002008000200004>
- Díaz-Núñez, V., Sosa-Ramírez, J., & Pérez-Salicrup, D. R. (2016). Vegetation patch dynamics and tree diversity in a conifer and oak forest in central Mexico. *Botanical Sciences*, 94(2), 229–240.
- FAO. (2020). *Global Forest Resources Assessment 2020: Main report*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://doi.org/10.4324/9781315184487-1>
- García-De La Cruz, Y., López-Barrera, F., & Ramos-Prado, J. M. (2016). Germination and seedling emergence of four endangered oak species. *Madera y Bosques*, 22(2), 77–87. <https://doi.org/10.21829/myb.2016.2221326>
- Keyes-Hennin, M. R., & Anduaga-Muñoz, J. (1997). Costos de la reforestación semi-mecanizada y manual en potreros de la Chontalpa, México: un estudio comparativo. *Madera y Bosques*, 3(2), 29–45. <https://doi.org/10.21829/myb.1997.321371>
- Löf, M., Castro, J., Engman, M., Leverkus, A. B., Madsen, P., Reque, J. A., Villalobos, A., & Gardiner, E. S. (2019). Tamm Review: Direct seeding to restore oak (*Quercus* spp.) forests and woodlands. *Forest Ecology and Management*, 448(June), 474–489. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.06.032>
- Luna-Ruiz, J. de J., Moreno-Rico, O., Sosa-Ramírez, J., & Sánchez-Martínez, G. (2016). Fenología y estrategias de propagación de la manzanita en la Sierra Fría,

Aguascalientes. In J. Sosa-Ramírez, O. Moreno-Rico, G. Sánchez-Martínez, J. de J. Luna-Ruiz, & M. E. Siqueiros-Delgado (Eds.), *Contribución al conocimiento ecológico del chaparral de manzanita (Arctostaphylos pungens Kunth) en la Sierra Fría, Aguascalientes* (p. 104). Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Martínez-Calderón, V. M., Siqueiros-Delgado, M. E., & Martínez-Ramírez, J. (2017). Checklist of the genus *Quercus* (Fagaceae) of Aguascalientes, México. *Check List*, 13(1). <https://doi.org/10.15560/13.1.2045>

Martínez-Calderón, V. M., Sosa-Ramírez, J., Torres-González, J. A., Mendieta-Vázquez, A. G., & Sandoval-Ortega, M. H. (2020). Propagación de *Forestiera phillyreoides*: una especie potencial para la restauración en el Centro-Norte de México. *Madera y Bosques*, 26(2), 1–13. <https://doi.org/10.21829/myb.2020.2622052>

Peláez, M., Dirzo, R., Fernandes, G. W., & Perea, R. (2019). Nurse plant size and biotic stress determine quantity and quality of plant facilitation in oak savannas. *Forest Ecology and Management*, 437(February), 435–442. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.02.010>

Reyes, G. D. J., Prieto Ruíz, J. Á., Vazquez Cisneros, I., López López, M. Á., Hernández Díaz, J. C., & Chávez Simental, J. A. (2018). Alternativas de fertilización para producir *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M. C. Johnst en vivero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 9(49). <https://doi.org/10.29298/rmcf.v9i49.175>

Rivas-Rivas, M. B., Ramírez-Marcial, N., Perales, H., Levy-Tacher, S. I., & Bonfil, C. (2017). Survival and growth of three *Quercus* species under contrasting coverage conditions in southern Mexico. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 23(02), 275–288. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2017.01.001>

Rosete-Vergés, F., Pérez-Damián, J., Villalobos-Delgado, M., Navarro-Salas, E., Salinas-Chávez, E., & Remond-Noa, R. (2014). El avance de la deforestación en México 1976-2007. *Madera y Bosques*, 20(1), 21–35. <http://www.scielo.org.mx/pdf/mb/v20n1/v20n1a3.pdf>

Salcido Ruiz, S., Prieto Ruíz, J. Á., Santana Aispuro, E., Chávez Simental, J. A., & Madrid Aispuro, R. E. (2021). Supervivencia y crecimiento de *Pinus engelmannii* Carr. en una

reforestación pormicorrización y fertilización. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 12(64). <https://doi.org/10.29298/rmcf.12i64.847>

Saldías, G. (2016). Propagación vegetativa por esquejes de *Monttea chilensis* Gay. *Gayana Bot.*, 73(1), 25–31.

Valiente-Banuet, A., Bolongaro-Crevenna, A., Briones, O., Ezcurra, E., Rosas, M., Nunez, H., Barnard, G., & Vazquez, E. (1991). Spatial relationships between cacti and nurse shrubs in a semi-arid environment in central Mexico. *Journal of Vegetation Science*, 2(1), 15–20. <https://doi.org/10.2307/3235893>

Ventura-Ríos, A., Plascencia-Escalante, F. O., Hernández De La Rosa, P., Ángeles-Pérez, G., & Aldrete, A. (2017). ¿es la reforestación una estrategia para la rehabilitación de bosques de pino? Una experiencia en el centro de México. *Bosque*, 38(1), 55–66. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002017000100007>

Zavala-Chávez, F. (2004). Desección de bellotas y su relación con la viabilidad y germinación en nueve especies de encinos mexicanos. *CIENCIA Ergo-Sum*, 11(2), 177–185.

Zavala-Chávez, F., & García-Moya, E. (1997). Plántulas y Rebrotos en la Regeneración de Encinos en la Sierra de Pachuca, Hidalgo. *Agrociencia*, 31, 323-329.

## CAPITULO V. CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

Uno de los problemas identificados durante la tesis fue la necesidad de seguir generando más información básica sobre las especies nativas del bosque templado de Aguascalientes, logrando tener información sobre las especies tal como la fenología, ecología y fisiología de las semillas, supervivencia en su hábitat y regeneración natural, condiciones ambientales en la que se desarrollan las especies y la dinámica de la comunidad. Esta información nos serviría como marco de referencia para lograr propagar especies nativas, conociendo cuando colectar las semillas, tiempo de vida útil y que manejo es necesario darles. Conocer sus formas de reproducción natural y requerimientos en su medio ambiente nos ayudaría a lograr su reproducción en vivero. La información sobre la dinámica de su comunidad también ayudaría a conseguir restauraciones exitosas, eligiendo las especies más adecuadas de acuerdo con cada etapa sucesional que se desee restaurar o condición en las que se encuentre el sitio. También sería recomendable tener información sobre la capacidad de tolerancia al estrés hídrico que presentan las plántulas, dada la alta mortandad por falta de lluvia que se llegó a observar. De igual manera es necesario aumentar el conocimiento sobre el manejo en vivero de las especies silvestres; fertilización, sustratos, manejo cultural y manejo previo a la siembra o trasplante. Dando un ejemplo, en caso de *A. xalapensis* sería recomendable un tratamiento de peletización a sus semillas para mejorar su manejo, dado al tamaño tan pequeño de su semilla.

Se recomienda ampliamente seguir con experimentos de reforestación con diversas especies, utilizando una mayor cantidad técnicas para mantener la humedad del suelo (además del uso de nodrizas) y asegurar la supervivencia de las plántulas, tales como el uso de hidrogel, riegos de auxilio, uso de materia orgánica, uso de rocas cumpliendo una función similar de la materia orgánica superficial al retener agua, el uso tratamientos previos al sitio por medio de sanjas y líneas de retención de suelo, así como probar aumentar su tolerancia al estrés con el uso de enraizantes, adición de nutrientes y uso de microorganismos como las micorrizas.

Es necesario seguir con los esfuerzos de restauración frente al panorama ambiental en el que nos encontramos actualmente.







## Effect of storage and pre-germination treatments on seeds of *Arbutus xalapensis* from north-central Mexico

Victor Manuel Martínez-Calderón<sup>1</sup> · Joaquín Sosa-Ramírez<sup>2</sup> · José de Jesús Luna-Ruiz<sup>2</sup> · Diego Rafael Pérez-Salicrup<sup>3</sup> · Manuel Higinio Sandoval-Ortega<sup>4</sup>

Received: 8 February 2022 / Accepted: 10 December 2022  
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2022

### Abstract

*Arbutus xalapensis* is the species of the genus with the greatest distribution in Mexico. Despite this, knowledge about its seeds and propagation is scarce. The objective of the present study was to observe the effect of storage on the germination of *A. xalapensis* seeds and the effect of pre-germination treatments on stored seeds. The seeds were stored at room temperature for a period of 24 months, and germination tests were performed at 0, 6, 12, 18 and 24 months. Four pre-germination treatments were tested on seeds previously stored for 12 and 24 months. These treatments consisted of control, immersion in gibberellic acid for 24 h, cold stratification for 30 days and a combination of cold stratification for 30 days and gibberellic acid for 24 h. The germination percentage and mean germination time (MGT) were analyzed. Germination decreased from 93 to 52% between the periods studied, reducing by approximately 10% every six months. In the MGT, an increase in the time necessary to initiate germination was observed. Pre-germination treatments with gibberellic acid reduced MGT, but no significant increase in germination was observed with the treatments. Seeds of *A. xalapensis* are sensitive to storage, losing viability and causing higher MGT. Pre-germination treatments mainly helped to reduce MGT. It is necessary to conduct further studies in order to increase knowledge of this species and the genus *Arbutus* L. in Mexico.

**Keywords** Madroño · Ericaceae · Temperate forests · Gibberellic acid · Propagation · Germination

### Introduction

Mexico has approximately 23,314 species of vascular plants, around 7,151 of which are shrubby, and 4,044 trees, mainly distributed in the temperate forests of the country (Villaseñor and Ortiz 2014; Villaseñor 2016). Despite this great floristic diversity, studies of propagation are scarce (Vázquez-Yanes et al. 2001; Bonfil and Trejo 2010; Cervantes et al. 2014). This represents a problem, since adequate information regarding the propagation of native

Extended author information available on the last page of the article

flora is essential to the success of projects of conservation, restoration, and reintroduction of species (Vázquez-Yanes et al. 2001; Bonfil and Trejo 2010; Núñez-Cruz et al. 2018). Mexico is considered to present problems of environmental deterioration, and restoration of its ecosystems is therefore required (Calva-Soto and Pavón, 2018).

The effect of storage time on seeds varies according to species and seed type (orthodox or recalcitrant), as well as the storage conditions. In some cases, storage of long duration can cause a reduction in the subsequent percentage of germination (Pasquini and Defossé, 2012; Bertsouklis and Papafotiou 2013; Cervantes et al. 2014; Rios García et al. 2018), which directly affects the production of seedlings required for reforestation of degraded sites. However, the use of pre-germination treatments can to some degree mitigate these reduced percentages in stored seeds (Pasquini and Defossé 2012; Bertsouklis and Papafotiou 2013).

Temporal changes in seed germination in different species have rarely been studied (Cervantes et al. 2014). In the case of species from temperate ecosystems, there is usually a scarcity of available information. The *Quercus* L. has been the genus mainly addressed, due to the inherent storage difficulty of its recalcitrant seeds (Zavala-Chávez 2004; Díaz-Pontones and Reyes-Jaramillo 2009), but there remains insufficient information for other genera in the country. Most forest nurseries in Mexico are rural and lack facilities for the adequate storage of seeds. Storage is therefore commonly conducted at room temperature in cans or glass jars. This necessitates the generation of information regarding the effects of storage on seed germination that could allow improved management of germplasm under low-tech conditions (Cervantes et al. 2014).

The Ericaceae family is one of great ecological, ethnobotanic and economic importance in the mountainous areas of Mexico, since various species are used for medicinal and food purposes, as well as having considerable potential value as ornamentals (González-Elizondo et al. 2004; García-Regalado 2014; González-Elizondo and González-Elizondo 2014). The genus *Arbutus* L. is an important component of temperate climate forests, comprising approximately 12 known species in the world, seven of which are distributed in Mexico. Five of these seven species are endemic to the country (González-Elizondo and González-Elizondo 2014); however, it remains a poorly studied genus despite its importance and high diversity at the national level.

*Arbutus xalapensis* Kunth is the most variable and widely distributed species of the genus; its distribution area extends from the southwestern United States to Honduras and El Salvador. It is found in tropical montane cloud, humid oak, pine, pine-oak, cedar, oak and fir forests, as well as in secondary vegetation derived from pine-oak forest at 1600–3000 m asl in elevation (González-Elizondo and González-Elizondo 2014). This species has barely been studied and aspects such as its reproduction and propagation are unknown, apart from the effect of fruit ripening in relation to its germination (Tovar-Rocha et al. 2014). On the other hand, the effect of seed storage and how it can affect subsequent germination of the species has never been studied. This information would be important for its production in forest nurseries and use in restoration, reintroduction and conservation programs.

The objective of this study was therefore to observe the effect of storage on the germination of *A. xalapensis* seeds and the effect of pre-germination treatments on seeds with storage. The hypothesis is that *A. xalapensis* seeds will be affected by the storage period, producing a reduced percentage of germination, and that pre-germination treatments will help to increase germination in seeds that have undergone a period of storage.

**Fig. 1** Details of *Arbutus xalapensis* Kunth. (A) Specimen in the field, (B) Detail of bark, (C) Ripe fruits, (D) Seeds



### Materials and methods

**Collection of biological material.** Ripe fruits of red and orange coloration were collected (Fig. 1: Tovar-Rocha et al. 2014). The fruits were taken directly from the canopy of 15 adult specimens of *A. xalapensis*, 7–9.5 m in height and 20–35 cm in diameter at breast height (DBH). Collection was conducted within two sites of the “Monte Grande” communal property (22°16′14.46″N, 102°37′0.15″W, 2890 m asl and 22°16′42.13″N, 102°36′28.37″W, 2950 m asl) within the Sierra Fria Protected Natural Area, in the state of Aguascalientes, Mexico. The collection site is in an oak forest site with an abundance of specimens of the study species (Martínez-Calderón et al. 2021). Fruit collection was completed at the beginning of October 2019.

To obtain morphometric information on the fruits, as well as the number of seeds they contain, a random sample of 100 fruits was taken, and width and height measured using a digital vernier (Surtek 122,200). The fruits were weighed on an analytical balance (Precisa XT220A) and the seeds manually extracted from each fruit for quantification (Martínez-Calderón et al. 2020). To obtain the weight of the seeds, 10 replicates of 100 seeds ( $n=1000$ ) were weighed using an analytical balance (Apodaca-Martínez et al. 2019).

**Storage effect.** To observe the effect of storage on seed germination, the seeds were stored in glass jars with hermetic caps at room temperature (Cervantes et al. 2014) (Fig. 2). Only seeds that sank in an immersion test once separated from the fruit ( $\approx 95\%$  of the total) were stored, assuming these seeds to be viable. To evaluate changes in germination over time, seed germination was measured after 0, 6, 12, 18 and 24 months of storage (Cervantes et al. 2014). The first germination test was carried out one week after collection, and these seeds were considered the control of 0 months of storage.

**Pre-germination treatments.** To break possible dormancy caused by seed storage (Bertsouklis and Papafotiou 2013), the following four pre-germination treatments were used on seeds with 12 and 24 months of storage: (1) Control, (2) immersion in 500 ppm of gibberellic acid ( $GA_3$ ) for 24 h, (3) cold stratification for 30 days and (4) cold stratification

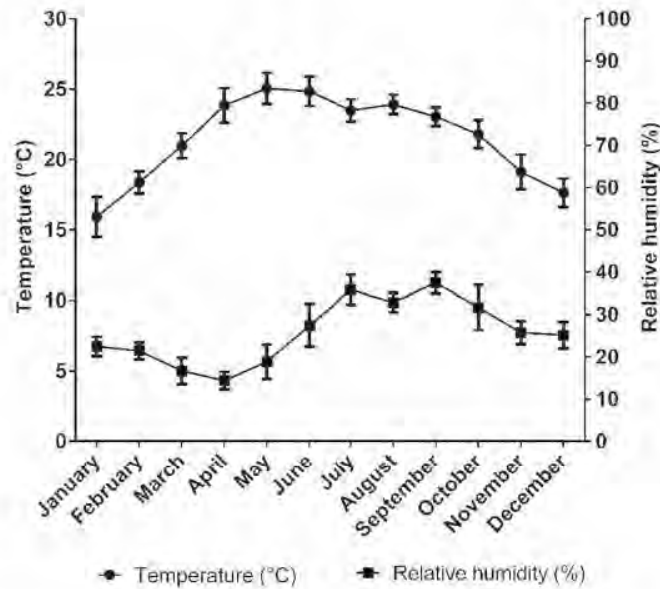


Fig. 2 Monthly temperature and relative humidity in the storage room. Mean ± standard deviation

for 30 days plus immersion in 500 ppm of GA<sub>3</sub> for 24 h. For cold stratification, the seeds were placed in paper envelopes and stored in a refrigerator at 4 °C. These pre-germination treatments have been used in *Arbutus* species, obtaining an increase in germination of seeds with apparent physiological dormancy (Bertsouklis and Papafotiou 2013; Smiris et al. 2006; Pipinis et al. 2017; Tilki 2004). Only storage times of 12 and 24 months (October) were used since this would allow the use of stored seeds to propagate plants with a long production cycle (9 months), a practice that is commonly employed to produce temperate forest species for restoration purposes in Mexico (De Jesús-Albino et al. 2021; Muñoz et al. 2015).

**Germination tests.** Four replicates of 50 seeds (n=200) were used, with 95 × 15 mm Petri dishes utilized as the experimental unit (Narbona et al. 2003). Prior to planting, the seeds were washed with 10% commercial chlorine for three minutes then placed in Petri dishes on brown paper and cotton. Petri dishes were prepared by first placing a layer of cotton, then brown paper was placed on the cotton previously moistened with 5 ml of distilled water. The fungicide Interguzan 30–30® (12 g/l) was added to the seeds to prevent fungal attack (Martínez-Calderón et al. 2020). The Petri dishes with seeds were maintained at a temperature of 23–25 °C with a photoperiod of eight hours (5.67 ± 2.69 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) for a period of 30 days (Tovar-Rocha et al. 2014; Pipinis et al. 2017). Germination was measured every two days, extracting the germinated seeds to facilitate quantification.

At the end of the germination tests, germination percentage and mean germination time (MGT) were measured (Edmond and Drapala 1958):

$$MGT = \frac{\sum X_i T_i}{\sum X_i}$$

New Forests

**Table 1** Morphometric data of the fruit, number of seeds and weight of newly collected seeds of *Arbutus xalapensis* Kunth from Sierra Fria, Aguascalientes, Mexico

Fruit			Seed	
Width (mm)	Length (mm)	Weight (g)	Number of seeds	Weight of 100 seeds (g)
10.15±1.37	6.96±1.19	0.48±0.18	13.29±7.47	0.110±0.004

Where Xi is the number of germinated seeds per observation and Ti is the number of days elapsed since sowing.

*Viability tests.* At the end of the testing period (25 months), the physical integrity of the seeds was checked, and viability tests were carried out by immersion in water and a tetrazolium test. To check the physical integrity, longitudinal cuts were made in the seeds in order to verify that the embryo, endosperm and testa were undamaged. The tetrazolium test consisted of a prior 24 h immersion in 1% tetrazolium chloride at 23–25 °C in darkness. Subsequent longitudinal cuts were made using a scalpel, and half of the seed was separated and left immersed in 1% tetrazolium chloride for 2 h. The seed was considered viable when staining of the embryo and part of the endosperm was detected. For the three tests, four replicates of 25 seeds were used (Apodaca-Martinez et al. 2019).

*Statistical analysis.* Means and standard deviations (SD) were calculated from the size and weight values obtained from the 100 fruits and 100 seeds weighed, as well as the germination data. To evaluate the effect of storage and pre-germination treatments on germination, the percentage values were transformed into proportion values (0 to 1) and subsequently transformed by means of the *Arc sin* function in order to comply with the assumption of normality. Similarly, the MGT was transformed by square root when required. A one-way ANOVA analysis and a comparison of means using the Tukey method ( $p < 0.05$ ) were then performed. These analyses were carried out using the InfoStat program (Di-Rienzo et al. 2020).

**Results**

The fruits were 10.15 in width and 6.96 mm in length and contained an average of 13 seeds. The seeds are very small in size, with a recorded fresh weight of 0.110 g per 100 seeds (Table 1).

\* Means ± standard deviation.

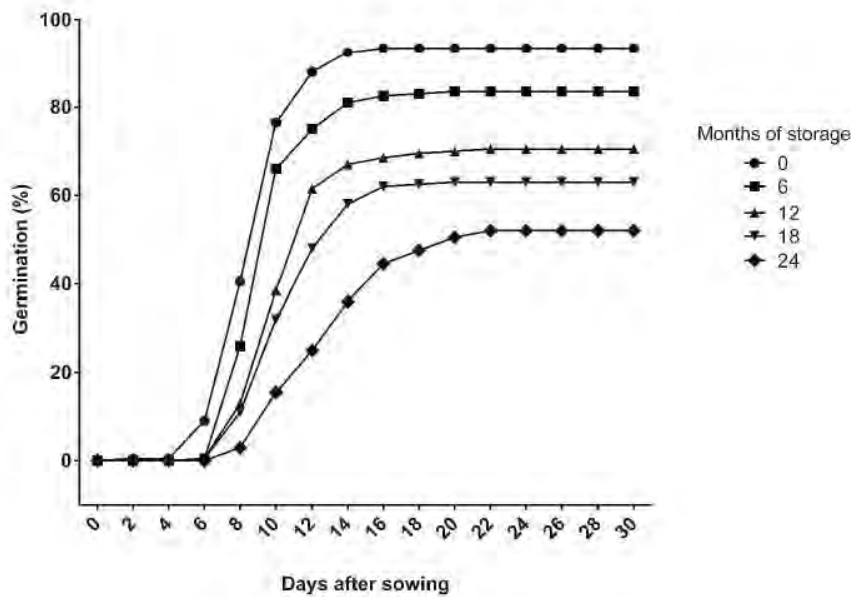
*Storage effect.* There were significant differences in the percentage of germination ( $F_{4, 15} = 44.82; p < 0.001$ ) and MGT ( $F_{4, 15} = 17.19; p < 0.0001$ ) among the different storage times studied (Table 2). A reduction in the germination percentage of approximately 10% is observed every six months (Table 2; Fig. 3). Germination decreased by 41.5% in the 24 months of storage. The MGT was affected by storage time, extending the time taken for germination from 9.42 to 13.52 days (Table 2; Fig. 3). In the seeds, weight loss was observed at 24 months relative to that of freshly collected seeds, in which a weight of  $0.0714 \pm 0.0008$  g per 100 seeds was observed.

*Effect of pre-germination treatments.* The percentage of germination in seeds stored for 12 months that were subjected to pre-germination treatments differs significantly ( $F_{3, 12} = 4.41; p = 0.0262$ ). Among the pre-germination treatments themselves (Immersion in 500 ppm of  $GA_3 \times 24$  h, cold 30 days and cold 30 days + 500 ppm of  $GA_3 \times 24$  h), however, there

**Table 2** Effects of storage on the germination of *Arbutus xalapensis* Kunth seeds

Storage time	Germination (%)	MGT (days)
0 months	93.5 ± 1 <sup>a</sup>	9.42 ± 0.22 <sup>c</sup>
6 months	83.5 ± 7.90 <sup>b</sup>	10.12 ± 0.52 <sup>b,c</sup>
12 months	70.5 ± 5.74 <sup>c</sup>	10.97 ± 0.11 <sup>b</sup>
18 months	63 ± 3.46 <sup>c,d</sup>	11.30 ± 0.52 <sup>b</sup>
24 months	52 ± 2.83 <sup>d</sup>	13.52 ± 1.62 <sup>a</sup>

\* Means ± standard deviation. MGT: Mean germination time expressed in days. Within columns, means that share a lower-case letter do not differ significantly ( $p < 0.05$ )



**Fig. 3** Cumulative germination curve in *A. xalapensis* seeds with different durations of storage

were no significant differences in the percentage of germination. The control only differed significantly from the treatment of cold 30 days + 500 ppm of GA<sub>3</sub> × 24 h (Table 3).

The MGT at 12 months also presented significant differences ( $F_{3, 12} = 118.93; p < 0.0001$ ) (Table 3). All treatments were statistically different. The treatment that required the lowest MGT was cold 30 days + 500 ppm of GA<sub>3</sub> × 24 h, while the cold 30 days treatment had the longest MGT, followed by the control treatment. Germination began from days 6 and 8, with maximum germination on day 16 in most treatments (Fig. 4a).

At 24 months of storage, the pre-germination treatments presented no significant differences in germination ( $F_{3, 12} = 0.34; p = 0.7968$ ), but did in the MGT ( $F_{3, 12} = 33.17; p < 0.0001$ ). The treatments with GA<sub>3</sub> produced the lowest MGT, presenting differences with respect to the control and cold treatments for 30 days (Table 3). Germination began from

New Forests

**Table 3** Effects of pre-germination treatments on the germination of stored seeds of *Arbutus xalapensis* Kunth

Storage time	Treatment	Germination (%)	MGT (days)
12 months	Control	70.5±5.74 <sup>b</sup>	10.97±0.11 <sup>b</sup>
	Immersion in 500 ppm of GA <sub>3</sub> ×24 h	81.5±3 <sup>a,b</sup>	9.73±0.21 <sup>c</sup>
	Cold 30 days	81.5±3.42 <sup>a,b</sup>	11.82±0.25 <sup>a</sup>
	Cold 30 days+500 ppm of GA <sub>3</sub> ×24 h	83.5±8.06 <sup>a</sup>	9.26±0.26 <sup>d</sup>
24 months	Control	49.50±7.55 <sup>a</sup>	14.47±1.15 <sup>b</sup>
	Immersion in 500 ppm of GA <sub>3</sub> ×24 h	51.50±5.74 <sup>a</sup>	10.63±0.66 <sup>a</sup>
	Cold 30 days	53.50±4.43 <sup>a</sup>	14.20±0.21 <sup>b</sup>
	Cold 30 days+500 ppm of GA <sub>3</sub> ×24 h	52.50±5.26 <sup>a</sup>	10.75±0.62 <sup>a</sup>

\* Means ± standard deviation. MGT: Mean germination time expressed in days. Within columns, means that share a lower-case letter do not differ significantly ( $p < 0.05$ )

days 6 and 8, with maximum germination recorded on days 18 and 20 in most treatments (Fig. 4b).

In the viability tests carried out at the end of the evaluation period, the seeds presented 100% physical integrity in the testa, endosperm, and embryo, with no damage apparent. A mean viability value of 99±2% was obtained in the immersion test, and 52±7.30% in the tetrazolium test.

**Discussion**

In terms of size, the fruits of *A. xalapensis* collected in this study coincide with that previously reported (González-Elizondo and González-Elizondo 2014), and present a diameter similar to that reported by Tovar-Rocha et al. (2014) in individuals of Michoacán, although with a lower weight. The number of seeds per fruit is greater than that reported in other sources (Niembro-Rocas et al. 2010), and further study is therefore necessary in the fruits and seeds of *A. xalapensis*, and in the genus *Arbutus* in general, in order to improve our knowledge regarding the seeds of its species in Mexico. Given that *A. xalapensis* is the species with the greatest distribution and morphological variation within the genus (González-Elizondo and González-Elizondo 2014), the species can present variation in the size of fruits, and number and weight of seeds, as well as in germination according to distribution zone and accession (Cervantes et al. 2014; Pozo-Gómez et al. 2019).

Tovar-Rocha et al. (2014) report fruit collection during May and June, while in the present study collection took place at the beginning of October. This could imply variation between populations, but there is a lack of phenological knowledge regarding the species, which precludes the drawing of real comparisons, since the species may have more than one fruiting season. Information pertaining to fructification, number of seeds per fruit and seed weight is of value to the production of this species in the nursery. The small seeds of *A. xalapensis* make their management a challenge. In these cases, the use of seed pelleting could be recommended in order to facilitate their management in the nursery.

Freshly collected seeds of *Arbutus xalapensis* present a high percentage of germination, particularly during the first year of storage. The germination obtained in this study was higher than that reported by Tovar-Rocha et al. (2014), where percentages of between



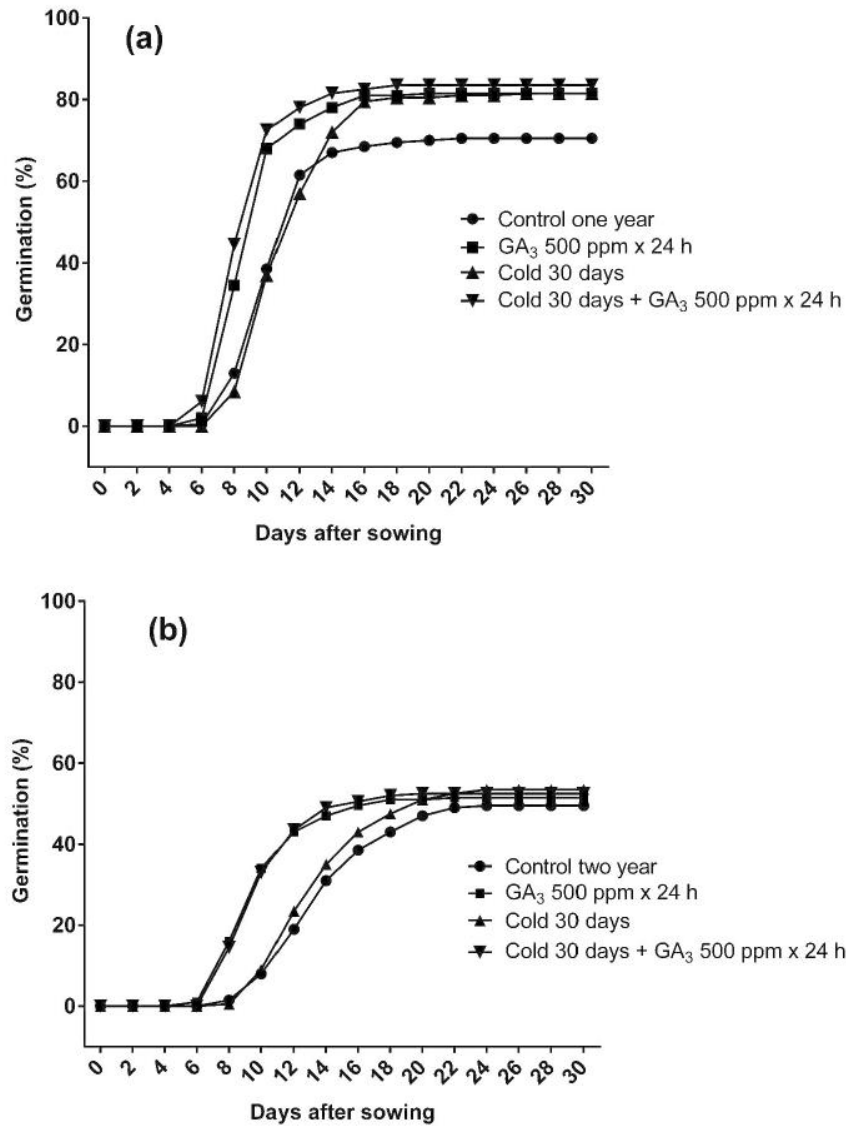


Fig. 4 Cumulative germination curves in stored seeds of *Arbutus xalapensis* Kunth subjected to pre-germination treatments. (a) one year of storage and (b) two years of storage

76% are reported in seeds from mature fruits. Likewise, higher germination was presented compared to other species of the genus with distribution in Europe such as *Arbutus unedo* L. and *Arbutus andrachne* L., where germination values of 40.5% and 30%, respectively,

are reported when germinated at temperatures similar to those used in the present study (Narbona et al. 2003; Bertsouklis and Papafotiou 2013).

Germination decreased as a consequence of storage, as has been reported for various species and, in some cases, viability is lost and the seeds no longer germinate (Bertsouklis and Papafotiou 2013; Cervantes et al. 2014; Becerra-Vázquez et al. 2018). Although the seeds showed a reduction in germination, *A. xalapensis* had greater longevity than that observed for other species of the genus such as *A. unedo* and *A. andrachme*. These latter two species do not present germination at 11 months unless subjected to pre-germination treatments and, after 24 months, their recorded germination is nil (Bertsouklis and Papafotiou 2013). The loss of viability of the seed depends, in part, on the orthodox or recalcitrant nature of the seeds, with the latter being sensitive to moisture loss, as is the case with species of the genus *Quercus* (Zavala-Chávez 2004), which share their habitat with the genus *Arbutus*. This could have occurred with the seeds of *A. xalapensis*, since weight loss of the seeds was observed with respect to storage time at 24 months, and they may have lost moisture and thus viability, which could indicate that they present some degree of recalcitrance.

Another reason for the loss of germination capacity is the storage conditions themselves, which can directly affect the seed conservation (Cervantes et al. 2014; Becerra-Vázquez et al. 2018). In the study site, the predominant climate is temperate semi-dry (Siqueiros-Delgado et al. 2016), implying that conditions are usually drier, which favors seed conservation in some species. This is because their seeds can remain viable for several years when stored at low temperatures and in a dry place (Bonner 2008; Pritchard and Nadarajan 2008). Even when the seeds maintain a good germination capacity at room temperature, it is recommended to carry out studies in which they are stored at lower temperatures in order to determine whether their viability can be prolonged, as has been reported in other species (Becerra-Vázquez et al. 2018).

The pre-germination treatments in *A. xalapensis* increased its germination by only 10% in seeds with 12 months of storage while no significant differences were observed with respect to the control in seeds with 24 months of storage. It has been stated that seeds can enter dormancy due to storage time, preventing germination from taking place. When this occurs, pre-germination treatments that focus on breaking physiological dormancy can be used (Bertsouklis and Papafotiou, 2013). Physiological dormancy has been observed in other species of *Arbutus*, and can be broken by pre-germination treatments in order to recover germination (Smiris et al. 2006; Bertsouklis and Papafotiou 2013; Pipinis et al. 2017). According to the results obtained and that described above, the lack of germination in *A. xalapensis* could be due to a loss of viability caused by storage rather than the formation of physiological dormancy as in European species; e.g., the case of *Arbutus unedo*. This is confirmed by the tetrazolium test, which produced a percentage of viability similar to that found in the germination tests on seeds with 24 months of storage. The tetrazolium test works by detecting cellular respiration by the embryo through selective staining of tissues that present cellular respiration (Flechas-Bejarano and Medina-Rivera 2021).

The MGT increased according to the storage time. This behavior has been observed in seeds of tropical tree species in the country, although the variable is dependent on the species, storage conditions, batches and years of collection, as well as the physical integrity of the seed (Becerra-Vázquez et al. 2018; Ríos García et al. 2018). Despite the effect of storage on the MGT, this parameter was reduced in the treatments that involved prior immersion in GA<sub>3</sub>. This could be because GA<sub>3</sub> is a hormone that stimulates cell division and germina-

tion in seeds, thus replacing normally required external stimuli such as temperature and light (García-Martínez and Gil 2002; Baskin and Baskin 2004). This has been observed in other studies in which this hormone is used to stimulate germination (Tilki 2004; Smiris et al. 2006; Pipinis et al. 2017). Another reason for the reduced MGT could be the form of application of the hormone. Immersion of the seed stimulated germination, initiating the imbibition process of the seed, since the seeds of the *Arbutus* genus appear to have permeable coats.

## Conclusion

The germination percentage of *A. xalapensis* and the time necessary for initiation of germination of its seeds are both affected by storage time. The pre-germination treatments used in this study mainly helped to reduce the time necessary for germination to take place, since the seeds themselves do not appear to present physiological dormancy. It is recommended to use seeds within less than one year of collection in order to obtain a high germination percentage (>80%), and to conduct studies in which seeds are stored at lower temperatures and in more hermetic conditions in order to accurately determine whether their viability can be prolonged.

It is also necessary to continue research into the species, its seeds, phenology, natural regeneration and cultivation. As with the other species of the genus *Arbutus* in Mexico, knowledge about *A. xalapensis* remains scarce despite its wide distribution.

**Acknowledgements** Thanks to Universidad Autónoma Aguascalientes (UAA) for supporting the project. To the soil laboratory of the Center for Agricultural Sciences UAA for providing equipment to carry out the experiment. Thanks to Stephanie Olivares for her help with the laboratory tests.

**Author contributions** All authors contributed to the study conception and design. Collection of biological material were performed by VMC and MSO. Material preparation, data collection and analysis were performed by VMC and JSR. The first draft of the manuscript was written by VMC and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

**Funding** This work was supported by Universidad Autónoma Aguascalientes. The first author thanks Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT) for the support provided through the scholarship to carry out his doctoral studies.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Apodaca-Martínez M, Cetina Alcalá VM, Jasso-Mata J, López-López M, González-Rosas H, Úscanga-Mortera E, García-Esteva A (2019) Ruptura de la latencia física y germinación de semillas de *Chiranthodendron pentadactylon* (Malvaceae). *Bot Sci* 97(2):211. <https://doi.org/10.17129/botsci.2094>
- Baskin JM, Baskin CC (2004) A classification system for seed dormancy. *Seeds Sci Res* 14:1–17
- Becerra-Vázquez ÁG, Sánchez-Nieto S, Coates R, Flores-Ortiz CM, Orozco-Segovia A (2018) Seed longevity of five Tropical Species from South-Eastern Mexico: changes in seed germination during Storage. <https://doi.org/10.1177/1940082918779489>. *Tropical Conservation Science* 11

- Bertsouklis KF, Papafiotou M (2013) Seed germination of *Arbutus unedo*, *A. andrachne* and their natural hybrid *A. andrachnoides* in relation to temperature and period of storage. *HortScience* 48(3):347–351. <https://doi.org/10.21273/hortsci.48.3.347>
- Bonfil C, Trejo I (2010) Plant Propagation and the ecological restoration of mexican tropical deciduous forests. *Ecol Restor* 28(3):369–376. <https://doi.org/10.3368/er.28.3.369>
- Bonner FT (2008) Storage of seed. In: Bonner FT, Karrfalt RP (eds) *The woody plant seed manual agriculture handbook 727*. Department of Agriculture Forest Service, Washington DC, pp 85–96
- Calva-Soto K, Pavón NP (2018) Ecological restoration in México: an emerging discipline in a deteriorated country. *Madera y Bosques* 24(1):2411135. doi: <https://doi.org/10.21829/myb.2018.2411135>
- Cervantes M, Ceccon E, Bonfil C (2014) Germination of stored seeds of four tree species from the tropical dry forest of Morelos. *Mexico Bot Sci* 92(2):281–287. <https://doi.org/10.17129/botsci.96>
- De Jesús-Albino F, Hernández RI, Trejo D, Caballero LM (2021) *Quercus rugosa* Née seedling quality in a forest nursery. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 12(67):147–167. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v12i67.967>
- Díaz-Pontones D, Reyes-Jaramillo I (2009) Producción y almacenamiento de bellotas de *Quercus hintonii* Warburg (Fagaceae) de la Depresión del balsas, México. *Polibotánica* 27:131–143
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2020) InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Edmond JB, Drapala WJ (1958) The effect of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. *Proceeding of the American Society for Horticultural Science* 71: 428–434.4
- Flechas-Bejarano N, Medina-Rivera R (2021) Efecto del almacenamiento en la viabilidad, germinación y vigor de semillas de *Coffea arabica* L. *Revista Cenicafé* 72(2):e72206. <https://doi.org/10.38141/10778/72206>
- García-Martínez JL, Gil J (2002) Light regulation of gibberellin biosynthesis and mode of action. *J Plant Growth Regul* 20:354–368. <https://doi.org/10.1007/s003440010033>
- González-Elizondo MS, González-Elizondo M (2014) Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo Ericaceae. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología, A.C
- González-Elizondo M, López-Enríquez IL, González-Elizondo MS, Tena-Flores JA (2004) Plantas Medicinales del Estado de Durango y Zonas Aledañas. Instituto Politécnico Nacional CIIDIR Durango, Durango
- García-Regalado G (2014) Plantas Medicinales de Aguascalientes. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes
- Martínez-Calderón VM, Sosa-Ramírez J, Siqueiros-Delgado ME, Díaz-Núñez V (2021) Composición, diversidad y estructura de especies leñosas en los bosques templados de Monte Grande, Sierra Fría, Aguascalientes, México. *Acta Bot Mexicana* 128:e1829. <https://doi.org/10.21829/abm128.2021.1829>
- Martínez-Calderón VM, Sosa-Ramírez J, Torres-González JA, Mendieta-Vázquez AG, Sandoval-Ortega MH (2020) Propagación de *Forestiera phillyreoides*: una especie potencial para la restauración en el Centro-Norte de México. *Madera y Bosques* 26(2):1–13. <https://doi.org/10.21829/myb.2020.2622052>
- Muñoz HJ, Sáenz JT, Coria VM, García JJ, Hernández J, Manzanilla GE (2015) Plant quality in the La Dieta forest nursery in Zitácuaro municipality, Michoacán state. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 6(27):72–89
- Narbona E, Arista M, Ortiz PL (2003) Germinación de las semillas del madroño (*Arbutus unedo* L., Ericaceae). *Acta Bot Malacitana* 28:73–78. <https://doi.org/10.24310/abm.v28i0.7267>
- Niembro-Rocas A, Vázquez-Torres M, Sánchez-Sánchez O (2010) Árboles de Veracruz, 100 especies para la reforestación estratégica. Gobierno del Estado de Veracruz y Secretaría de Educación del Estado de Veracruz. Xalapa
- Núñez-Cruz A, Meave JA, Bonfil C (2018) Reproductive phenology and seed germination in eight tree species from a seasonally dry tropical forest of Morelos, Mexico: implications for community-oriented restoration and conservation. *Trop Conserv Sci* 11:1–14. doi: <https://doi.org/10.1177/1940082917749946>
- Pasquini NM, Defossé GE (2012) Effects of storage conditions and pre-chilling periods on germinability of *Pinus ponderosa* seeds from Patagonia, Argentina: preliminary study. *Bosque* 33(1):99–103. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002012000100012>
- Pritchard HW, Nadarajan J (2008) Cryopreservation of Orthodox (Desiccation Tolerant) Seeds. In: Reed BM (ed) *Plant Cryopreservation: a practical guide*. Springer, New York, pp 485–501. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-72276-4\\_19](https://doi.org/10.1007/978-0-387-72276-4_19)
- Pipimis E, Stampoulidis A, Milios E, Kitikidou K, Radoglou K (2017) Effects of Cold Stratification and Ga3 on Germination of *Arbutus Unedo* Seeds of three Provenances. *Afr J Traditional Complement Altern Med* 14(1):318–323. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i1.34>
- Pozo-Gómez DM, Orantes-García C, Rioja-Paradela TM, Moreno-Moreno RA, Farrera-Sarmiento O (2019) Diferencias en morfometría y germinación de semillas de *Croton guatemalensis* (Euphorbiaceae), procedentes de poblaciones silvestres de la Selva Zoque. Chiapas México *Acta Botánica Mexicana* 126:e1384. <https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1384>

- Ríos-García CA, Orantes-García C, Moreno-Moreno RA, Farrera Sarmiento Ó (2018) Efecto del almacenamiento sobre la viabilidad y germinación de dos especies arbóreas tropicales. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 5(13):103. <https://doi.org/10.19136/era.a5n13.1161>
- Siqueiros-Delgado ME, Rodríguez-Avalos JA, Martínez-Ramírez J, Sierra-Muñoz JC (2016) México Bot Sci 94(3):455–470. <https://doi.org/10.17129/botsci.466>. Situación actual de la vegetación del estado de Aguascalientes
- Smiris P, Pipinis E, Aslanidou M, Mavrokordopoulou O, Milios E, Kouridakis A (2006) Germination study on *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) and *Podocynisus caramanicus* Boiss. & Heldr. (Fabaceae). *Journal of Biological Research* 5: 85–91
- Tilki F (2004) Improvement in seed germination of *Arbutus unedo* L. *Pak J Biol Sci* 7(10):1640–1642
- Tovar-Rocha V, Rocha-Granados M, Delgado-Valerio P (2014) Influencia de la maduración del fruto de *Arbutus xalapensis* kunth sobre la germinación de semillas y embriones cigóticos. *Polibotánica* 37: 79–92
- Vázquez-Yanes C, Batis-Muñoz AI, Alcocer-Silva MI, Gual-Díaz M, Sánchez-Dizco C (2001) Árboles y arbustos nativos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México
- Villaseñor JL (2016) Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87(3):559–902. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.017>
- Villaseñor JL, Ortiz E (2014) Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85(SUPPL.): 134–142. <https://doi.org/10.7550/rmb.31987>
- Zavala-Chávez F (2004) Deseccación de bellotas y su relación con la viabilidad y germinación en nueve especies de encinos mexicanos. *CIENCIA Ergo-Sum* 11(2):177–185

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

## Authors and Affiliations

Victor Manuel Martínez-Calderón<sup>1</sup> · Joaquín Sosa-Ramírez<sup>2</sup> · José de Jesús Luna-Ruiz<sup>2</sup> · Diego Rafael Pérez-Salicrú<sup>3</sup> · Manuel Higinio Sandoval-Ortega<sup>4</sup>

✉ Joaquín Sosa-Ramírez  
jsosar@correo.naa.mx

- <sup>1</sup> Doctorado en Ciencias Biológicas, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, Ciudad Universitaria, C.P. 20100 Aguascalientes, Ags, México
- <sup>2</sup> Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, Ciudad Universitaria, C.P. 20100 Aguascalientes, Ags, México
- <sup>3</sup> Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Antigua carretera a Pátzcuaro 8701, Ex hacienda San José de la Huerta, C.P. 58190 Morelia, Michoacán, México
- <sup>4</sup> DICTUS, Herbario USON, Universidad de Sonora, Niños Héroes, entre Rosales y Pino Suárez, Col. Centro, C.P. 83000 Hermosillo, Sonora, México

**Propagation of *Arctostaphylos pungens* Kunt from temperate forests of north-central Mexico**

**Propagación de *Arctostaphylos pungens* Kunt procedente de bosques templados del centro-norte de México**

Víctor M. Martínez-Calderón<sup>1</sup>; Joaquín Sosa-Ramírez<sup>2\*</sup>; Jesús M. Fuantos-Mendoza<sup>2</sup>; Diego R. Pérez-Salicrup<sup>3</sup>; J. de Jesús Luna-Ruiz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Básicas. Av. Universidad 940, Ciudad Universitaria. C. P. 20100. Aguascalientes, Aguascalientes, México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Agropecuarias. Av. Universidad 940, Ciudad Universitaria. C. P. 20100. Aguascalientes, Aguascalientes, México.

<sup>3</sup>Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad. Antigua carretera a Pátzcuaro 8701. C. P. 58190. Morelia, Michoacán, México.

\*Corresponding author: jsosar@correo.uaa.mx; tel.: +52 449 910 7400 ext. 50155.

**Abstract**

**Introduction:** *Arctostaphylos pungens* Kunt is a species with significant characteristics for restoration; however, there are few studies on its propagation.

**Objective:** To evaluate the effect of pre-germinative treatments and the use of vegetative propagation methods in *A. pungens*.

**Materials and methods:** Eight pre-germinative treatments were evaluated, consisting of scarification with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98 %) for 5 and 6 h, gibberellic acid immersion (1 000 ppm), cold stratification (4 °C for 30, 60 and 90 days) and heat shock (100 °C for 5 min), as well as combinations of these. Vegetative propagation was analyzed by cuttings and air layering.

**Results and discussion:** The highest germination (73.33 ± 15.63 %) was for immersion in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 5 to 6 h; heat shock and cold stratification treatments showed low or no germination. Root formation was not achieved in cuttings but was achieved in 37.50 ± 25 % of 20-week air layering.

**Conclusion:** The best treatments consisted of immersion in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It is recommended to continue experimenting with vegetative propagation by leaving air layering for more than the 20 weeks used in this study to achieve complete root development.

**Keywords:** germination; scarification; stratification; air layering; indolbutyric acid.

**Resumen**

**Introducción:** *Arctostaphylos pungens* Kunt es una especie con características relevantes para la restauración; sin embargo, hay pocos trabajos sobre su propagación.

**Objetivo:** Evaluar el efecto de tratamientos pregerminativos y el uso de métodos de propagación vegetativa en *A. pungens*.

**Materiales y métodos:** Se evaluaron ocho tratamientos pregerminativos que consistieron en escarificación con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98 %) por 5 y 6 h, inmersión en ácido giberélico (1 000 ppm), estratificación en frío (4 °C por 30, 60 y 90 días) y choque térmico (100 °C por 5 min), así como combinaciones de estos. La propagación vegetativa se evaluó por medio de esquejes y acodos aéreos.

**Resultados y discusión:** La mayor germinación (73.33 ± 15.63 %) se registró con la inmersión en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 5 a 6 h; los tratamientos con choque térmico y estratificación fría presentaron baja o nula germinación. No se consiguió formación de raíz en esquejes, pero sí en 37.50 ± 25 % de los acodos aéreos de 20 semanas.

**Conclusión:** Los mejores tratamientos consistieron en inmersión en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se recomienda seguir experimentando con la propagación vegetativa dejando los acodos aéreos por más de las 20 semanas utilizadas en este estudio, para lograr el desarrollo completo de la raíz.

**Palabras clave:** germinación; escarificación; estratificación; acodo aéreo; ácido indolbutírico.

Please cite this article as follows (APA 6): Martínez-Calderón, V. M., Sosa-Ramírez, J., Fuantos-Mendoza, J. M., Pérez-Salicrup, D. R., Luna-Ruiz, J. J. (2022). Propagation of *Arctostaphylos pungens* Kunt from temperate forests of north-central Mexico. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 28(2), 241-255. doi: 10.5154/rchscfa.2021.03.013

Received: March 3, 2021 / Accepted: March 14, 2022



[www.chapingo.mx/revistas/forestales](http://www.chapingo.mx/revistas/forestales)

## Introduction

Temperate forests in Mexico are mainly distributed in mountainous areas and represent 16.56 % of the country's surface area, which includes coniferous and oak forests (Challenger & Soberón, 2008; Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2017). This type of vegetation is among the most affected by human development and activities, being susceptible to forest fires, firewood extraction, and agricultural activities, especially in the center of the country (Challenger, 2003).

Ecological restoration is a relatively recent discipline in Mexico (Calva-Soto & Pavón, 2018). A viable strategy for restoration of degraded areas is reforestation with native species that, in the long term, favor the recovery of diversity and improve the conditions of the degraded site (Ventura-Ríos, Plascencia-Escalante, Hernández de La Rosa, Ángeles-Pérez, & Aldrete, 2017). For this purpose, it is convenient to select native species adapted to the conditions of the site to be restored, thereby achieving a higher percentage of success (González-Espinosa et al., 2007; Meli, Martínez-Ramos, & Rey-Benayas, 2013). A frequent obstacle is not having the native species to help meet the objective, due, in part, to the lack of biological information. It is essential to understand the methods of germination or vegetative reproduction (Bonfil & Trejo, 2010; Martínez-Pérez, Orozco-Segovia, & Martorell, 2006; Ramos-Palacios, Orozco-Segovia, Sánchez-Coronado, & Barradas, 2012) and to generate information that facilitates the propagation of native species with relevant characteristics for restoration. Seeds are the most common means for the reproduction of forest species under nursery conditions, so it is common to improve the proportion of seeds that germinate by pre-germination treatments (Comisión Nacional Forestal [CONAFOR], 2015; Martínez-Pérez et al., 2006). Another method is vegetative propagation, either by cuttings or layering. This can be a good option to produce species that are difficult to reproduce in their habitat or difficult to germinate under nursery conditions (Delgado, Cuba, Hechenleitner, & Thiers, 2008; Ramos-Palacios et al., 2012).

*Arctostaphylos pungens* Kunt is a common species in temperate vegetation such as oak, oak-pine, conifer, and temperate scrub forests. *A. pungens* is widely distributed from the southwestern United States to southern Mexico in states such as Oaxaca and Chiapas, at altitudes of 1 600 to 3 200 m (González-Elizondo & González-Elizondo, 2014; Martínez-Pérez et al., 2006; Rzedowski, 2006). This species has been mentioned as secondary vegetation and is considered a pioneer after disturbance by anthropogenic or natural causes (Díaz-Núñez, Sosa-Ramírez, & Pérez-Salicrú, 2016;

## Introducción

Los bosques templados de México se distribuyen principalmente en las zonas montañosas y representan 16.56 % de la superficie del país, en cual se incluyen los bosques de coníferas y de encino (Challenger & Soberón, 2008; Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2017). Este tipo de vegetación se encuentra entre los más afectados por el desarrollo y las actividades humanas, siendo susceptibles a incendios forestales, extracción de leña y actividades agrícolas, sobre todo en el centro del país (Challenger, 2003).

En México, la restauración ecológica es una disciplina relativamente reciente (Calva-Soto & Pavón, 2018). Una estrategia viable para la restauración de zonas degradadas es la reforestación con especies nativas que, a largo plazo, favorecen la recuperación de la diversidad y mejoran las condiciones del sitio degradado (Ventura-Ríos, Plascencia-Escalante, Hernández de La Rosa, Ángeles-Pérez, & Aldrete, 2017). Para ello es conveniente la selección de especies nativas adaptadas a las condiciones del sitio a restaurar, obteniendo con ello un mayor porcentaje de éxito (González-Espinosa et al., 2007; Meli, Martínez-Ramos, & Rey-Benayas, 2013). Un impedimento frecuente es no contar con las especies nativas que ayuden a cumplir el objetivo, debido, en parte, a la falta de información biológica. En particular, es fundamental entender los métodos de germinación o reproducción vegetativa (Bonfil & Trejo, 2010; Martínez-Pérez, Orozco-Segovia, & Martorell, 2006; Ramos-Palacios, Orozco-Segovia, Sánchez-Coronado, & Barradas, 2012) y generar información que permita la propagación de especies nativas con características relevantes para la restauración. Las semillas son el medio más común para la reproducción de especies forestales en vivero, por lo que es habitual mejorar la proporción de semillas que germinan por medio de tratamientos pregerminativos (Comisión Nacional Forestal [CONAFOR], 2015; Martínez-Pérez et al., 2006). Otro método es la propagación vegetativa, ya sea por medio de esquejes, estacas o acodos. Lo anterior puede ser una buena opción en la producción de especies con dificultad de reproducción en su hábitat o de difícil germinación en viveros (Delgado, Cuba, Hechenleitner, & Thiers, 2008; Ramos-Palacios et al., 2012)

*Arctostaphylos pungens* Kunt es una especie común en la vegetación de clima templado como los bosques de encino, encino-pino, coníferas y matorrales templados. *A. pungens* se distribuye ampliamente desde el suroeste de Estados Unidos hasta el sur de México en estados como Oaxaca y Chiapas, en altitudes de 1 600 a 3 200 m (González-Elizondo & González-Elizondo, 2014; Martínez-Pérez et al., 2006; Rzedowski, 2006). La especie ha sido mencionada como vegetación secundaria y es considerada pionera después de que ocurre un

Márquez-Linares et al., 2006; Sosa-Ramírez, Moreno-Rico, Sánchez-Martínez, Luna-Ruiz, & Siqueiros-Delgado, 2016), colonizing sites affected mainly by fires (Márquez-Linares et al., 2006). *A. pungens* is a shrub, rarely tree, 0.4 to 5 m in height, with exfoliating bark and reddish to reddish-purple color. Its leaves are leathery, elliptic and 1 to 3.3 cm long. The flower is white urceolate to Mexican pink and grouped in clusters of five to eight flowers. The fruit is a depressed globose edible drupe, smooth, 5 to 8 (11) mm, orange to dark red. The number of seeds varies from 4 to 7 (10), with hardened integuments, forming ossicles united in groups of two to three. Each seed is gore-shaped and averages 3.2 mm long and 2.6 mm wide (Márquez-Linares, Jurado, & González-Elizondo, 2006).

*A. pungens* has potential for restoration, either for soil retention capacity or for its role in soil formation, with good leaf litter production (Martínez-Pérez et al., 2006); in addition, it provides other benefits to the population through the production of edible fruits and wood for firewood, and medicinal uses (García-Regalado, 2014; González-Elizondo & González-Elizondo, 2014). As a pioneer species found naturally in disturbed sites, it probably has greater resistance to unfavorable conditions such as water stress and deteriorated soils (Meli et al., 2013). Under a good management regime, where fires and other disturbances are controlled, pioneer species help the establishment of species considered climax forests, as is the case of the genus *Quercus* (Márquez-Linares et al., 2006).

Despite its wide distribution and the fact that *A. pungens* is considered a species with relevant characteristics for restoration, there are not many studies on its propagation. Most of them come from manuals that provide little information on its propagation and from articles that address seed ecology or pre-germinative treatments that indicate low germination (Jurado, Márquez-Linares, & Flores, 2011; Martínez-Pérez et al., 2006). However, this does not mean these are the best possible methods, because other potential pre-germination treatments are not considered (Martínez-Pérez et al., 2006). There is no information of its propagation by alternative methods, such as reproduction by means of vegetative material.

Due to the above, the objective of the present study was to evaluate the germination of *A. pungens* seeds under pre-germination treatments, as well as vegetative propagation by cuttings and air layering to find the most appropriate method. The information generated may be useful in obtaining *A. pungens* plants for later use in the restoration of temperate forests.

disturbio por causas antrópicas o naturales (Díaz-Núñez, Sosa-Ramírez, & Pérez-Salicrup, 2016; Márquez-Linares et al., 2006; Sosa-Ramírez, Moreno-Rico, Sánchez-Martínez, Luna-Ruiz, & Siqueiros-Delgado, 2016), colonizando sitios afectados principalmente por incendios (Márquez-Linares et al., 2006). *A. pungens* es un arbusto, rara vez árbol, de 0.4 a 5 m de altura, de corteza exfoliante y color rojizo a rojo-púrpura. Sus hojas son coriáceas, elípticas y de 1 a 3.3 cm de largo. La flor es urceolada de color blanco a rosa mexicano y agrupada en racimos de cinco a ocho flores. Su fruto es una drupa comestible globosa deprimida, lisa, de 5 a 8 (11) mm, de color anaranjado a rojo oscuro. El número de semillas varía de 4 a 7 (10), con los tegumentos endurecidos, formando huesecillos unidos en grupos de dos a tres. Cada semilla tiene forma de gajo y mide en promedio 3.2 mm de largo y 2.6 mm de ancho (Márquez-Linares, Jurado, & González-Elizondo, 2006).

*A. pungens* tiene potencial para restauración, ya sea por su capacidad de retención de suelo o por su papel en la formación del mismo, con una buena producción de hojarasca (Martínez-Pérez et al., 2006); además, provee otros beneficios a la población a partir de la producción de frutos comestibles y de madera para leña, así como usos con fines medicinales (García-Regalado, 2014; González-Elizondo & González-Elizondo, 2014). Por ser una especie pionera que se encuentra naturalmente en sitios perturbados, probablemente presente mayor resistencia a condiciones poco favorables como el estrés hídrico y suelos deteriorados (Meli et al., 2013). Bajo un régimen de buen manejo, donde los incendios y otros disturbios son controlados, las especies pioneras ayudan al establecimiento de especies consideradas de bosques climax, como es el caso del género *Quercus* (Márquez-Linares et al., 2006).

No hay muchos trabajos sobre la propagación de *A. pungens*, a pesar de su amplia distribución y de ser considerada una especie con características relevantes para la restauración. La mayoría de ellos proviene de manuales que dan poca información sobre su propagación y de artículos que abordan la ecología de las semillas o tratamientos pregerminativos que, además, señalan baja germinación (Jurado, Márquez-Linares, & Flores, 2011; Martínez-Pérez et al., 2006). Esto no implica que se trate de los mejores métodos posibles, ya que no se toman en cuenta otros tratamientos pregerminativos potenciales (Martínez-Pérez et al., 2006). En cuanto al conocimiento de su propagación con métodos alternos como la reproducción por medio de material vegetativo no se tiene información.

Debido a lo anterior, el objetivo del presente estudio consistió en evaluar la germinación de las semillas de *A. pungens* bajo tratamientos pregerminativos, así como



**Materials and Methods**

**Selection of biological material**

Autumn is one of the seasons with presence of mature fruits in the area (Rubalcava-Castillo et al., 2020). On December 6, 2019, 100 mature fruits per specimen (n = 15) were collected in the temperate forest of the Área Natural Protegida (ANP) Sierra Fria, Aguascalientes (22° 11' 56.07 "N, 102° 37' 54.88" W, 2 670 m) (Figure 1). On April 21, 2020, plant material was collected to make cuttings, after twig growth. The collection was done with pruning shears at the "Rancho Piletas" property, inside the ANP Sierra Fria. The plant material was transported in plastic bags to conserve moisture.

la propagación vegetativa a través de esquejes y acodos aéreos con el fin de encontrar el método más adecuado. La información generada puede ser útil en la obtención de plantas de *A. pungens* para su uso posterior en la restauración de bosques templados.

**Materiales y métodos**

**Colecta del material biológico**

La estación de otoño es una de las temporadas con presencia de frutos maduros en la zona (Rubalcava-Castillo et al., 2020). El 6 de diciembre del 2019 se colectaron 100 frutos maduros por ejemplar (n = 15) en el bosque templado del Área Natural Protegida (ANP) Sierra Fria, Aguascalientes (22° 11' 56.07 "N, 102° 37'

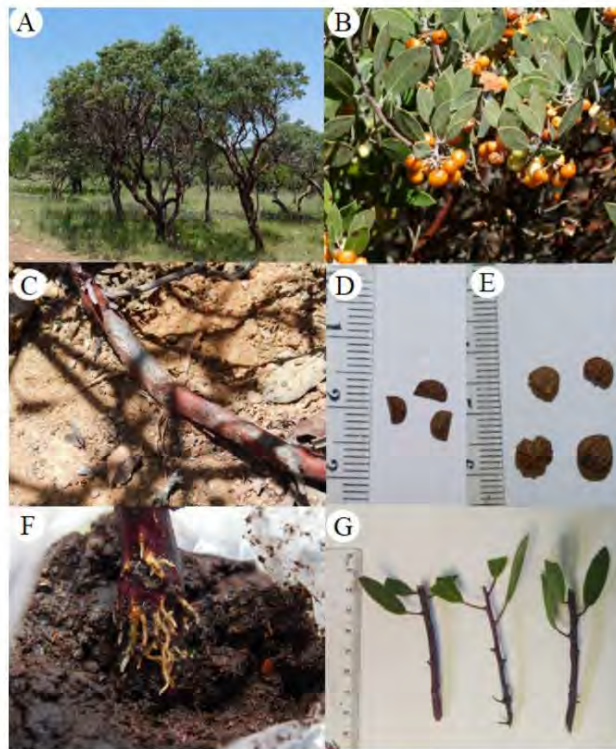


Figure 1. Details of *Arctostaphylos pungens* in the open field and experiments. A) Field specimens, B) fruit, C) natural vegetative propagation, D) free seeds, E) fused seeds, F) root formation in layering, G) size of cuttings used in the experiment.

Figura 1. Detalles de *Arctostaphylos pungens* en campo y experimentos. A) Ejemplares en campo, B) fruto, C) propagación vegetativa natural, D) semillas libres, E) semillas fusionadas, F) formación de raíz en acodo, G) tamaño de esqueje utilizado en el experimento.

**Sexual propagation**

**Morphometric characterization of fruit and seed**

A total of one hundred fruits were taken randomly from a composite sample of the total fruits collected. The fruits were weighed on an analytical balance and length and width were measured with a digital caliper (Surtek 122200, China); subsequently, the seeds were extracted manually. Free seeds extracted from each fruit (Figure 1D) were counted and 10 replicates of 100 seeds were weighed; also, length, width and thickness of 100 free seeds were measured.

**Germination**

Treatments consisted of trying to break the physical and physiological dormancy of the seeds. For this purpose, eight pre-germination treatments were tested to find the most effective method for propagation (Table 1). Sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) was used at a concentration of 98 %. Stratification consisted of cold storage (4 °C). Heat shock consisted of placing the seeds in dry sand at 100 °C for 5 min, as a simulation of forest fires during the dry season (Zuloaga-Aguilar, Briones, & Orozco-Segovia, 2010).

A total of four replicates of 30 free seeds per treatment were used in the germination tests (Jurado et al., 2011). Each experimental unit consisted of 95 x 15 mm Petri dishes, with kraft paper and cotton. Seeds were washed with 10 % chlorine for 5 min, then sown in the Petri dishes; a drop of Interguzan 30-30® fungicide was added to each seed to prevent fungal attack. Seeds were placed

54.88" W, 2 670 m) (Figura 1). El 21 de abril del 2020 se colectó material vegetal para realizar esquejes, después del crecimiento de las ramillas. La colecta se hizo con tijeras de poda en el predio "Rancho Piletas", dentro del ANP Sierra Fría. El material vegetal se transportó en bolsas de plástico para conservar la humedad.

**Propagación sexual**

**Caracterización morfométrica del fruto y semilla**

Cien frutos se tomaron en forma aleatoria de una muestra compuesta del total de frutos colectados. Los frutos se pesaron en una balanza analítica y se midió el largo y ancho con un calibrador digital (Surtek 122200, China); posteriormente, las semillas se extrajeron manualmente. Las semillas libres extraídas de cada fruto (Figura 1D) se contaron y se pesaron 10 réplicas de 100 semillas; asimismo, se midió el largo, ancho y grosor de 100 semillas libres.

**Germinación**

Los tratamientos consistieron en tratar de romper la latencia física y fisiológica de las semillas. Para ello, se probaron ocho tratamientos pregerminativos con el fin de encontrar el método más eficaz para su propagación (Cuadro 1). El ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) se utilizó a una concentración de 98 %. La estratificación consistió en almacenamiento en frío (4 °C). El choque térmico consistió en colocar las semillas en arena seca a 100 °C por 5 min, como simulación de incendios forestales durante la temporada de sequía (Zuloaga-Aguilar, Briones, & Orozco-Segovia, 2010).

**Table 1. Pre-germination treatments on *Arctostaphylos pungens* seeds.**  
**Cuadro 1. Tratamientos pregerminativos en semillas de *Arctostaphylos pungens*.**

Treatment/ Tratamiento	Treatment description / Descripción del tratamiento
T1	Control
T2	Immersion in H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> for 5 h / Inmersión en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> por 5 h
T3	Immersion in H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> for 6 h / Inmersión en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> por 6 h
T4	Stratification for 90 days + heat shock / Estratificación por 90 días + choque térmico
T5	Stratification for 60 days + heat shock / Estratificación por 60 días + choque térmico
T6	Stratification for 30 days + heat shock + Stratification for 30 days + heat shock / Estratificación por 30 días + choque térmico + estratificación por 30 días + choque térmico
T7	Stratification 60 days + immersion in H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> for 4 h / Estratificación 60 días + inmersión en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> por 4 h
T8	Immersion in H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> for 5 h + immersion in gibberellic acid (GA <sub>3</sub> , 1 000 ppm) for 24 h / Inmersión en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> por 5 h + inmersión en ácido giberélico (GA <sub>3</sub> , 1 000 ppm) por 24 h

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was used at a concentration of 98 %, stratification consisted of cold storage (4 °C) and heat shock consisted of placing the seeds in dry sand at 100 °C for 5 min.  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se utilizó a una concentración de 98 %, la estratificación consistió en almacenamiento en frío (4 °C) y el choque térmico consistió en colocar las semillas en arena seca a 100 °C por 5 min.

at  $25 \pm 2$  °C with an 8-h photoperiod. Germination was recorded every two days for 60 days. At the end, the average germination percentage and mean germination time were calculated:  $TMG = \frac{\sum XiTi}{\sum Xi}$ , where, Xi is the number of germinated seeds per observation and Ti are the days elapsed after sowing.

### Asexual propagation

#### Cuttings

Cuttings consisted of recently grown (first 10 cm from the apex), semi-lignified shoots, 6 to 7 cm long, which the lower leaves were removed leaving only two or three near the apex (Delgado et al., 2008; Saldías, 2016). The cuttings were cut diagonally at the base to increase the absorption surface. Before placing the cuttings in the substrate, they were treated with a solution of Captan fungicide (1 g·L<sup>-1</sup>) to prevent fungi; subsequently, the area of the basal cut was impregnated with the commercial product Radix® 10000 (powdered), which has indolbutyric acid (IBA) as active ingredient.

The experiment consisted of four replicates of 30 cuttings each, which were placed in hinge containers to conserve moisture, using previously moistened peat moss as substrate. The containers were kept in a greenhouse (15 °C minimum, 36 °C maximum and relative humidity 30 to 50 %) with light irrigation on Mondays and Fridays using an atomizer. In the first four irrigations, Captan was again applied directly to the base of the cuttings to prevent fungus formation.

#### Air layering

Air layering was carried out because natural vegetative propagation was observed in the field and has been mentioned as one of the main forms of natural reproduction in the collection region (Luna-Ruiz, Moreno-Rico, Sosa-Ramírez, & Sánchez-Martínez, 2016). Ten aerial layering per site were carried out on four populations of *A. pungens* at the Piletas Ranch, ANP Sierra Fría; each site represented one replicate. The shrubs had a diameter at the base greater than 15 cm and were 1.70 to 2.5 high.

Branches with a diameter of 1 to 2 cm and approximately 40 to 50 cm in length were used for air layering. A 2 to 3 cm ring of bark was removed from each branch. A rooting paste prepared with lanolin and Radix® 10000 was applied at a 4:1 ratio. Subsequently, a transparent bag (18 x 25 cm) was attached with string to place previously moistened peat moss as substrate, covering all the detached bark. The ends were tied to prevent moisture loss. The substrate was irrigated with 25 mL of water every five weeks using a 5 mL syringe.

En las pruebas de germinación se usaron cuatro réplicas de 30 semillas libres por tratamiento (Jurado et al., 2011). Cada unidad experimental constó de cajas Petri de 95 x 15 mm, con papel estraza y algodón. Las semillas se lavaron con cloro al 10 % por 5 min, posteriormente se sembraron en las cajas Petri; a cada semilla se agregó una gota de fungicida Interguzan 30-30® para prevenir el ataque de hongos. Las semillas se colocaron a  $25 \pm 2$  °C con un fotoperiodo de 8 h. La germinación se registró cada dos días durante 60 días. Al final se calculó el porcentaje promedio de germinación y tiempo medio de germinación:  $TMG = \frac{\sum XiTi}{\sum Xi}$ , donde, Xi es el número de semillas germinadas por observación y Ti son los días transcurridos después de la siembra.

### Propagación asexual

#### Esquejes

Los esquejes consistieron en brotes de crecimiento reciente (primeros 10 cm a partir del ápice), semilignificados, de 6 a 7 cm de longitud, los cuales se eliminaron las hojas inferiores dejando únicamente dos o tres cercanas al ápice (Delgado et al., 2008; Saldías, 2016). Los esquejes se cortaron diagonalmente en la base para aumentar la superficie de absorción. Antes de colocar los esquejes en el sustrato, se trataron con una solución de fungicida Captan (1 g·L<sup>-1</sup>) para prevenir hongos; posteriormente, el área del corte basal se impregnó con el producto comercial Radix® 10000 (en polvo), el cual tiene como ingrediente activo el ácido indolbutírico (AIB).

El ensayo constó de cuatro réplicas de 30 esquejes cada una, las cuales se colocaron en charolas de plástico tipo bisagra para conservar la humedad, usando como sustrato *peat moss* previamente humedecido. Las charolas se mantuvieron en invernadero (15 °C mínimo, 36 °C máximo y humedad relativa 30 a 50 %) con riegos ligeros los lunes y viernes mediante un atomizador. En los cuatro primeros riegos se aplicó nuevamente Captan directamente a la base del esqueje para prevenir formación de hongos.

#### Acodos aéreos

Los acodos aéreos se realizaron debido a que en campo se observó propagación vegetativa natural y se ha mencionado que es una de las principales formas de reproducción natural en la región de colecta (Luna-Ruiz, Moreno-Rico, Sosa-Ramírez, & Sánchez-Martínez, 2016). Se hicieron 10 acodos aéreos por sitio en cuatro poblaciones de *A. pungens* en el rancho Piletas, ANP Sierra Fría; cada sitio representó una réplica. Los arbustos tuvieron diámetro en la base mayor de 15 cm y altura de 1.70 a 2.5 m.

**Statistical analysis**

Means and standard deviations were estimated for fruit characterization, seed weight, germination and vegetative propagation. The experimental design was completely randomized. The effect of pre-germination treatments was compared by one-way ANOVA with Tukey's comparison of means ( $P \leq 0.05$ ); percentage data were previously transformed with the Arc sen function. The TMG was estimated and compared (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) between T2, T3, T7 and T8 which were the treatments with germination. T1 and T4 were excluded, because only one seed germinated in one replicate. Statistical analyses were carried out using the InfoStat program (Di-Rienzo et al., 2016).

**Results and Discussion**

**Sexual propagation**

The fruits collected measured less than 1 cm, weighed  $0.19 \pm 0.04$  g and had three free seeds per fruit. Seeds were small with a weight of  $1.22 \pm 0.13$  g per 100 seeds (Table 2).

In Durango and in the Bajío and adjacent areas, the largest fruits have a diameter of 5 to 11 mm in diameter (González-Elizondo & González-Elizondo, 2014; Márquez-Linares et al., 2006). In this study, seed size was larger than that of Durango which measured 3.2 mm in length and 2.6 mm in width. Fruit and seed sizes vary according to the climatic and edaphological conditions of the site where they develop (Pozo-Gómez, Orantes-García, Rioja-Paradela, Moreno-Moreno, & Ferrera-Sarmiento, 2019). The compared areas may have similar climates, so the sizes are similar. The number of free seeds also coincides with the description made for those areas. Weight is a variable that is not considered in the botanical description, but it is important for nursery production, because it can be used to determine the number of seeds per kilogram and the amount of seeds to use (Apodaca-Martínez et al., 2019).

Para realizar los acodos se utilizaron ramas con diámetro de 1 a 2 cm y de aproximadamente 40 a 50 cm de longitud. En cada rama se desprendió un anillo de corteza de 2 a 3 cm. Se aplicó enraizante en pasta preparada con lanolina y el producto Radix® 10000 a una proporción 4:1. Posteriormente se colocó una bolsa transparente (18 x 25 cm) sujeta con cordón para colocar *peat moss* previamente humedecido como sustrato, cubriendo la totalidad de la corteza desprendida. Los extremos se ataron para evitar la pérdida de humedad. El sustrato se regó con 25 mL de agua cada cinco semanas con ayuda de una jeringa de 5 mL.

**Análisis estadístico**

Se calcularon medias y desviaciones estándar de los valores obtenidos en la caracterización de frutos, peso de semillas, germinación y propagación vegetativa. El diseño experimental fue completamente al azar. El efecto de los tratamientos pregerminativos se comparó por medio de un análisis de varianza de una vía con comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ); los datos de porcentajes se transformaron previamente con la función Arc sen. El TMG se calculó y comparó (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) entre T2, T3, T7 y T8 que fueron los tratamientos que presentaron germinación. T1 y T4 se excluyeron, ya que solo germinó una semilla en una réplica. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa InfoStat (Di-Rienzo et al., 2016).

**Resultados y discusión**

**Propagación sexual**

Los frutos colectados midieron menos de 1 cm, pesaron  $0.19 \pm 0.04$  g y tuvieron tres semillas libres por fruto. Las semillas fueron de tamaño pequeño con peso de  $1.22 \pm 0.13$  g por 100 semillas (Cuadro 2).

En el estado de Durango y en el Bajío y sus zonas adyacentes, los frutos de mayor tamaño miden de 5 a 11 mm de diámetro (González-Elizondo & González-

**Table 2. Morphometric values of fruit and free seeds of *Arctostaphylos pungens*.  
Cuadro 2. Valores morfométricos del fruto y semillas libres de *Arctostaphylos pungens*.**

Fruit/Fruto				Seed/Semilla			
Width (mm)/Ancho (mm)	Length (mm)/Largo (mm)	Weight (g)/Peso (g)	Free seeds per fruit/Semillas libres por fruto	Length (mm)/Largo (mm)	Width (mm)/Ancho (mm)	Thickness (mm)/Grosor (mm)	Weight of 100 seeds (g)/Peso de 100 semillas (g)
$9.06 \pm 1.22$	$6.65 \pm 0.67$	$0.19 \pm 0.04$	$3.43 \pm 1.98$	$4.20 \pm 0.53$	$2.96 \pm 0.32$	$1.98 \pm 0.30$	$1.22 \pm 0.13$

± standard deviation of the mean (fruits and seeds: n = 100; weight of 100 seeds: n = 10).  
± desviación estándar de la media (frutos y semillas: n = 100; peso de 100 semillas: n = 10).

Germination results showed significant differences ( $P < 0.0001$ ), ranging from 0 to 73.3 % (Table 3; Figure 2). The seeds with the highest germination percentage (66 to 73 %) were those subjected to T8, a scarification process with  $H_2SO_4$  for 5 h + 1 000 ppm  $GA_3$ , being similar to the T2 and T3 treatments exposed to the acid for 5 and 6 h. T7 (4 °C for 60 days +  $H_2SO_4$  for 4 h) caused 27.5 % germination, and in the remaining treatments it was null or almost null (Table 3).

$H_2SO_4$  is commonly used as a pre-germination treatment in species with impermeable covers that prevent the entry of water to the seed; this method has increased germination in species of the genera *Medicago*, *Arctostaphylos* and *Juniperus* (Martínez-Pérez et al., 2006; Peng, Xiao, Wang, & Yu, 2018; Tilki, 2007). *Arctostaphylos pungens* forms seed banks (Márquez-Linares et al., 2006), indicating that they are orthodox, and their testa prevents moisture ingress and egress, which leads to the need for testa degradation. Germination results for seeds treated with  $H_2SO_4$  were higher than those reported by Martínez-Pérez et al. (2006), who reported 63 % germination with exposure to  $H_2SO_4$  for 6 h and less than 10 % with 5 h of immersion. Moreover, these authors mentioned that germination was null with immersions for less than 5 h; in the present study, immersion for 4 h caused germination of  $27.50 \pm 11.01$  %.

Elizondo, 2014; Márquez-Linares et al., 2006). En este estudio, el tamaño de la semilla fue mayor que la de Durango que midió 3.2 mm de largo y 2.6 mm de ancho. Los tamaños del fruto y semilla varían de acuerdo con las condiciones climáticas y edafológicas del sitio en que se desarrollan (Pozo-Gómez, Orantes-García, Rioja-Paradela, Moreno-Moreno, & Ferrera-Sarmiento, 2019). Las zonas comparadas pueden tener climas similares por lo que los tamaños son parecidos. El número de semillas libres también coincide con la descripción realizada para dichas zonas. El peso es una variable que no se toma en cuenta en la descripción botánica, pero es importante para la producción en vivero, ya que permite determinar el número de semillas por kilogramo y la cantidad de semillas a utilizar (Apodaca-Martínez et al., 2019).

Los resultados de germinación mostraron diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ); estos variaron de 0 a 73.3 % (Cuadro 3; Figura 2). Las semillas con mayor porcentaje de germinación (66 a 73 %) fueron las sometidas al T8, proceso de escarificación con  $H_2SO_4$  por 5 h + 1 000 ppm de  $GA_3$ , siendo similares a los tratamientos T2 y T3 expuestos al ácido durante 5 y 6 h. El T7 (4 °C por 60 días +  $H_2SO_4$  por 4 h) causó 27.5 % de germinación y en los tratamientos restantes fue nula o prácticamente nula (Cuadro 3).

**Table 3. Germination and mean germination time (MGT) of *Arctostaphylos pungens* seeds subjected to pre-germination treatments.**

**Cuadro 3. Germinación y tiempo medio de germinación (TMG) de semillas de *Arctostaphylos pungens* sometidas a tratamientos pregerminativos.**

Treatment/Tratamiento	Germination (%) / Germinación (%)	MGT (days) / TMG (días)
T1 (Control)	$0.83 \pm 1.67$ c	(18)
T2 ( $H_2SO_4$ for 5 h) / T2 ( $H_2SO_4$ por 5 h)	$66.67 \pm 9.81$ a	$13.91 \pm 1.10$ ab
T3 ( $H_2SO_4$ for 6 h) / T3 ( $H_2SO_4$ por 6 h)	$71.67 \pm 15.75$ a	$9.93 \pm 1.47$ a
T4 (4 °C for 90 days + heat shock) / T4 (4 °C por 90 días + choque térmico)	$0.83 \pm 1.67$ c	(54)
T5 (4 °C for 60 days + heat shock) / T5 (4 °C por 60 días + choque térmico)	$0 \pm 0$ c	-
T6 (4 °C for 30 days + heat shock + 4 °C for 30 days + heat shock) / T6 (4 °C por 30 días + choque térmico + 4 °C por 30 días + choque térmico)	$0 \pm 0$ c	-
T7 (4 °C for 60 days + $H_2SO_4$ for 4 h) / T7 (4 °C por 60 días + $H_2SO_4$ por 4 h)	$27.50 \pm 11.01$ b	$22.02 \pm 8.93$ b
T8 ( $H_2SO_4$ for 5 h + gibberellic acid [ $GA_3$ , 1 000 ppm] for 24 h) / T8 ( $H_2SO_4$ por 5 h + ácido giberélico [ $GA_3$ , 1 000 ppm] por 24 h)	$73.33 \pm 15.63$ a	$11.55 \pm 0.37$ a

Scarification was carried out with  $H_2SO_4$  at a concentration of 98 %, stratification was based on cold storage (4 °C) and heat shock consisted of placing the seeds in dry sand at 100 °C for 5 min. Mean germination and GMT ( $\pm$  standard deviation;  $n = 120$ ) with a letter in common are not significantly different between treatments according to Tukey's test ( $P > 0.05$ ). Treatments T1 and T4 were excluded from the comparison of means, as only one seed germinated in one replicate; values in parentheses represent the day of seed germination.

La escarificación se hizo con  $H_2SO_4$  a una concentración de 98 %, la estratificación se basó en el almacenamiento en frío (4 °C) y el choque térmico consistió en colocar las semillas en arena seca a 100 °C por 5 min. La germinación media y el TMG ( $\pm$  desviación estándar;  $n = 120$ ) con una letra en común no son significativamente diferentes entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P > 0.05$ ). Los tratamientos T1 y T4 se excluyeron de la comparación de medias, ya que solo germinó una semilla en una réplica; los valores entre paréntesis representan el día de germinación de la semilla.

The percentages may differ due to the seed used in the experiments, because they are usually free or fused by two or more seeds (Jurado et al., 2011). This study used only free seeds; in the case of Martínez-Pérez et al. (2006) it is not mentioned whether free or fused seeds were used. In studies with *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng, the difficulty of homogeneous germination is mentioned, due to the variety of seed size and the complexity of getting the time needed for  $H_2SO_4$  to have the desired effects, in addition to the fact that small seeds can cause damage to the embryo (García-Fayos et al., 2001). In the case of *A. pungens* this may occur similarly, because the fused seeds could show a thicker testa, which would increase the immersion time necessary for  $H_2SO_4$  to sufficiently degrade the mechanical barrier represented by the testa. It should be noted that differences in germination could also be due to variations among populations, origin, and seed production (Pozo-Gómez et al., 2019). According to the observations, it is recommended to choose free seeds of larger size to avoid possible damage caused by pre-germination treatment with  $H_2SO_4$ .

*A. pungens*, in combination with a very hard testa, it has a possible physiological dormancy (Jurado et al., 2011; Martínez-Pérez et al., 2006). The treatments that focused on breaking physiological dormancy, based on cold stratification together with heat shock, did not germinate except for one seed of T4 (4 °C for 90 days + 100 °C heat shock for 5 min). These data are lower than those found by Jurado et al. (2011), who focused on breaking dormancy from a point of view of *A. pungens* seed ecology and its relationship with fire, increasing germination by up to  $29.7 \pm 8.4 \%$  with a combination of different factors (charcoal extract, smoke, cold, and heat). It should be noted that, in that study, germination percentages were relatively low with treatments similar to those used in this study, because with 40 days of cold storage plus thermal shock of 100 °C they achieved  $5.7 \pm 4.3 \%$  germination.

The positive effect of cold stratification on germination has been mentioned in several species (Baskin & Baskin, 2004) and that of the combination with  $GA_3$  in species of the same family as *A. pungens* (Ericaceae) such as the genus *Arbutus* (Bertsouklis & Papafotiou, 2013; Smiris et al., 2006). Cold stimulates the breaking of physiological dormancy, as it happens in nature due to the effect of winter. Such dormancy can range from non-deep, intermediate, and deep; the latter requires three to four months of cold (Baskin & Baskin, 2004). This could indicate that *A. pungens* may have deep physiological dormancy and require more time in cold storage than that used in the present experiment (90 days).

In this study, treatments T7 (4 °C for 60 days +  $H_2SO_4$  for 4 h) and T8 ( $H_2SO_4$  for 5 h + 1 000 ppm  $GA_3$  for 24 h)

El  $H_2SO_4$  es usado comúnmente como tratamiento pregerminativo en especies con cubiertas impermeables que dificultan la entrada de agua a la semilla; este método ha aumentado la germinación en especies de los géneros *Medicago*, *Arctostaphylos* y *Juniperus* (Martínez-Pérez et al., 2006; Peng, Xiao, Wang, & Yu, 2018; Tilki, 2007). *Arctostaphylos pungens* forma bancos de semillas (Márquez-Linares et al., 2006), indicando que son ortodoxas y su testa impide la entrada y salida de humedad, lo que hace necesaria una degradación de la testa. Los resultados de germinación en semillas tratadas con  $H_2SO_4$  fueron mayores que los señalados por Martínez-Pérez et al. (2006), quienes mencionan 63 % de germinación con exposiciones al  $H_2SO_4$  por 6 h y menores del 10 % con 5 h de inmersión. Asimismo, dichos autores mencionan que la germinación fue nula con inmersiones por menos de 5 h; en el presente estudio, la inmersión por 4 horas causó germinación de  $27.50 \pm 11.01 \%$ .

Los porcentajes pueden diferir debido a la semilla usada en los experimentos, ya que suelen presentarse libres o fusionadas por dos o más semillas (Jurado et al., 2011). En el presente estudio se utilizaron semillas libres únicamente; en el caso de Martínez-Pérez et al. (2006) no se menciona si se usaron semillas libres o fusionadas. En estudios con *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng, se menciona la dificultad de una germinación homogénea, debido a la variedad de tamaño de las semillas y la complejidad de acertar el tiempo necesario para que el  $H_2SO_4$  tenga los efectos deseados, además de que en semillas pequeñas se pueden provocar daños al embrión (García-Fayos et al., 2001). En el caso de *A. pungens* esto puede ocurrir de manera similar, ya que las semillas fusionadas podrían presentar una testa de mayor grosor, lo cual incrementaría el tiempo de inmersión necesario para que el  $H_2SO_4$  degrade suficientemente la barrera mecánica que representa la testa. Cabe destacar que las diferencias de germinación también podrían deberse a variaciones entre las poblaciones, procedencia y su producción de semillas (Pozo-Gómez et al., 2019). De acuerdo con las observaciones, se recomienda escoger semillas libres de tamaño mayor para evitar posibles daños causados por el tratamiento pregerminativo con  $H_2SO_4$ .

*A. pungens*, además de presentar una testa muy dura, posee una posible latencia fisiológica (Jurado et al., 2011; Martínez-Pérez et al., 2006). Los tratamientos que se enfocaron en romper la latencia fisiológica, basados en estratificación fría junto con choque térmico, no germinaron con excepción de una semilla del T4 (4 °C por 90 días + choque térmico de 100 °C por 5 min). Estos datos son menores que los encontrados por Jurado et al. (2011), quienes se dedicaron a romper la latencia desde un punto de vista de la ecología de la semilla de *A. pungens* y su relación con el fuego, incrementando la

sought to cover physiological and physical dormancy. For treatment T7, a longer cold storage period may have been necessary, as well as a longer immersion time in  $H_2SO_4$ . Treatment T8, with  $GA_3$  after the 5 h immersion in acid, although not statistically different, had a higher germination percentage and a lower GMT than the treatment that only consisted of immersion for 5 h in  $H_2SO_4$ . Other studies have mentioned the positive effects of  $GA_3$  on germination and dormancy breaking, replacing the need for a specific environmental stimulus such as temperature or light (Baskin & Baskin, 2004).

The time required for germination showed differences ( $P = 0.0128$ ). GMT ranged from 9 to 22 days after sowing; treatments with  $H_2SO_4$  had the shortest germination times, which started before 10 days after sowing, while the remaining treatments started on days 18 and 54 (Table 3; Figure 2).

The effect of  $H_2SO_4$  was also reflected in the time required for the seed to germinate, being lower in seeds immersed for a longer time.  $H_2SO_4$ , by reducing the barrier represented by the testa of *A. pungens*, facilitates the entry of water into the embryo to initiate imbibition and, consequently, germination; moreover, it helps the radicle to break the testa (Martínez-Calderón, Sosa-Ramírez, Torres-González, Mendieta-Vázquez, & Sandoval-Ortega, 2020). Other studies mention a T50 (time needed to reach 50 % of total germination) of 18 days (Martínez-Pérez et al., 2006);

germinación hasta en  $29.7 \pm 8.4 \%$  con una combinación de diversos factores (extracto de carbón vegetal, humo, frío y calor). Cabe destacar que, en dicho estudio, los porcentajes de germinación fueron relativamente bajos con tratamientos similares a los empleados en este trabajo, ya que con 40 días de almacenamiento en frío más choque térmico de  $100^\circ C$  lograron  $5.7 \pm 4.3 \%$  de germinación.

Se ha mencionado el efecto positivo de la estratificación en frío sobre la germinación en diversas especies (Baskin & Baskin, 2004) y el de la combinación con  $GA_3$  en especies de la misma familia que *A. pungens* (Ericaceae) como el género *Arbutus* (Bertsouklis & Papafotiou, 2013; Smiris et al., 2006). El frío estimula la ruptura de la latencia fisiológica como llega a ocurrir en la naturaleza por efecto del invierno. Dicha latencia puede ser desde no profunda, intermedia y profunda; está última requiere de tres a cuatro meses de frío (Baskin & Baskin, 2004). Lo anterior podría indicar que *A. pungens* quizá tenga latencia fisiológica profunda y requiera más tiempo de almacenamiento en frío que el utilizado en el presente experimento (90 días).

En este estudio, los tratamientos T7 ( $4^\circ C$  por 60 días +  $H_2SO_4$  por 4 h) y T8 ( $H_2SO_4$  por 5 h + 1 000 ppm  $GA_3$  por 24 h) buscaron cubrir latencia fisiológica y física. Para el tratamiento T7 pudo haber sido necesario un periodo de almacenamiento en frío más largo, así como mayor tiempo de inmersión en  $H_2SO_4$ . El tratamiento T8, al cual se le adicionó  $GA_3$  después de la inmersión de 5 h en

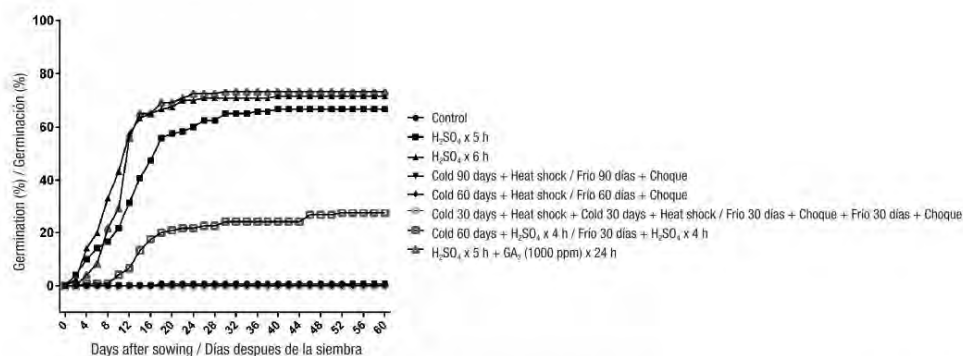


Figure 2. Cumulative germination curve of the eight pre-germination treatments in *Arctostaphylos pungens*. Scarification was carried out with  $H_2SO_4$  at a concentration of 98 %, stratification was based on cold storage ( $4^\circ C$ ) and heat shock consisted of placing the seeds in dry sand at  $100^\circ C$  for 5 min.

Figura 2. Curva de germinación acumulada de los ocho tratamientos pregerminativos en *Arctostaphylos pungens*. La escarificación se hizo con  $H_2SO_4$  a una concentración de 98 %, la estratificación se basó en el almacenamiento en frío ( $4^\circ C$ ) y el choque térmico consistió en colocar las semillas en arena seca a  $100^\circ C$  por 5 min.

the present study showed slightly shorter times of 16 days in the germination curve (Figure 2).

**Asexual propagation**

Cuttings showed 35.78 % survival at 12 weeks, but no root and callus were formed. The beginning of axillary bud development was observed after four weeks, but was not completed. This contrasts with that observed by Hart (2005) in other species of the genus *Arctostaphylos* with the possibility of rooting, differing in the use of the substrate (agrolite). Hart (2005) mentions that good aeration and drainage can be important factors for vegetative propagation and that, in medium-sized shrub or tree species such as *Arctostaphylos grandulosa* Eastw. cuttings can take three to five months to form roots. This may occur with *A. pungens*, being a large shrub species of 3 to 4 m, root formation would take longer.

Air layering showed no death of the branch used for layering, and there was callus (97.5 %) and root (37.50 %) formation. In general, after 20 weeks, the air layering had two to seven roots (80 %) newly formed; the rest had 10 to 18 roots (20 %). The size of these was mostly less than 10 mm (78.4 %) and the rest ranged from 10 to 25 mm (21.6 %).

Results show the possibility of inducing root formation for vegetative propagation of the species as observed in the wild (Luna-Ruiz et al., 2016) by air layering treated with AIB. This auxin has been successfully used to promote root formation in woody species useful for food, ornamental and, to a lesser extent, wild forest species (Abdel-Rahman, Abdul-Hafeez, & Saleh, 2020; Ramos-Palacios et al., 2012; Sánchez-Urdaneta et al., 2009).

The findings of the present study are similar to that occurred in a mangrove species (*Conocarpus erectus* L.) that formed shoots in cuttings but had no root development, while in air layering, root formation was achieved (Benítez-Pardo, Flores-Verdugo, & Flores-Verdugo, 2002). This may be because the species requires more than one season to achieve the formation of a good root system, which would not be achieved by scions or cuttings. Another factor that influences success is the season in which the vegetative propagation practice is carried out (Benítez-Pardo et al., 2002). In the present study, air layering was done in spring, reaching the end of their first growth stage, and they were removed in summer when they were in their second growing season.

As mentioned above, callus formation was observed in 97.50 ± 5 % of air layering. In various species, such a phenomenon may represent the onset of root formation as a consequence of cell differentiation

ácido, aunque no fue estadísticamente diferente, tuvo mayor porcentaje de germinación y un menor TMG que el tratamiento que únicamente constó de inmersión por 5 h en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. En otros estudios se han mencionado los efectos positivos del GA<sub>3</sub> sobre la germinación y el rompimiento de latencia, reemplazando la necesidad de un estímulo ambiental específico como la temperatura o luz (Baskin & Baskin, 2004).

El tiempo necesario para la germinación presentó diferencias (*P* = 0.0128). Los TMG variaron de 9 a 22 días después de la siembra; los tratamientos con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> presentaron los menores tiempos de germinación, la cual inició antes de los 10 días después de la siembra, mientras que los tratamientos restantes comenzaron en el día 18 y 54 (Cuadro 3; Figura 2).

El efecto del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> también se reflejó en el tiempo necesario para que la semilla germine, siendo menor en las semillas inmersas por más tiempo. El H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, al reducir la barrera que representa la testa de *A. pungens*, facilita la entrada de agua al embrión para iniciar la imbibición y, consecuentemente, la germinación; asimismo, ayuda a que la radícula rompa la testa (Martínez-Calderón, Sosa-Ramírez, Torres-González, Mendieta-Vázquez, & Sandoval-Ortega, 2020). En otros estudios se menciona un T50 (tiempo necesario para alcanzar 50 % de la germinación total) de 18 días (Martínez-Pérez et al., 2006); en el presente estudio se observaron tiempos un poco menores de 16 días en la curva de germinación (Figura 2).

**Propagación asexual**

Los esquejes presentaron supervivencia de 35.78 % a las 12 semanas, pero no formaron callo y raíz. El inicio del desarrollo de yemas axilares se observó a las cuatro semanas, pero no finalizó. Esto contrasta con lo observado por Hart (2005) en otras especies del género *Arctostaphylos* con posibilidad de enraizamiento, difiriendo en el uso del sustrato (agrolita). Hart (2005) menciona que la buena aeración y drenaje pueden ser factores importantes en la propagación vegetativa y que, en especies arbustivas medianas o arbóreas como *Arctostaphylos grandulosa* Eastw., los esquejes pueden tardar de tres a cinco meses en formar raíces. Esto puede ocurrir con *A. pungens*, siendo una especie arbustiva grande de 3 a 4 m, la formación de raíces tardaría más tiempo.

En los acodos aéreos no se observó muerte de la rama utilizada para realizar el acodo y hubo formación de callo (97.5 %) y raíz (37.50 %). En general, a las 20 semanas, los acodos aéreos tuvieron dos a siete raíces (80 %) formadas recientemente; el resto presentó 10 a 18 raíces (20 %). El tamaño de estas fue en su mayoría menor de 10 mm (78.4 %) y el resto varió de 10 a 25 mm (21.6 %).



(Ikeuchi, Sugimoto, & Iwasec, 2013). Callus formation is stimulated by the action of hormones (auxins and cytokinins), wounding, and genes involved in growth, developing a mass of undifferentiated cells and subsequent formation of plant organ regeneration, either shoot or root formation (Ikeuchi et al., 2013; Lozzi, Abdelwahd, Alami-Halimi, Mentag, & Abousalim, 2019; Lu, Liu, Lyu, Yuan, & Wu, 2019). Ikeuchi et al. (2013) mention that an intermediate ratio of auxins and cytokinins stimulates callus formation, while a higher ratio of auxins than cytokinins would stimulate root formation. This would indicate that *A. pungens* shows cytokinins that together with the auxins used (AIB) formed callus in most of the air layering, also accounting for the effect of the wound made in the air layering process. Callus formation in air layering, in other cases, can cover the cut and create a reconnection with the stock branch, delaying root formation (Sánchez-Urdaneta et al., 2009). This could also occur in the present study with *A. pungens*.

According to the results, both in cuttings and air layering, *A. pungens* is a species that requires more than one season for root formation. This makes it necessary to leave the air layering for more than 20 weeks to achieve root formation that allows the survival of the branch after separation from the mother bush, since air layering began to dry out a month after cutting because roots were not large enough to maintain the branch. There are no studies on vegetative propagation of *A. pungens*, which is common for wild forest species, although this form of reproduction can be an alternative for species with seed propagation problems (Benítez-Pardo et al., 2002; Ramos-Palacios et al., 2012). The results contribute to the understanding of *A. pungens* and knowledge for the improvement of propagation in reforestation and restoration programs. Even so, more studies are needed to obtain the desired results, especially considering the variety of seed sizes and their behavior in each region, given its wide distribution in the country. The vegetative propagation of *A. pungens* should be further explored, being this study a first step and knowing that, in some areas, it is the main means of reproduction. It would be advisable to continue research on *A. pungens* under nursery conditions, considering emergence, survival, use of substrates and fertilization to complete an ideal propagation scheme.

### Conclusions

Germination of *Arctostaphylos pungens* is improved by prolonged testa degradation in  $H_2SO_4$ . It is recommended to select larger seeds to avoid possible damage caused by the acid or to try other concentrations of  $H_2SO_4$  to achieve testa degradation without having to discard small seeds, so that the genetic diversity of the species is preserved. Air layering can work as an alternative

Los resultados muestran la posibilidad de inducir la formación de raíces para una propagación vegetativa de la especie como se ha observado en estado silvestre (Luna-Ruiz et al., 2016) por medio de acodos aéreos tratados con AIB. Esta auxina ha sido utilizada de manera exitosa para promover la formación de raíces en especies leñosas de interés alimenticio, ornamental y, en menor medida, en especies forestales silvestres (Abdel-Rahman, Abdul-Hafeez, & Saleh, 2020; Ramos-Palacios et al., 2012; Sánchez-Urdaneta et al., 2009).

Lo observado en el presente estudio es similar a lo ocurrido en una especie de mangle (*Conocarpus erectus* L.) que formó retoños en esquejes pero no desarrolló raíz, mientras que en acodos aéreos si se logró la formación radicular (Benítez-Pardo, Flores-Verdugo, & Flores-Verdugo, 2002). Esto se puede deber a que la especie requiere más de una estación para lograr la formación de un buen sistema radicular, que por medio de estacas o esquejes no se lograría. Otro factor que influye en el éxito es la estación en la que se realice la práctica de propagación vegetativa (Benítez-Pardo et al., 2002). En el presente trabajo, los acodos se realizaron en primavera llegando al final de su primera etapa de crecimiento y se retiraron en verano cuando estaban en su segunda temporada de crecimiento.

Como se mencionó anteriormente, la formación de callo se observó en  $97.50 \pm 5\%$  de los acodos aéreos. En diversas especies, dicho fenómeno puede representar el inicio de la formación radicular como consecuencia de la diferenciación celular (Ikeuchi, Sugimoto, & Iwasec, 2013). La formación de callo es estimulada por la acción de hormonas (auxinas y citoquininas), heridas y genes implicados en el crecimiento, desarrollando una masa de células indiferenciadas y subsecuente formación de regeneración de órganos de la planta, ya sea formación de brotes o raíz (Ikeuchi et al., 2013; Lozzi, Abdelwahd, Alami-Halimi, Mentag, & Abousalim, 2019; Lu, Liu, Lyu, Yuan, & Wu, 2019). Ikeuchi et al. (2013) mencionan que una proporción intermedia de auxinas y citoquininas estimula la formación de callo, mientras que una proporción mayor de auxinas que citoquininas estimularía la formación de raíces. Esto indicaría que *A. pungens* presenta naturalmente citoquininas que junto con las auxinas utilizadas (AIB) formaron callo en la mayoría de los acodos, contando además el efecto de la herida realizada en el proceso de elaboración del acodo. La formación de callo en acodos aéreos, en otros casos, puede llegar a cubrir el corte y formar una reconexión con la rama donante retrasando la formación de raíces (Sánchez-Urdaneta et al., 2009). Esto pudo ocurrir también en el presente estudio con *A. pungens*.

De acuerdo con los resultados, tanto en esquejes y acodos aéreos, *A. pungens* es una especie que requiere más de una estación para la formación de raíces. Lo

method to seed, leaving it for more than 20 weeks to achieve better root formation. It is recommended to continue experimenting with vegetative propagation to find the best method, trying different concentrations of indolbutyric acid, seasons of the year and substrates that allow greater aeration and drainage.

**Acknowledgments**

The first author would like to thank CONACYT and IDSCEA, Aguascalientes, for the funding granted to carry out his Doctoral studies. Thanks to Ing. Clemente Villalobos, owner of Rancho Piletas in Sierra Fría, for allowing us to carry out part of the experiment on his property. Also, thanks to Stephanie Olivares for her great help during the field research.

*End of English version*

**References / Referencias**

Abdel-Rahman, S., Abdul-Hafeez, E., & Saleh, A. (2020). Improving rooting and growth of *Conocarpus Erectus* stem cuttings using indole-3-butyric acid (IBA) and some biostimulants. *Scientific Journal of Flowers and Ornamental Plants*, 7(2), 109–129. doi: 10.21608/sjfo.2020.96213

Apodaca-Martínez, M., Cetina Alcalá, V. M., Jasso-Mata, J., López-López, M. Á., González-Rosas, H., Uscanga-Mortera, E., & García-Esteva, A. (2019). Ruptura de la latencia física y germinación de semillas de *Chiranthodendron pentadactylon* (Malvaceae). *Botanical Sciences*, 97(2), 211. doi: 10.17129/botsci.2094

Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seeds Science Research*, 14(1), 1–17. doi: 10.1079/SSR2003150

Benítez-Pardo, D., Flores-Verdugo, F., & Valdez-Hernández, J. I. (2002). Reproducción vegetativa de dos especies arbóreas en un manglar de la costa norte del Pacífico mexicano. *Madera y Bosques*, 8(2), 57–71. doi: 10.21829/myb.2002.821301

Bertsouklis, K. F., & Papafotiou, M. (2013). Seed germination of *Arbutus unedo*, *A. andrachne* and their natural hybrid *A. andrachnoides* in relation to temperature and period of storage. *HortScience*, 48(3), 347–351. doi: 10.21273/hortsci.48.3.347

Bonfil, C., & Trejo, I. (2010). Plant propagation and the ecological restoration of mexican tropical deciduous forests. *Ecological Restoration*, 28(3), 369–376. doi: 10.3368/er.28.3.369

Calva-Soto, K., & Pavón, N. P. (2018). Ecological restoration in México: An emerging discipline in a deteriorated country. *Madera y Bosques*, 24(1). doi: 10.21829/myb.2018.2411135

Challenger, A. (2003). Conceptos generales acerca de los ecosistemas templados de montaña de México y

anterior hace necesario dejar los acodos aéreos por más de 20 semanas para conseguir formación de raíz que permita la sobrevivencia de la rama después de la separación del arbusto madre, ya que los acodos comenzaron a secarse al mes del corte por no tener raíces suficientemente grandes para mantener a la rama. Cabe resaltar que no se cuenta con estudios sobre la propagación vegetativa de *A. pungens*, algo común en las especies forestales silvestres, a pesar de que tal forma de reproducción puede ser una alternativa para especies con problemas de propagación por semilla (Benítez-Pardo et al., 2002; Ramos-Palacios et al., 2012). Los resultados permiten el entendimiento de *A. pungens* y el conocimiento para la mejora de la propagación en programas de reforestación y restauración. Aun así, hacen falta más estudios para tener los resultados deseados, sobre todo contemplando la variedad de tamaños en las semillas y su comportamiento en cada región, dada su amplia distribución en el país. La propagación vegetativa de *A. pungens* debe ser más explorada, siendo este estudio un primer paso y sabiendo que, en algunas zonas, es el principal medio de reproducción. Sería recomendable continuar las investigaciones sobre el cultivo de *A. pungens* en vivero contemplando emergencia, supervivencia, uso de sustratos y fertilización para completar un esquema de propagación ideal.

**Conclusiones**

La germinación de *Arctostaphylos pungens* mejora con la degradación de la testa por un tiempo prolongado en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se recomienda la selección de semillas de mayor tamaño para evitar posibles daños causados por el ácido o probar con otras concentraciones de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para lograr la degradación de la testa sin tener que descartar semillas pequeñas, de tal forma que se conserve la diversidad genética de la especie. El acodo aéreo puede funcionar como método alternativo a la semilla, dejándolo por más de 20 semanas para lograr una mejor formación de la raíz. Se recomienda seguir experimentando en la propagación vegetativa con el fin de encontrar el mejor método, probando diferentes concentraciones del ácido indolbutírico, estaciones del año y sustratos que permitan mayor aireación y drenaje.

**Agradecimientos**

El primer autor agrade a CONACYT y al IDSCEA, Aguascalientes, por la beca otorgada para realizar sus estudios de doctorado. Se agradece al Ing. Clemente Villalobos, propietario de Rancho Piletas en Sierra Fría, por permitimos realizar parte del experimento en su propiedad. A Stephanie Olivares por su gran ayuda en el trabajo de campo.

*Fin de la versión en español*

- su estado de conservación. En Ó. Sánchez, E. Vega, E. Peters, & O. Monroy-Vilchis (Eds.), *Conservación de ecosistemas templados de montaña en México* (pp. 17–44). México: Instituto Nacional de Ecología (INE, SEMARNAT)/SyG.
- Challenger, A. & Soberón, J. (2008). Los ecosistemas terrestres de México. En CONABIO (Ed.), *Capital natural de México, Vol. I. conocimiento actual de la biodiversidad* (pp. 87–108). Ciudad de México, México: Comisión Nacional para el Conocimiento de la Biodiversidad-CONABIO.
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). (2015). *Manual de restauración forestal y reconversión productiva*. Jalisco, México: Author.
- Delgado, M. F., Cuba, M., Hechenleitner, P., & Thiers, O. (2008). Propagación vegetativa de taique (*Desfontainia spinosa*) y tepa (*Laurelopsis philippiana*) con fines ornamentales. *Bosque*, 29(2), 120–126. doi: 10.4067/s0717-92002008000200004
- Díaz-Núñez, V., Sosa-Ramírez, J., & Pérez-Salicrup, D. R. (2016). Vegetation patch dynamics and tree diversity in a conifer and oak forest in central Mexico. *Botanical Sciences*, 94(2), 229–240. doi: 10.17129/botsci.284
- Di-Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2016). InfoStat versión 2016. Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Retrieved from <http://www.infostat.com.ar>
- García-Fayos, P., Gullías, J., Martínez, J., Marzo, A., Melero, J. P., Traveset, A., ... Medrano, H. (2001). *Bases ecológicas para la recolección, almacenamiento y germinación de semillas de especies de uso forestal de la Comunidad Valenciana*. España: Banc de Llavors Forestals (Conselleria de Medi Ambient, Generalitat Valenciana).
- García-Regalado, G. (2014). *Plantas medicinales de Aguascalientes*. México: Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- González-Elizondo, M. S., & González-Elizondo, M. (2014). *Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 183 Ericaceae*. México: Instituto de Ecología, A.C.
- González-Espinosa, M., Ramírez-Marcial, N., Camacho-Cruz, A., Holz, S. C., Rey-Benayas, J. M., & Parra-Vázquez M. R. (2007). Restauración de bosques en territorios indígenas de Chiapas: modelos ecológicos y estrategias de acción. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 80S, S11–S23. doi: 10.17129/botsci.1753
- Hart, L. (2005). Propagating and cultivation of *Arctostaphylos* in relation to the environment in its natural habitat in California, USA. *The International Plant Propagators' Society Combined Proceedings*, 55, 291–294. Retrieved from [https://rng.net/publications/fnn/2007-winter/new-nursery-literature/propagation-and-cultivation-of-arctostaphylos-in-relation-to-the-environment-in-its-natural-habitat-in-california-u-s-a.9/?searchterm=Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. \(2013\). Plant callus: Mechanisms of induction and repression. \*Plant Cell\*, 25\(9\), 3159–3173. doi: 10.1105/tpc.113.116053](https://rng.net/publications/fnn/2007-winter/new-nursery-literature/propagation-and-cultivation-of-arctostaphylos-in-relation-to-the-environment-in-its-natural-habitat-in-california-u-s-a.9/?searchterm=Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant callus: Mechanisms of induction and repression. Plant Cell, 25(9), 3159–3173. doi: 10.1105/tpc.113.116053)
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2017). Conjunto de datos vectoriales de uso de suelo y vegetación. Escala 1:250 000. Serie VI. Retrieved from <https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=889463173359>
- Jurado, E., Márquez-Linares, M., & Flores, J. (2011). Effect of cold storage, heat, smoke and charcoal on breaking seed dormancy of *Arctostaphylos pungens* HBK (Ericaceae). *Phyton*, 80, 101–105. Retrieved from <http://www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar/vol80.html>
- Lozzi, A., Abdelwahd, R., Alami-Halimi, D., Mentag, R., & Abousalim, A. (2019). Optimization of a mature cotyledons-based in vitro culture system for embryogenic-callus induction in carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 25(1), 71–84. doi: 10.5154/rchscfa.2018.06.053
- Lu, Y., Liu, Z., Iyu, M., Yuan, Y., & Wu, B. (2019). Characterization of JsWOX1 and JsWOX4 during callus and root induction in the shrub species *Jasminum sambac*. *Plants*, 8(4), 1–13. doi: 10.3390/plants8040079
- Luna-Ruiz, J. de J., Moreno-Rico, O., Sosa-Ramírez, J., & Sánchez-Martínez, G. (2016). Fenología y estrategias de propagación de la manzanita en la Sierra Fría, Aguascalientes. In J. Sosa-Ramírez, O. Moreno-Rico, G. Sánchez-Martínez, J. de J. Luna-Ruiz, & M. E. Siqueiros-Delgado (Eds.), *Contribución al conocimiento ecológico del chaparral de manzanita (Arctostaphylos pungens Kunth) en la Sierra Fría, Aguascalientes* (pp. 52–71). México: Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Márquez-Linares, M., Jurado, E., & González-Elizondo, S. (2006). Algunos aspectos de la biología de la manzanita (*Arctostaphylos pungens* HBK) y su papel en el desplazamiento de bosques templados por chaparrales. *Ciencia UANL*, 9(2), 57–64. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/402/40290111.pdf>
- Martínez-Calderón, V. M., Sosa-Ramírez, J., Torres-González, J. A., Mendieta-Vázquez, A. G., & Sandoval-Ortega, M. H. (2020). Propagación de *Forestiera phillyroides*: una especie potencial para la restauración en el Centro-Norte de México. *Madera y Bosques*, 26(2), e2622052. doi: 10.21829/myb.2020.2622052
- Martínez-Pérez, G., Orozco-Segovia, A., & Martorell, C. (2006). Efectividad de algunos tratamientos pregerminativos para ocho especies leñosas de la Mixteca Alta oaxaqueña con características relevantes para la restauración. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 79, 9–20. doi: 10.17129/botsci.1729
- Meli, P., Martínez-Ramos, M., & Rey-Benayas, J. M. (2013). Selecting species for passive and active riparian restoration in southern Mexico. *Restoration Ecology*, 21(2) 163–165. doi: 10.1111/j.1526-100X.2012.00934.x
- Peng, Z., Xiao, H., Wang, F., & Yu, X. (2018). Seed germination tests of *Medicago ruthenica* (Leguminosae). *Seed Science and Technology*, 46(1), 149–156. doi: 10.15258/sst.2018.46.1.15
- Pozo-Gómez, D. M., Orantes-García, C., Rioja-Paradela, T. M., Moreno-Moreno, R. A., & Farrera-Sarmiento, O.

- (2019). Diferencias en morfometría y germinación de semillas de *Croton guatemalensis* (Euphorbiaceae), procedentes de poblaciones silvestres de la Selva Zoque, Chiapas, México. *Acta Botánica Mexicana*, 126, e1384. doi: 10.21829/abm126.2019.1384
- Ramos-Palacios, R., Orozco-Segovia, A., Sánchez-Coronado, M. E., & Barradas, V. L. (2012). Vegetative propagation of native species potentially useful in the restoration of Mexico City's vegetation. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83(3), 809–816. doi: 10.7550/rmb.21610
- Rubalcava-Castillo, F. A., Sosa-Ramírez, J., Luna-Ruiz, J. J., Valdivia-Flores, A. G., Diaz-Núñez, V., & Ñíguez-Dávalos, L. I. (2020). Endozoochorous dispersal of forest seeds by carnivorous mammals in Sierra Fria, Aguascalientes, Mexico. *Ecology and Evolution*, 10(6), 2991–3003. doi: 10.1002/ece3.6113
- Rzedowski, J. (2006). *Vegetación de México*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Saldías, G. (2016). Propagación vegetativa por esquejes de *Monttea chilensis* Gay. *Gayana Botánica*, 73(1), 25–31. doi: 10.4067/S0717-66432016000100004
- Sánchez-Urdaneta, A. B., Suárez, E., González, M. R., Amaya, Y., Comenares, C. B., & Ortega, J. (2009). Efecto del ácido indolbutírico sobre el enraizamiento de acodos aéreos de guayabo (*Psidium guajava* L.) en el municipio Baralt, Venezuela. Evaluación preliminar. *Revista UDO Agrícola*, 9(1), 113–120. Retrieved from <http://www.bioline.org.br/pdf?cg09016>
- Smiris, P., Pipinis, E., Aslanidou, M., Mavrokordopoulou, O., Milios, E., & Kouridakis, A. (2006). Germination study on *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) and *Podocytisus caramanicus* Boiss. & Heldr. (Fabaceae). *Journal of Biological Research*, 5, 85–91. Retrieved from <http://www.jbr.gr/papers20061/09-Smiris.pdf>
- Sosa-Ramírez, J., Moreno-Rico, O., Sánchez-Martínez, G., Luna-Ruiz, J. de J., & Siqueiros-Delgado, M. E. (2016). Contribución al conocimiento ecológico del chaparral de manzanita (*Arctostaphylos pungens* Kunth) en la Sierra Fria, Aguascalientes. México: Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Tilki, F. (2007). Preliminary results on the effects of various pre-treatments on seed germination of *Juniperus oxycedrus* L. *Seed Science and Technology*, 35(3), 765–770. doi: 10.15258/sst.2007.35.3.25
- Ventura-Rios, A., Plascencia-Escalante, F. O., Hernández de la Rosa, P., Ángeles-Pérez, G., & Aldrete, A. (2017). ¿Es la reforestación una estrategia para la rehabilitación de bosques de pino? Una experiencia en el centro de México. *Bosque*, 38(1), 55–66. doi: 10.4067/S0717-92002017000100007
- Zuloaga-Aguilar, S., Briones, O., & Orozco-Segovia, A. (2010). Effect of heat shock on germination of 23 plant species in pine-oak and montane cloud forests in western Mexico. *International Journal of Wildland Fire*, 19(6), 759–773. doi: 10.1071/WF08092