

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-Calderón¹; Joaquín Sosa-Ramírez^{2*}; Jesús M. Fuantos-Mendoza²; Diego R. Pérez-Salicrup³; J. de Jesús Luna-Ruíz²

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

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

³Universidad 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 H₂SO₄ (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 H₂SO₄ 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 H₂SO₄. 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 H₂SO₄ (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 H₂SO₄ 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 H₂SO₄. 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.

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-Salicrup, 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 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

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 Fría, Aguascalientes ($22^{\circ} 11' 56.07''$ N, $102^{\circ} 37' 54.88''$ 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 Fría. 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 Fría, Aguascalientes ($22^{\circ} 11' 56.07''$ N, $102^{\circ} 37'$

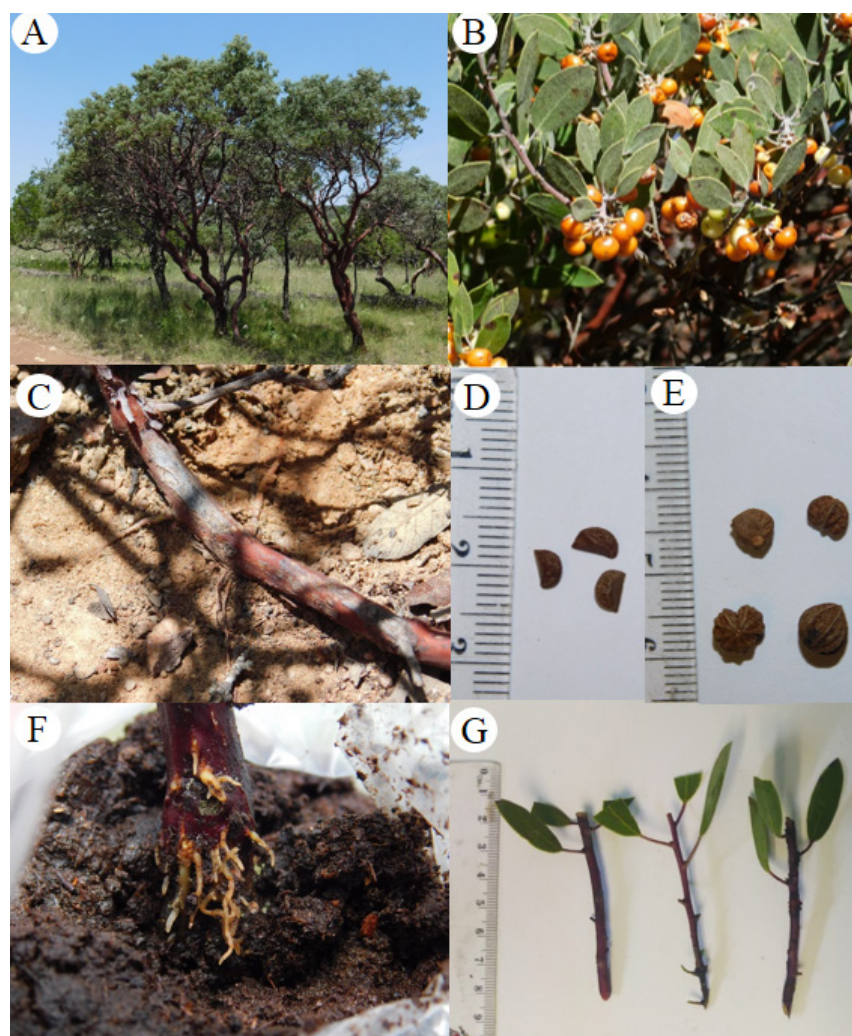


Figure 1. Details of *Arctostaphylos pungens* in the open field and experiments. A) Field specimens, B) fruit, C) natural vegetative propagation, D) free seeds, E) fused seeds, F) root formation in layering, G) size of cuttings used in the experiment.

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_2SO_4) 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 morfológica 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_2SO_4) 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_2SO_4 for 5 h / Inmersión en H_2SO_4 por 5 h
T3	Immersion in H_2SO_4 for 6 h / Inmersión en H_2SO_4 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_2SO_4 for 4 h / Estratificación 60 días + inmersión en H_2SO_4 por 4 h
T8	Immersion in H_2SO_4 for 5 h + immersion in gibberellic acid (GA_3 , 1 000 ppm) for 24 h / Inmersión en H_2SO_4 por 5 h + inmersión en ácido giberélico (GA_3 , 1 000 ppm) por 24 h

H_2SO_4 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_2SO_4 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 ± 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 ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 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 (18×25 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 95×15 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 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 ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 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 ± 0.04 g and had three free seeds per fruit. Seeds were small with a weight of 1.22 ± 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 ± 0.04 g y tuvieron tres semillas libres por fruto. Las semillas fueron de tamaño pequeño con peso de 1.22 ± 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 ± 1.22	6.65 ± 0.67	0.19 ± 0.04	3.43 ± 1.98	4.20 ± 0.53	2.96 ± 0.32	1.98 ± 0.30	1.22 ± 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 ± 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 ± 1.67 c	(18)
T2 (H_2SO_4 for 5 h) / T2 (H_2SO_4 por 5 h)	66.67 ± 9.81 a	13.91 ± 1.10 ab
T3 (H_2SO_4 for 6 h) / T3 (H_2SO_4 por 6 h)	71.67 ± 15.75 a	9.93 ± 1.47 a
T4 (4 °C for 90 days + heat shock) / T4 (4 °C por 90 días + choque térmico)	0.83 ± 1.67 c	(54)
T5 (4 °C for 60 days + heat shock) / T5 (4 °C por 60 días + choque térmico)	0 ± 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 ± 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 ± 11.01 b	22.02 ± 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 ± 15.63 a	11.55 ± 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 ± 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 ± 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 ± 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 ± 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 $100\text{ }^\circ\text{C}$ lograron 5.7 ± 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 ($4\text{ }^\circ\text{C}$ 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

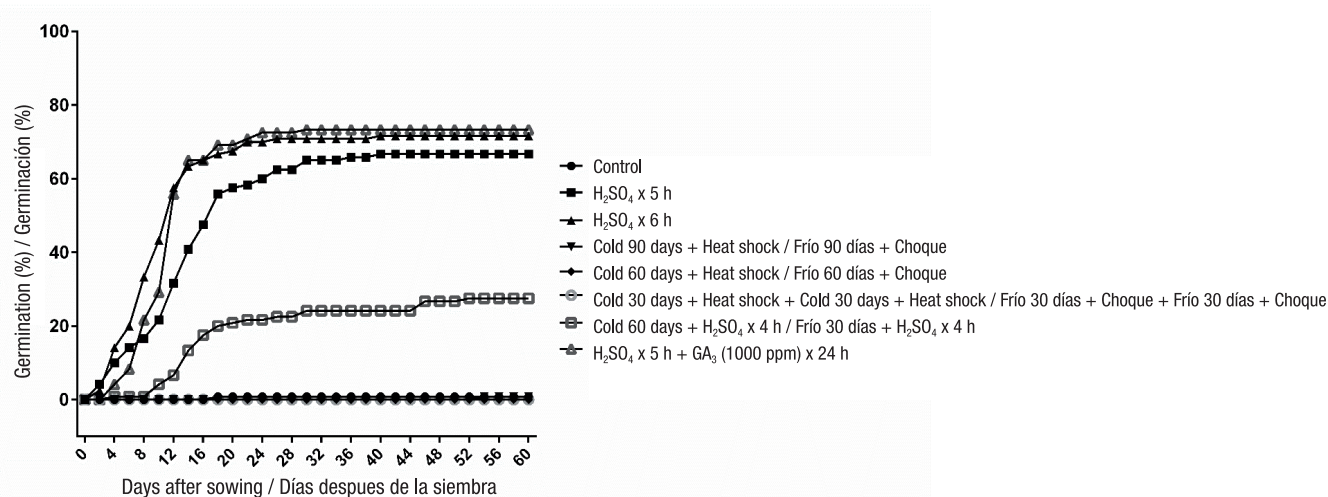


Figure 2. Cumulative germination curve of the eight pre-germination treatments in *Arctostaphylos pungens*. Scarification was carried out with H_2SO_4 at a concentration of 98 %, stratification was based on cold storage ($4\text{ }^\circ\text{C}$) and heat shock consisted of placing the seeds in dry sand at $100\text{ }^\circ\text{C}$ 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 ($4\text{ }^\circ\text{C}$) y el choque térmico consistió en colocar las semillas en arena seca a $100\text{ }^\circ\text{C}$ 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_2SO_4 . En otros estudios se han mencionado los efectos positivos del GA_3 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_2SO_4 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_2SO_4 también se reflejó en el tiempo necesario para que la semilla germine, siendo menor en las semillas inmersas por más tiempo. El H_2SO_4 , 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/sjfp.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 H₂SO₄. Se recomienda la selección de semillas de mayor tamaño para evitar posibles daños causados por el ácido o probar con otras concentraciones de H₂SO₄ 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 permitirnos 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 (*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/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., Gulias, 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://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.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., 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* (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 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 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., 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 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 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
- 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
- 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

