

Viability of grafting and air layering techniques in a *Brosimum alicastrum* Swartz plantation in Campeche, Mexico

Viabilidad de las técnicas de injerto y acodo en una plantación de *Brosimum alicastrum* Swartz en Campeche, México

Carlos A. Ortigoza-García¹; Alberto Santillán-Fernández^{1*}; Alfredo E. Tadeo-Noble¹; Benigno Rivera-Hernández²; Eugenio Carrillo-Ávila¹; Jaime Bautista-Ortega¹

¹Colegio de Postgraduados, Campus Campeche. Carretera Haltunchén-Edzná. C. P. 24450. Champotón, Campeche, México.

²Universidad Popular de la Chontalpa. Carretera Cárdenas-Huimanguillo. C. P. 86556. Cárdenas, Tabasco, México.

*Corresponding author: santillan.alberto@colpos.mx; tel.: +52 222 107 7329.

Abstract

Introduction. *Brosimum alicastrum* Swartz, a tree species with potential for both animal and human consumption, grows naturally with no silvicultural management.

Objective. To determine which asexual propagation technique (air layering or grafting) produces the best-quality nursery individuals, to evaluate its viability in a plantation.

Materials and methods. Completely randomized experimental designs were developed to evaluate air layering (factorial arrangement: substrate [coconut fiber, peat moss, and forest soil] and rooting hormone [Radix 10000® and no rooting hormone]) and grafting techniques (budding, side veneer, whip and tongue, and crown grafting). Subsequently, 10 individuals from each air layering and grafting treatment were randomly selected for plantation establishment. Survival and tree-measurement characteristics were evaluated for each treatment.

Results and discussion. The growth of air-layered clones was more significant with peat moss and forest soil substrates ($P = 0.05$); the rooting hormone had no significant effect. Bud grafting was not viable; success rates ranged from 65 % to 80 % with the other techniques. Some air layering and grafting treatments performed well in the nursery, but their individuals did not survive after transplanting them to the field. Air-layered clones using forest soil as a substrate showed the highest growth rates, as well as the greatest percentages of flowering (70 %) and fruit production (50 %) in the plantation.

Conclusions. Air-layered clones using forest soil and grafts using whip and tongue or crown grafting had the best characteristics in the plantation. The propagation method should be selected based on the intended final use of the germplasm (seed, leaf, or wood).

Keywords: Ramón tree; side veneer grafting; crown grafting; whip and tongue grafting; asexual propagation.

Resumen

Introducción. *Brosimum alicastrum* Swartz, especie arbórea con potencial para la alimentación animal y humana, se distribuye de manera natural con nulo manejo silvícola.

Objetivo. Determinar que técnica asexual (acodo o injerto) produce los mejores individuos en vivero, para evaluar su viabilidad en una plantación.

Materiales y métodos. Se desarrollaron diseños experimentales completamente al azar para evaluar la propagación de acodos (arreglo factorial: sustrato [fibra de coco, *peat moss* y tierra de monte] y enraizador [Radix 10000® y sin enraizador]) e injertos (yema, chapado lateral, inglés y corona). Posteriormente, se seleccionaron 10 ejemplares al azar de los tratamientos de acodos e injertos, para su establecimiento en una plantación. Se evaluó la sobrevivencia y los parámetros dasométricos en cada tratamiento.

Resultados y discusión. El crecimiento de los clones de acodos fue mayor con los sustratos *peat moss* y tierra de monte ($P = 0.05$); el enraizador no tuvo efecto significativo. El injerto en yema no fue viable; los prendimientos variaron de 65 a 80 % con las otras técnicas de injerto. Algunos tratamientos de acodo e injerto tuvieron buenos resultados en vivero, pero sus ejemplares no sobrevivieron en la plantación. Los clones de acodos con tierra de monte como sustrato tuvieron los mayores crecimientos y porcentajes de floración (70 %) y producción de frutos (50 %) en la plantación.

Conclusiones. Los clones de acodo con tierra de monte y los injertos (inglés y corona) presentaron las mejores características en la plantación. El método de propagación se debe seleccionar con base en el uso final del germoplasma (semilla, hoja o madera).

Palabras clave: árbol Ramón; injerto chapado lateral; injerto corona; injerto inglés; propagación asexual.

Introduction

Brosimum alicastrum Swartz, a tree species with significant potential for both animal and human consumption, grows naturally in the southeast of Mexico (Santillán-Fernández et al., 2024). Several studies have contributed to the understanding of seed propagation, nursery production, mycorrhizal associations, establishment under natural conditions, and the species' response to climate change, providing valuable insights for its silvicultural management. However, this body of knowledge remains limited, which has hindered the development of commercial plantations (Espinosa-Grande et al., 2023b). The successful establishment of such plantations requires trees with outstanding phenotypic traits; therefore, the propagation method used to obtain seedlings and clones is crucial for effective silvicultural management (Hernández-González et al., 2015).

The propagation of individuals with desirable traits for plantation establishment can be achieved either sexually, through seeds, or asexually, using techniques such as cuttings, grafting, and air layering. With advances in biotechnology, newer methods like *in vitro* propagation are becoming more widely used (Asadi & Shekafandeh, 2021). Regardless of the method chosen, effective nursery management is essential, as it directly influences the morphological quality of the seedlings and their capacity to adapt to field conditions (Rueda-Sánchez et al., 2012).

There is limited information available on propagation methods for *Brosimum alicastrum* (Espinosa-Grande et al., 2023a). Among vegetative propagation techniques, air layering and grafting have shown the most promising results (Ahsan et al., 2019). These asexual reproduction methods enable individuals with outstanding phenotypic and genotypic traits, as they are designed to replicate a selected parent tree. Therefore, careful selection of donor trees is crucial and should be based on the species' characteristics and intended end use (Yang et al., 2019).

Air layering and grafting have played a key role in fruit, horticultural, and forestry production. These techniques allow for the mass propagation of individuals with desirable traits, management of soil and disease-related issues, extension of crop lifespan, propagation of species that are difficult to grow from seed, and the rapid acquisition of germplasm with valuable genetic information and economically important traits in shorter timeframes (Espinoza-Arellano et al., 2012). However, these techniques reduce the genetic diversity of the species by the uniformity of the offspring, so the selection of parent trees helps preserve this diversity (Xu et al., 2022).

Introducción

Brosimum alicastrum Swartz, especie arbórea con amplio potencial para la alimentación animal y humana, se distribuye de manera natural mayormente en el sureste de México (Santillán-Fernández et al., 2024). Existen algunos aportes sobre la propagación por semilla, producción en vivero, micorrizas, establecimiento en condiciones naturales y respuesta al cambio climático que aportan conocimiento al manejo silvícola de la especie; sin embargo, aún es incipiente, lo que ha limitado el desarrollo de plantaciones comerciales (Espinosa-Grande et al., 2023b). En el establecimiento de estas plantaciones se requieren árboles con características fenotípicas sobresalientes, por lo que el método de propagación para la obtención de plántulas y clones es clave para un buen manejo silvícola (Hernández-González et al., 2015).

La propagación para la obtención de individuos con características deseables en el establecimiento de plantaciones puede ser de manera sexual mediante semilla o de manera asexual mediante técnicas de estaca, injerto y acodo. No obstante, con el avance de la biotecnología, técnicas nuevas como la propagación *in vitro* son más frecuentes (Asadi & Shekafandeh, 2021). Cualquiera que sea el método de propagación para las especies forestales, el manejo en vivero se refleja en la calidad de la plántula producida, a través de sus características morfológicas y de su capacidad de adaptación al sitio de plantación (Rueda-Sánchez et al., 2012).

Para *B. alicastrum* existe poca información sobre los métodos de propagación (Espinosa-Grande et al., 2023a). Dentro de las técnicas de reproducción vegetativa, los acodos e injertos han tenido las mejores evaluaciones (Ahsan et al., 2019). Dichas técnicas de reproducción asexual permiten la obtención de individuos con características fenotípicas y genotípicas sobresalientes, debido a que su función es generar una réplica del árbol selecto, de ahí la importancia de la elección adecuada de los árboles padre en función de la especie y la finalidad de uso (Yang et al., 2019).

Los acodos e injertos han desempeñado un papel fundamental en la producción frutícola, hortícola y forestal. Estos permiten la propagación masiva de ejemplares con características deseables, el manejo de problemas de suelos y enfermedades, la prolongación de la vida útil de los cultivos, la multiplicación de especies con dificultad de propagación por semilla y la obtención de germoplasma con información genética y rasgos de importancia económica en períodos más cortos (Espinoza-Arellano et al., 2012). Asimismo, dichas técnicas reducen la diversidad genética de la especie por la uniformidad de la descendencia, por lo que la selección de los árboles padre ayuda a mantener dicha diversidad (Xu et al., 2022).

Research on asexual propagation techniques for *B. alicastrum* is nearly nonexistent (Espinosa-Grande et al., 2023b). Therefore, research on effective mass propagation strategies for the species, while maintaining its genetic variation and productivity, is valuable (Hernández-González et al., 2015). This is particularly important given the species' role in the Yucatán Peninsula as an alternative plant resource for both animal and human nutrition in the context of food security and climate change (Ramírez-Sánchez et al., 2017). In this regard, the objective of the present study was to determine the asexual propagation method (grafting or air layering) that produces individuals with outstanding or suitable tree-measurement characteristics in the nursery, to evaluate their survival and growth in a plantation.

Materials and Methods

Study area and germplasm collection

The study was conducted at the experimental nursery located at the facilities of the Colegio de Postgraduados, campus Campeche (ColPos Campeche). The plant material of *B. alicastrum* was collected from locations near the research center (Figure 1). The region is

La investigación sobre técnicas de propagación asexual en la especie *B. alicastrum* es casi nula (Espinosa-Grande et al., 2023b). Por tanto, es valiosa la investigación en torno a estrategias efectivas de propagación masiva de la especie, manteniendo su variación genética y productividad (Hernández-González et al., 2015), dada la importancia de la especie en la península de Yucatán como un recurso vegetal alternativo para la alimentación animal y humana en el contexto de seguridad alimentaria y cambio climático (Ramírez-Sánchez et al., 2017). En este sentido, el objetivo de la presente investigación fue determinar el método de propagación asexual (injerto o acodo) que genere individuos con características dasométricas sobresalientes o adecuadas en vivero, para evaluar su sobrevivencia y crecimiento en una plantación.

Materiales y métodos

Área de estudio y colecta de germoplasma

El trabajo se realizó en el vivero experimental ubicado en las instalaciones del Colegio de Postgraduados campus Campeche (ColPos Campeche). El material vegetativo de *B. alicastrum* se recolectó en localidades aledañas al centro de investigación (Figura 1). La región

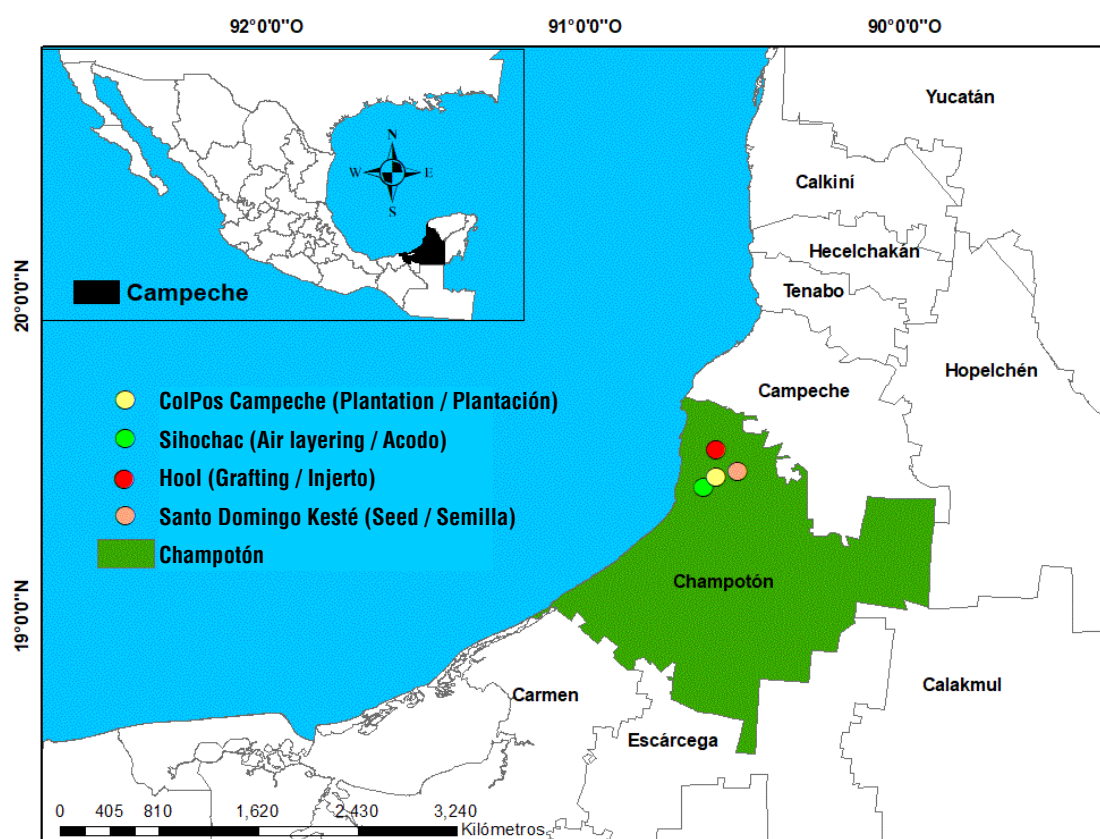


Figure 1. Spatial location of germplasm collection sources of *Brosimum alicastrum* in the state of Campeche

Figura 1. Ubicación espacial de las procedencias de recolecta de germoplasma de *Brosimum alicastrum* en el estado de Campeche.

characterized by evergreen tropical forests, clayey soils, and precipitation ranging from 800 to 1 200 mm, with dry periods lasting from three to seven months. The average annual temperature is 30 °C, with altitudes ranging from 30 to 80 m and a warm, humid climate (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad [CONABIO], 2024).

Seed collection for rootstock production

In November 2021, 500 *Brosimum alicastrum* fruits were collected from the evergreen tropical forest of Santo Domingo Kesté following the methodology described by Vallejos et al. (2010). Thirty trees with the best tree-measurement characteristics were selected, including greater height, larger diameter at breast height, and straight stem, with a minimum distance of 100 m between selected trees. The fruits were stored in sterilized plastic bags to be transported to the facilities of ColPos-Campeche in Champotón, Campeche, Mexico.

Damaged fruits, fruits with absent or damaged seeds, or fruits showing signs of pest and disease damage were discarded. The fruit was pulped to expose the seed, which was then washed with water to remove any remaining pericarp residues. On November 25, 2021, 400 seeds were placed to germinate in an area of 5 m x 5 m, which had been previously plowed and harrowed in the ColPos-Campeche forest area. The seeds were planted at a depth of 10 cm and spaced 25 cm apart, arranged in a rectangular grid pattern. Two weekly waterings of 1 liter per seedling were applied. The seedlings were maintained at the planting site for future use as rootstocks.

Asexual propagation with air layering

In late November 2022, an *in vivo* propagation experiment was carried out using air layering on young *B. alicastrum* trees (under 5 years old) from a plantation in Sihochac, Champotón, Campeche. During a field survey, healthy, vigorous, pest-free trees with straight stems and no branching were selected. A completely randomized experimental design with a factorial arrangement was used, where three substrate levels were evaluated (coconut fiber®, Peat moss®, and forest soil collected from areas where the species naturally grows) and two rooting hormone levels (Radix 10000® [5 g per experimental unit] and no rooting hormone), resulting in a total of six treatments with 20 repetitions per treatment.

Air layering was carried out on branches located at the selected trees' mid-crowns. Vigorous branches with an average diameter of 1 cm were chosen. Air layers were established 80 cm from the tip of the branch to the tree stem. Using a knife, a ring was made by removing the

se caracteriza por una cobertura de selva mediana subperennifolia, con suelos arcillosos y precipitaciones de 800 a 1 200 mm, con épocas de estiaje de tres a siete meses, temperatura media anual de 30 °C, altitudes de 30 a 80 m y clima cálido húmedo (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad [CONABIO], 2024).

Colecta de semilla para producción de patrones

En noviembre de 2021 se recolectaron 500 frutos de *B. alicastrum* en la selva mediana de Santo Domingo Kesté con base en la metodología descrita por Vallejos et al. (2010). Se seleccionaron 30 árboles con las mejores características dasométricas: mayor altura, mayor diámetro a la altura del pecho y fuste recto, con una distancia mínima entre árboles seleccionados de 100 m. Los frutos se almacenaron en bolsas esterilizadas de plástico para su traslado a las instalaciones del ColPos-Campeche en Champotón, Campeche, México.

Los frutos rotos, vanos o con síntomas de daño por plagas y enfermedades se eliminaron. El fruto se despulpó dejando al descubierto la semilla, que se lavó con agua para retirar los residuos del pericarpio. El 25 de noviembre de 2021 se pusieron a germinar 400 semillas en un área de 5 m x 5 m, previamente barbechada y rastreada en el área forestal del ColPos-Campeche. Las semillas se colocaron a una profundidad de 10 cm y distancia de 25 cm entre sí en un arreglo topológico de marco real. Se aplicaron dos riegos semanales de 1 L por plántula. Las plántulas se mantuvieron en el sitio de siembra para su uso posterior como portainjertos.

Propagación asexual por acodos

A finales de noviembre de 2022 se desarrolló un experimento de propagación *in vivo* por acodos en árboles jóvenes de Ramón (menores de 5 años) de una plantación en la localidad de Sihochac, Champotón, Campeche. Mediante un recorrido en campo se seleccionaron árboles sanos, vigorosos, libres de plagas y rectos sin bifurcación. Se consideró un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial, donde se evaluó el sustrato a tres niveles (fibra de coco®, Peat moss® y tierra de monte colectada de las áreas donde se distribuye la especie de manera natural) y el enraizador a dos niveles (Radix 10000® [5 g por unidad experimental] y sin enraizador), lo que dio un total de seis tratamientos con 20 repeticiones por tratamiento.

Los acodos se desarrollaron en ramas a mitad de la copa de los árboles seleccionados. Se buscaron ramas vigorosas con 1 cm de diámetro en promedio; los acodos se establecieron a 80 cm de distancia de la punta de la rama al tronco del árbol. Con una navaja se hizo

bark over an area of 2 cm, and to prevent scarring, the cambium and phloem were scraped off. Transparent plastic bags containing the substrates from the six treatments, previously moistened, were placed around the branches. The ends were sealed with black bags to prevent light and moisture loss, and they were watered every 15 days with 15 mL of water using a syringe, following the methodology described by Durán-Casas et al. (2013).

The survival rate (%) for each treatment was evaluated after a period of 90 days from the start of the experiment. Through destructive sampling, six specimens were randomly selected per treatment, and both root and shoot variables were measured. Root measurements included the length of the primary root (cm), number of roots, and fresh root weight (g) after removing substrate residues. Shoot measurements included plant diameter (cm), plant height (cm), fresh weight (g) of the stem without leaves, and fresh weight of the leaves. Additionally, dry weight (g) of roots, stems, and leaves were recorded after placing the plant material in a forced-air oven at 70 °C for 24 h.

To assess the effects of the substrates, the rooting agent, and their interaction on the development of the air-layered plants, the data was analyzed using an ANOVA and mean separation with Tukey's test ($\alpha = 0.05$). Pearson correlation analysis ($\alpha = 0.05$) was used to determine the relationships between shoot and root variables. Additionally, treatments with similar effects on plant development were grouped using principal component analysis (PCA, based on correlation methods). All statistical analyses were carried out using the open-access R statistical software, following verification of variable normality through the Shapiro-Wilk test (Venables & Smith, 2023).

Asexual propagation by grafting

In late November 2022, an *in vivo* grafting experiment was conducted at the experimental nursery of ColPos-Campeche. For the rootstock, *B. alicastrum* seedlings (one-year-old Ramón saplings) grown from seed were used. As scion material, vegetative cuttings (scion sticks) were collected from six mature Ramón trees – over five years old – located in the community of Hool. These trees were selected for their ability to produce healthy, vigorous, pest-free fruits and for having straight, unbranched stems. The identity of each source tree was maintained throughout the grafting process.

The selected scions were wrapped in a moist towel, transported from Hool to the campus Campeche, and placed vertically in containers with water to keep them hydrated until grafting, which took place the same day. Axillary buds of similar size and with green and erect

un anillado donde se eliminó la corteza en un área de 2 cm y con el fin de evitar la cicatrización se raspó la zona eliminando el cámbium y floema. En una bolsa de plástico transparente se introdujeron los sustratos de los seis tratamientos previamente humedecidos; sus extremos se sujetaron con bolsas negras para evitar la pérdida de luz y humedad y se regaron cada 15 días con 15 mL de agua con ayuda de una jeringa, conforme la metodología descrita por Durán-Casas et al. (2013).

A los 90 días de establecido el experimento se evaluó el porcentaje de sobrevivencia (%) por tratamiento. Mediante un muestreo destructivo se seleccionaron al azar seis ejemplares por tratamiento y se midieron variables de la parte radical como largo de la raíz principal (cm), número de raíces y peso fresco (g) de las raíces después de remover residuos de sustratos; y de la parte aérea como el diámetro de la nueva planta (cm), largo de la planta (cm), peso fresco (g) del tallo sin hojas y de las hojas. Además, se midió el peso seco (g) de raíces, tallo y hojas después de extraer el material vegetativo en una estufa con circulación de aire forzado a 70 °C durante 24 h.

Para determinar el efecto de los sustratos, enraizador o la interacción entre ambos en el desarrollo de los acodos, los datos se analizaron a través del análisis de varianza y separación de medias con prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Mediante la correlación de Pearson ($\alpha = 0.05$) se estableció la asociación que guardan entre sí las variables de la parte aérea de los acodos con las variables de la raíz. Además, se agruparon aquellos tratamientos que tuvieron efectos similares en el desarrollo de los acodos mediante un análisis de componentes principales (ACP, por el método basado en correlaciones). Los análisis estadísticos se desarrollaron en el *software* estadístico R de libre acceso, previa comprobación de la normalidad de las variables evaluadas por medio de Shapiro-Wilk (Venables & Smith, 2023).

Propagación asexual por injerto

A finales de noviembre de 2022 se desarrolló un experimento de propagación *in vivo* por injerto en el vivero experimental del ColPos-Campeche. Para el caso del patrón o portainjerto, se utilizaron plántulas de *B. alicastrum* producidas mediante semilla (árboles jóvenes de Ramón de un año). Para el caso del injerto se seleccionó, en la localidad de Hool, material vegetativo (varetas) de seis árboles de Ramón mayores de cinco años, con capacidad de producir frutos sanos, vigorosos, libres de plagas y rectos sin bifurcación. De cada árbol se mantuvo la identidad en los injertos.

Las varetas seleccionadas se colocaron en una toalla húmeda, se trasladaron de Hool al campus Campeche y se depositaron de manera vertical en frascos con agua para mantenerlas hidratadas durante el proceso de injertación

meristems were extracted from some scions by means of a longitudinal cut.

The grafting techniques applied were crown grafting, bud grafting, side veneer grafting, and whip and tongue grafting. A completely randomized experimental design was implemented, with each grafting technique considered as a treatment and replicated 20 times. Graft success rate (%) was evaluated at 30, 60, and 90 days after grafting. At 90 days, additional measurements were taken, including increase in stem diameter (cm), height (cm), and the number of shoots produced by the grafted material. Data was analyzed using an ANOVA and Tukey's test ($\alpha = 0.05$) for mean separation, in the open-access R statistical software, after confirming the normality of the evaluated variables with the Shapiro-Wilk test (Venables & Smith, 2023).

Setting up a plantation air-layered and grafted plants

Ninety days after the *in vivo* experiments were established, up to 10 surviving specimens per treatment, both air-layered and grafted, were randomly selected for establishment in a formal plantation 30 days later, at the facilities of the Colegio de Postgraduados, campus Campeche (Figure 2). Once separated from the mother plant, the air-layered specimens were transferred to 3 kg capacity bags containing their original substrates to allow continued root development

The selected grafted plants were removed from the area where their rootstocks had originally been planted. Additionally, in the plantation, *B. alicastrum* seedlings produced in the nursery from seed in November 2021, of the same age as the rootstocks, were included as controls. The plantation was established in late March 2023, following a completely randomized experimental design with a square planting arrangement, using a spacing of 3 meters between plants over a 1 000 m² area. Surviving individuals from the *in vivo* propagation phase were randomly distributed across the plot, including 30 grafted plants, 25 air-layered plants, and 10 control plants.

To prevent edge effects from influencing the experiment, *B. alicastrum* seedlings propagated from seed were planted around the perimeter of the plantation. The land was plowed and harrowed, and for the excavation of planting holes, dimensions of 30 cm in diameter by 40 cm in depth were used, with a 2-meter distance between experimental units. At the time of transplanting, worm compost was used to fill the planting holes of all experimental units in order to improve soil conditions. Given that it was a drought season for the region (April-July) (Santillán-Fernández

que fue el mismo día. En algunas varetas se extrajeron, mediante un corte longitudinal, yemas axilares de tamaños similares y con meristemos verdes y erectos.

Las técnicas de injerto utilizadas fueron: corona, yema, chapado lateral e inglés simple. Se estableció un diseño experimental completamente al azar, donde cada técnica de injerto se consideró como un tratamiento con 20 repeticiones. A los 30, 60 y 90 días se evaluó el porcentaje de prendimiento (%) y a los 90 días se midió el incremento en diámetro (cm), altura (cm) y número de brotes del material injertado. Los datos se analizaron a través del análisis de varianza y por la separación de medias con prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) en el *software* estadístico R de libre acceso, previa comprobación de la normalidad de las variables evaluadas por medio de Shapiro-Wilk (Venables & Smith, 2023).

Establecimiento de una plantación con acodos e injertos

A los 90 días de establecidos los experimentos *in vivo* se seleccionaron al azar un máximo de 10 ejemplares por tratamiento tanto de acodos como de injertos que sobrevivieron, para su establecimiento en una plantación formal 30 días después, en las instalaciones del Colegio de Postgraduados campus Campeche (Figura 2). Los ejemplares de acodo una vez separados de la planta madre, se pasaron a bolsas con capacidad de 3 kg con sus sustratos originales para que siguieran desarrollando raíces.

Los injertos seleccionados se removieron del área donde inicialmente se sembraron sus portainjertos. Adicionalmente, en la plantación, se consideraron como testigos los ejemplares de *B. alicastrum* producidos en vivero mediante semilla en noviembre de 2021, de la misma edad de los portainjertos. La plantación se estableció a finales de marzo de 2023 bajo un diseño experimental completamente al azar con un arreglo topológico de marco real, con una distancia de 3 m entre plantas en una superficie de 1 000 m². De manera aleatoria se distribuyeron los tratamientos de injerto (30 ejemplares), acodo (25) y testigo (10) que sobrevivieron a la propagación *in vivo*.

Para evitar que el efecto borde influyera sobre el experimento, las plántulas de *B. alicastrum* propagadas mediante semilla se sembraron alrededor de la plantación. El terreno se barbechó y rastreó; para la excavación de las cepas se consideraron dimensiones de 30 cm de diámetro por 40 cm de profundidad con una distancia de 2 m entre unidades experimentales. Al momento del trasplante, para rellenar las cepas de todas las unidades experimentales, se usó lombricomposta con la finalidad de mejorar las condiciones del suelo. Por ser una temporada de sequía para la región (abril-julio)



Figure 2. Plantation of *Brosimum alicastrum* with plants propagated by asexual (air layering and grafting) and sexual (seed) techniques.
Figura 2. Plantación de *Brosimum alicastrum* con ejemplares propagados mediante técnicas asexuales (acodo e injerto) y sexual (semilla).

et al., 2021a), a drip irrigation system was installed, and 10 liters of water were applied twice a week to each experimental unit.

The variables analyzed included survival rate (%), flowering (when at least one flower appeared, %), fruit production (when at least one fruit appeared, %), total height (cm), basal diameter (cm), and the number of leaves in each experimental unit for the treatments of air layering, grafting, and control. Measurements were taken at the end of each month from March to July 2023. The measurement from March was used as a baseline, and the monthly increments were analyzed from that point onward. Temporal representations of the increments for each treatment were created for the variables of total height, basal diameter, and number of leaves. Statistical differences were determined through the ANOVA and mean comparison using Tukey's test ($\alpha = 0.05$), with the aid of the open-access R statistical software, following verification of the normality of the evaluated variables using the Shapiro-Wilk test (Venables & Smith, 2023).

Results and Discussion

Sexual propagation

Out of the 400 seeds planted, 307 (76.75 %) germinated within 10 to 15 days. After 90 days, the survival rate was 64.25 % (257 plants), and after one year, 205 plants (51.25 %) survived, with an average height ranging

(Santillán-Fernández et al., 2021a), se instaló un sistema de riego por goteo y se aplicaron 10 L de agua dos veces por semana a cada una de las unidades experimentales.

Las variables analizadas fueron sobrevivencia (%), floración (cuando presentó al menos una flor, %), producción de frutos (cuando presentó al menos un fruto, %), altura total (cm), diámetro basal (cm) y número de hojas en cada una de las unidades experimentales por tratamiento tanto de acodos, injertos y testigo. Las mediciones se hicieron a finales de cada mes de marzo a julio de 2023. Se tomó como base la medición de marzo y a partir de ella se analizaron los incrementos por mes. Se hizo una representación temporal de los incrementos por tratamiento para las variables altura total, diámetro basal y número de hojas. Las diferencias estadísticas se determinaron por un análisis de varianza y pruebas de medias por Tukey ($\alpha = 0.05$) con ayuda del *software* estadístico R de libre acceso, previa comprobación de la normalidad de las variables evaluadas, por medio de Shapiro-Wilk (Venables & Smith, 2023).

Resultados y discusión

Propagación sexual

De las 400 semillas sembradas germinaron 307 (76.75 %) en un periodo de 10 a 15 días. A los 90 días, la sobrevivencia fue de 64.25 % (257 plantas) y al año de sembradas sobrevivieron 205 plantas (51.25 %) de altura

from 80 to 100 cm and diameters between 12 and 15 cm. Santillán-Fernández et al. (2021b) recorded a germination rate of less than 60 % under similar conditions, a limitation explained by the recalcitrant nature of *B. alicastrum* seeds, which makes them more sensitive to dehydration and rapid loss of viability (Santillán-Fernández et al., 2023).

Asexual propagation by layering

For all treatments, survival at 90 days exceeded 80 %. The shoot variables were significantly influenced ($Pr < 0.05$) by the substrate factor, while the rooting hormone and the substrate $\times$ rooting hormone interaction did not statistically affect these variables ($Pr > 0.05$), except for leaf fresh and dry weight. In the case of root variables, the rooting hormone factor was also not statistically significant ($Pr > 0.05$), whereas the substrate factor and the substrate $\times$ rooting hormone interaction were statistically significant ($Pr < 0.05$) only for the number of roots and the length of the primary root (Table 1).

promedio entre 80 y 100 cm con diámetros de 12 a 15 cm. Santillán-Fernández et al. (2021b) documentaron germinación menor de 60 % en condiciones similares, limitación que se explica por la propiedad recalcitrante de las semillas de *B. alicastrum* que las hace más sensibles a la deshidratación y pérdida rápida de viabilidad (Santillán-Fernández et al., 2023).

Propagación asexual por acodos

Para todos los tratamientos, la sobrevivencia a los 90 días fue superior al 80 %. Las variables aéreas fueron influenciadas significativamente ($Pr < 0.05$) por el factor sustrato, mientras que el enraizador y la interacción sustrato $\times$ enraizador no afectaron estadísticamente estas variables ($Pr > 0.05$), a excepción del peso fresco y seco de la hoja. Para el caso de las variables radicales, el factor enraizador tampoco fue estadísticamente significativo ($Pr > 0.05$), mientras que el factor sustrato y la interacción sustrato $\times$ enraizador fueron estadísticamente significativos ($Pr < 0.05$) solo para el número de raíces y largo de la raíz principal (Cuadro 1).

Table 1. Analysis of variance to determine the effect of substrate and rooting hormone on the viability of *Brosimum alicastrum* air layers.

Cuadro 1. Análisis de varianza para determinar el efecto del sustrato y enraizador en la viabilidad de acodos de *Brosimum alicastrum*.

System / Sistema	Variables	Substrate / Sustrato		Rooting hormone / Enraizador		Substrate $\times$ Rooting hormone / Sustrato $\times$ Enraizador	
		F-value / F-valor	Pr > F	F-value	Pr > F	F-value	Pr > F
Root / Radical	NRoot / NRaíz	3.37	0.0492*	0.25	0.6249	3.53	0.0459*
	LRoot / LRaíz	3.92	0.0405*	0.07	0.7947	3.42	0.0479*
	FWRoot / PFRaíz	0.72	0.5044	0.36	0.5587	0.36	0.8667
	DWRoot / PSRaíz	0.75	0.4923	0.36	0.5602	0.02	0.9767
Shoot / Aéreo	DPlant / DPlanta	3.73	0.0419*	0.16	0.6946	0.85	0.4531
	LPlant / LPlanta	3.52	0.0471*	0.26	0.6218	0.07	0.9366
	FWStem / PFTallo	3.85	0.0417*	0.54	0.4775	0.34	0.7207
	DWStem / PSTallo	3.39	0.0482*	0.57	0.4637	0.07	0.9338
	FWLeaf / PFHoja	3.56	0.0463*	0.49	0.4974	3.51	0.0461*
	DWLeaf / PSHoja	3.63	0.0439*	0.52	0.4848	3.57	0.0453*

*Significant at 5 % ($\alpha = 0.05$). L: length, NRoot: number of roots, FW: fresh weight, D: diameter, DW: dry weight.

*Significativo al 5 % ($\alpha = 0.05$). L: longitud, NRaíz: número de raíces, PF: peso fresco, D: diámetro, PS: peso seco.

The influence of substrates on the development of *B. alicastrum* clones propagated via air layering has been previously reported by Santillán-Fernández et al. (2021b), who concluded that substrate type plays a more critical role in determining clone quality than fertilization or irrigation. Despite these findings, studies on this topic remain scarce, underscoring the need for further research into how different substrates affect the growth and development of *B. alicastrum* air layers (Espinosa-Grande et al., 2023a; Santillán-Fernández et al. 2021b).

Coconut fiber and peat moss substrates showed the highest mean values for both shoot and root system, compared to the forest soil substrate (Table 2). Santillán-Fernández et al. (2021b) also found that the best characteristics in *B. alicastrum* clone development were achieved using commercial inputs; however, this does not necessarily equate to higher clone quality, and they recommend further evaluation under formal plantation conditions

In plant physiology, roots and leaves are two essential components. Roots enable plants to adapt to the soil environment and absorb water and nutrients, while leaves carry out photosynthesis (Rodríguez-Pérez, 2006).

In the present study, the interaction between substrate and rooting hormone was statistically significant ($P < 0.05$) for certain root and leaf variables (Table 3). Peat

El efecto de los sustratos en el desarrollo de los clones por acodo de *B. alicastrum* ha sido documentado por Santillán-Fernández et al. (2021b), quienes encontraron que la calidad de los clones se asocia más con el tipo de sustrato, por encima de la fertilización y riego. No obstante, existe poca investigación al respecto, lo que deja un área de oportunidad para el desarrollo de más conocimiento sobre el efecto de los sustratos en el desarrollo de los acodos de *B. alicastrum* (Espinosa-Grande et al., 2023a; Santillán-Fernández et al. 2021b).

Los sustratos fibra de coco y *peat moss* presentaron las mejores medias de las variables tanto para la parte aérea de los acodos como para la parte radical, en comparación con el sustrato tierra de monte (Cuadro 2). Santillán-Fernández et al. (2021b) encontraron que, en el desarrollo de clones de *B. alicastrum*, las mejores características se lograron cuando se emplearon insumos comerciales; sin embargo, no siempre esto implica calidad del clon, por lo que sugieren su evaluación en plantaciones formales.

En la fisiología de las plantas, dos componentes importantes son la raíz y las hojas; a través de las primeras, las plantas se adaptan al suelo y absorben nutrientes y agua, mientras que en las hojas se desarrollan sus procesos de fotosíntesis (Rodríguez-Pérez, 2006).

En el presente estudio, el efecto de la interacción sustrato $\times$ enraizador fue significativo ($P < 0.05$) para

Table 2. Effect of the type of substrate on *Brosimum alicastrum* layering viability.

Cuadro 2. Efecto del tipo de sustrato en la viabilidad de acodos de *Brosimum alicastrum*.

System/ Sistema	Variable	Coconut fiber/ Fibra de coco	Peat moss	Forest soil/ Tierra de monte
Root / Radical	NRoot/ NRaíz	8.50 $\pm$ 3.78 b	12.38 $\pm$ 6.67 a	12.00 $\pm$ 9.98 a
	LRoot/ LRaíz	7.63 $\pm$ 1.47 b	11.50 $\pm$ 3.81 a	7.50 $\pm$ 1.89 b
Shoot/ Aéreo	DPlant/ DPlanta	1.28 $\pm$ 0.15 a	1.06 $\pm$ 0.17 b	1.22 $\pm$ 0.21 a
	LPlant/ LPlanta	125.58 $\pm$ 19.67 b	198.15 $\pm$ 121.45 a	109.50 $\pm$ 31.05 b
	FWStem/ PFTallo	97.74 $\pm$ 23.17 a	63.75 $\pm$ 37.05 b	59.70 $\pm$ 54.77 b
	DWStem/ PSTallo	76.04 $\pm$ 11.63 a	47.23 $\pm$ 22.04 b	46.43 $\pm$ 40.27 b
	FWLeaf/ PFHoja	24.95 $\pm$ 12.20 b	31.75 $\pm$ 11.31 a	18.89 $\pm$ 2.84 c
	DWLeaf/ PSHoja	22.83 $\pm$ 10.64 b	28.52 $\pm$ 10.31 a	17.36 $\pm$ 2.45 c

L: length (cm), N: number of roots, FW: fresh weight (g), D: diameter (cm), DW: dry weight (g). Means followed by the same letter in a row are not statistically different according to Tukey's test ($P = 0.05$).

L: longitud (cm), N: número de raíces, PF: peso fresco (g), D: diámetro (cm), PS: peso seco (g). Medias con la misma letra por fila no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($P = 0.05$).

Table 3. Effect of substrate and rooting hormone interaction on *Brosimum alicastrum* layering viability.
Cuadro 3. Efecto de la interacción sustrato y enraizador en la viabilidad de acodos de *Brosimum alicastrum*.

Treatment/ Tratamiento	Interaction / Interacción		Root / Raíz		Leaf / Hoja	
	Substrate / Sustrato	Rooting hormone / Enraizador	Number / Número	Length (cm) / Largo (cm)	Fresh weight (g) / Peso fresco (g)	Dry weight (g) / Peso seco (g)
T1	Coconut fiber / Fibra de coco	Radix 10000®	7.50 ± 2.50 c	6.75 ± 0.75 c	33.61 ± 11.51 a	30.32 ± 10.01 a
T2	Coconut fiber / Fibra de coco	No rooting hormone / Sin enraizador	9.50 ± 4.50 c	8.50 ± 1.50 b	16.29 ± 3.92 b	15.35 ± 3.79 d
T3	Peat moss	Radix 10000®	14.00 ± 6.98 b	11.67 ± 2.69 a	30.73 ± 10.91 a	27.91 ± 9.89 b
T4	Peat moss	No rooting hormone / Sin enraizador	7.50 ± 0.50 c	11.00 ± 6.00 a	34.83 ± 11.89 a	30.33 ± 11.31 a
T5	Forest soil / Tierra monte	Radix 10000®	7.50 ± 2.06 c	7.50 ± 2.16 bc	18.66 ± 3.43 b	17.04 ± 2.94 c
T6	Forest soil / Tierra monte	No rooting hormone / Sin enraizador	21.00 ± 13.00 a	7.50 ± 1.50 bc	19.35 ± 0.64 b	18.00 ± 0.41 c

Means followed by the same letter in a column are not statistically different according to Tukey's test ($P = 0.05$).
Medias con la misma letra por columna no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($P = 0.05$).

moss with or without rooting hormone, resulted in the greatest primary root length; however, the highest number of roots was observed when only forest soil was used. According to Liao-Torres et al. (2012), in clones of tropical forest species, the development of a greater number of roots prior to separation from the mother plant depends on the substrate used. This is important, as it improves the new plant's ability to adapt to firm soil.

By correlating the shoot system variables of the air layers with the root system variables using Pearson's correlation, a strong, directly proportional relationship ($\rho > 0.95$) was found between fresh and dry weights of root, stem, and leaf variables (Figure 3). However, plant diameter (DPlant) was inversely correlated with root length (LRoot, $\rho = -0.82$), root dry weight (DWRoot, $\rho = -0.67$), root fresh weight (FWRoot, $\rho = -0.61$), number of roots (NRoot, $\rho = -0.41$), and plant length (LPlant, $\rho = -0.56$). In contrast, plant length (LPlant) showed a positive correlation with root length (LRoot, $\rho = 0.79$), root fresh weight (FWRoot, $\rho = 0.89$), and root dry weight (DWRoot, $\rho = 0.88$). These results suggest that thinner branches showed better root development than thicker ones. Findings agree with those reported by Santillán-Fernández et al. (2021b) for the evaluation of *B. alicastrum* air layers in Campeche; however, there is limited scientific literature documenting the air layering propagation technique for this species (Espinosa-Grande et al., 2023a).

The principal component analysis (PCA) revealed that the first component (Prin1) grouped variables related to the root system and accounted for 51.75 % of the total variance. The second component (Prin2) included the shoot variables of the air layers, explaining 30.39 % of

algunas variables de raíz y hoja (Cuadro 3). El sustrato *peat moss* con enraizador y sin enraizador produjo la mayor longitud de la raíz principal; sin embargo, el mayor número de raíces se obtuvo cuando solo se aplicó tierra de monte. De acuerdo con Liao-Torres et al. (2012), el desarrollo de un mayor número de raíces en los clones de especies forestales tropicales, antes de ser separados de la planta madre, está en función del sustrato utilizado y es importante porque permite al nuevo individuo una mayor adaptación a suelo firme.

Al asociar mediante la correlación de Pearson las variables del sistema aéreo de los acodos con las variables del sistema radical, se encontró, como era de esperarse, una relación alta y directamente proporcional ($\rho > 0.95$) entre los pesos frescos y secos de las variables de raíz, tallo y hoja (Figura 3). Sin embargo, el diámetro de la planta (DPlanta) se asoció inversamente con la longitud de la raíz (LRaíz, $\rho = -0.82$), peso seco de la raíz (PSRaíz, $\rho = -0.67$), peso fresco de la raíz (PFRaíz, $\rho = -0.61$), número de raíces (NRaíz, $\rho = -0.41$) y largo de la planta (LPlanta, $\rho = -0.56$); mientras que el largo de la planta (LPlanta) estuvo en proporción con el largo (LRaíz, $\rho = 0.79$), peso fresco (PFRaíz, $\rho = 0.89$) y peso seco de la raíz (PSRaíz, $\rho = 0.88$). Esto sugiere que las ramas más delgadas tuvieron mejor desarrollo de raíces que las de mayor diámetro. Los resultados coinciden con lo reportado por Santillán-Fernández et al. (2021b) para la evaluación de acodos de *B. alicastrum* en regiones de Campeche; sin embargo, se encontró poca literatura científica que reporte la técnica de propagación por acodos en esta especie (Espinosa-Grande et al., 2023a).

En el análisis de componentes principales (ACP) se encontró que el primer componente (Prin1) agrupó a las variables asociadas con la raíz y explicó 51.75 % de la

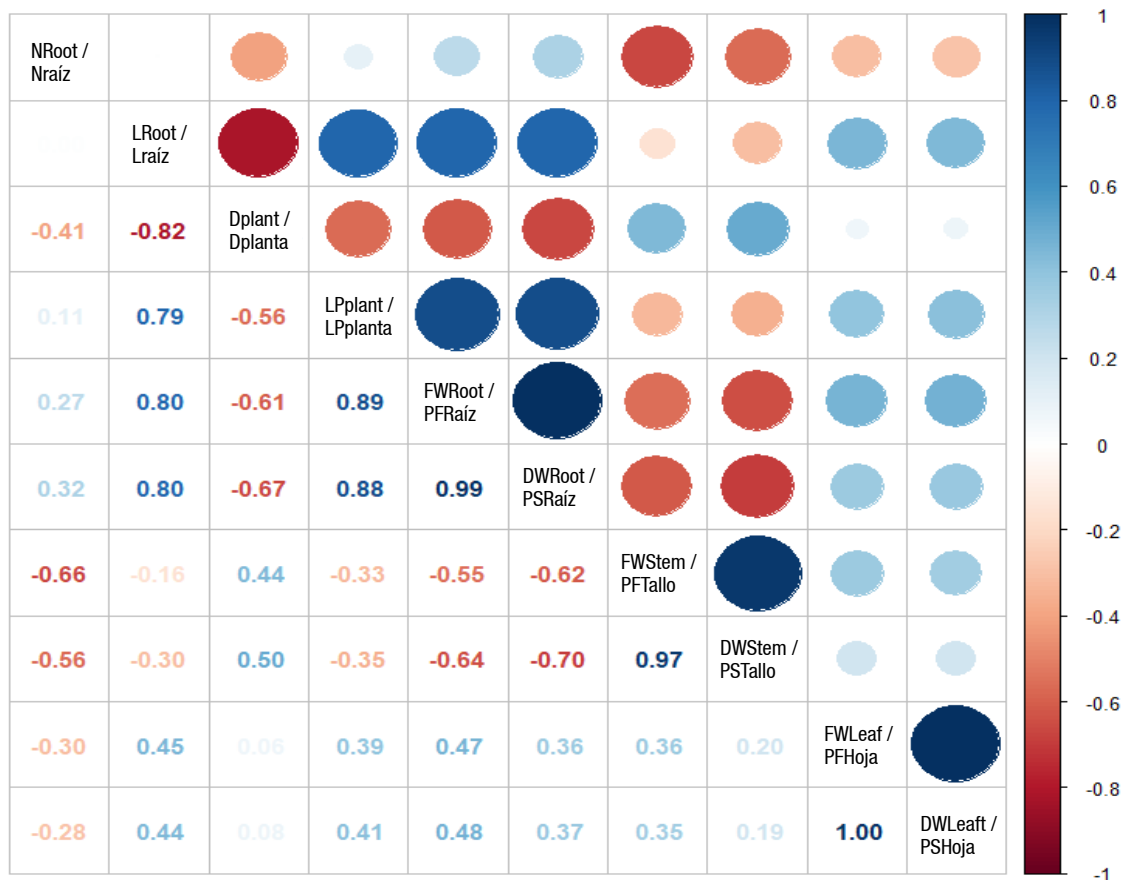


Figure 3. Pearson correlation matrix associates the shoot system variables of *Brosimum alicastrum* air layers with their root variables. L: length, NRoot: number of roots, FW: fresh weight, D: diameter, DW: dry weight.

Figura 3. Matriz de correlación de Pearson que asocia las variables del sistema aéreo de los acodos de *Brosimum alicastrum* con las variables de su raíz. L: longitud, Nraíz: número de raíces, PF: peso fresco, D: diámetro, PS: peso seco.

the variance. Together, these two components explained 82.14 % of the total variance. In Prin1, the most influential variables were root length (+0.44) and number of roots (-0.43), while in Prin2, the key variables were plant length (+0.51) and plant diameter (-0.50; Table 4). Negative values indicate an inversely proportional relationship, whereas positive values indicate a directly proportional one (Abdi & Williams, 2010).

The dispersion of eigenvalues for the six treatments revealed three distinct groups, primarily differentiated by the type of substrate (Figure 4).

- Group 1. Treatments with peat moss, characterized by air layers with the greatest shoot length and longest roots, but the smallest stem diameters and the fewest adventitious roots.
- Group 2. Treatments using forest soil. These air layers were distinguished by having intermediate root length but the highest number of adventitious

varianza total de los datos. El segundo componente (Prin2) integró a las variables aéreas de los acodos y explicó 30.39 %; entre ambos componentes explicaron 82.14 % de la varianza total de los datos. Dentro de la Prin1, las variables con mayor significancia fueron largo de la raíz (+0.44) y número de raíces (-0.43), de igual manera para la parte aérea (Prin2) fueron largo de la planta (+0.51) y diámetro de la planta (-0.50; Cuadro 4). El signo negativo en los valores indica una asociación inversamente proporcional y el signo positivo una asociación directamente proporcional (Abdi & Williams, 2010).

La dispersión de los autovalores (eigenvalues) para los seis tratamientos diferenció tres grupos compuestos básicamente por el tipo de sustrato (Figura 4).

- Grupo 1. Tratamientos con el sustrato *peat moss* con los acodos de mayor longitud en la parte aérea y las raíces más largas, pero con los diámetros de planta de menor grosor y con el menor número de raíces adventicias.

Table 4. Eigenvectors from the principal component analysis grouping the main variables of shoot and root systems of *Brosimum alicastrum* air layers.

Cuadro 4. Vectores propios (eigenvectors) del análisis de componentes principales que agrupan a las principales variables del sistema aéreo y radical de los acodos de *Brosimum alicastrum*.

System/Sistema	Variables		Eigenvectors	
	Description/Descripción	Code /Clave	Prin1	Prin2
Root/Radical	Number of roots / Número de raíces	NRoot / NRaíz	-0.43	0.17
	Root length / Largo de la raíz	LRoot / LRaíz	0.44	0.19
	Root fresh weight / Peso fresco de la raíz	FWRoot / PFRaíz	0.37	0.09
	Root dry weight / Peso seco de la raíz	DWRoot / PSRaíz	0.37	0.03
Shoot/Aéreo	Plant diameter / Diámetro de la planta	DPlant / DPlanta	0.12	-0.50
	Plant length / Largo de la planta	LPlant / LPlanta	0.15	0.51
	Stem fresh weight / Peso fresco del tallo	FWStem / PFTallo	-0.27	0.41
	Stem dry weight / Peso seco del tallo	DWStem / PSTallo	-0.31	0.33
	Leaf fresh weight / Peso fresco de las hojas	FWLeaf / PFHoja	0.14	0.43
	Leaf dry weight / Peso seco de las hojas	DWLeaf / PSHoja	0.15	0.33

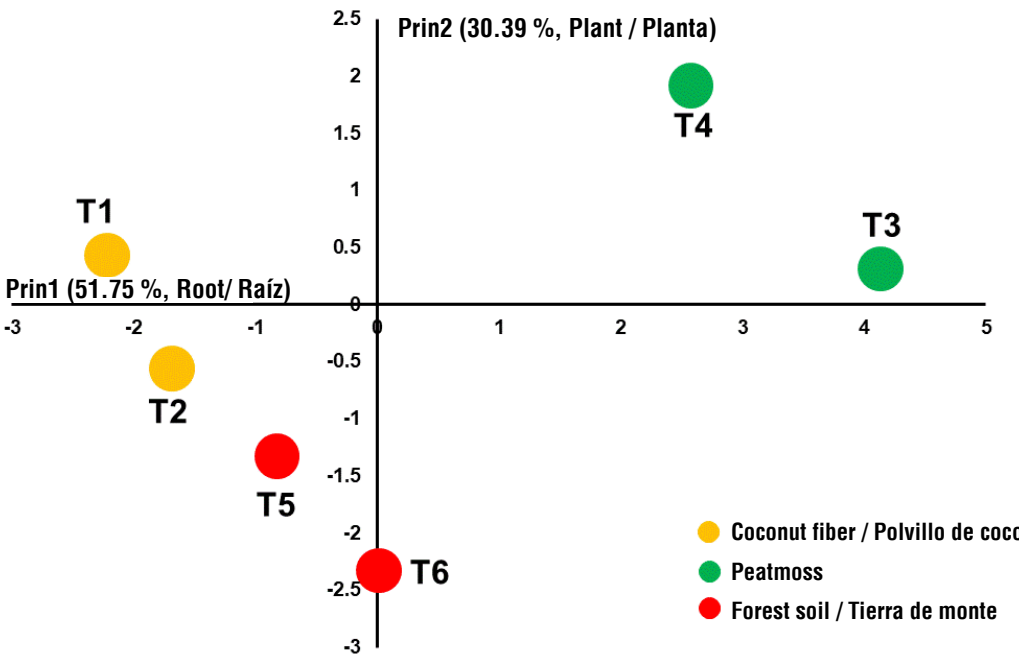


Figure 4. Classification of treatments based on their effect on *Brosimum alicastrum* air layer viability according to principal component analysis.

Figura 4. Agrupación de tratamientos en función de su efecto en la viabilidad de acodos de *Brosimum alicastrum* de acuerdo con la técnica multivariada de análisis de componentes principales.

roots. Additionally, although shoot size was the smallest, plant stem diameters were the largest.

- c) Group 3. Treatments with coconut fiber. These air layers developed shorter roots, an intermediate number of adventitious roots, and moderate values for shoot size and stem diameter.

The best shoot and root system characteristics were observed in air layers using peat moss, where the application of rooting hormone Radix 10000® had no significant effect. However, the air layers using forest soil without rooting hormone developed the highest number of adventitious roots, which may enhance the likelihood of successful adaptation to firm soil (Espinosa-Grande et al., 2023b). Alvarado-Aguayo and Munzón-Quintana (2019) reported that the effect of rooting hormones in tropical forest species is significant when combined with fertilization and irrigation, which in our case were limited.

Asexual propagation by grafting

The survival rate (%) of *B. alicastrum* experimental units propagated through grafting techniques under nursery conditions was evaluated at 30, 60, and 90 days (Table 5). At 30 days, all four grafting techniques showed some level of graft success. However, by the 90-day evaluation, the bud grafting technique resulted in total mortality of its experimental units. Santillán-Fernández et al. (2021b) reported that bud grafting is not a viable technique for this species, and our findings corroborate this conclusion.

The side veneer and whip and tongue grafting techniques had the highest mean graft success rates among the evaluated morphological parameters.

- b) Grupo 2. Tratamientos con sustrato tierra de monte. Los acodos se caracterizaron por tener la longitud intermedia de la raíz, pero con el mayor número de raíces adventicias. Además, aunque el tamaño de la parte aérea fue el menor, los diámetros de la planta fueron los mayores.

- c) Grupo 3. Tratamientos con sustrato polvillo de coco. Los acodos tuvieron raíz más pequeña, número intermedio de raíces adventicias y con los tamaños intermedios de la parte aérea y diámetro de planta.

Las mejores características de la parte aérea y radical las presentaron los acodos que se propagaron en el sustrato *peat moss*, donde el efecto del enraizador Radix 10000® no fue significativo. Sin embargo, los acodos propagados en el sustrato tierra de monte sin enraizador tuvieron el mayor número de raíces adventicias, lo que puede contribuir a que la adaptación a suelo firme tenga mayor probabilidad de éxito (Espinosa-Grande et al., 2023b). Alvarado-Aguayo y Munzón-Quintana (2019) documentaron que el efecto de los enraizadores en especies forestales tropicales es significativo cuando se complementa con fertilización y riego, que en nuestro caso fueron limitados.

Propagación asexual por injerto

La sobrevivencia (%) de las unidades experimentales de *B. alicastrum* propagadas por técnicas de injerto en condiciones de vivero se evaluó a los 30, 60 y 90 días (Cuadro 5). A los 30 días, las cuatro técnicas de injerto presentaron algún porcentaje de prendimiento; sin embargo, a los 90 días de seguimiento, la técnica de injerto yema tuvo mortandad total de sus unidades experimentales. Santillán-Fernández et al. (2021b) encontraron que la técnica de injerto yema no es viable para la especie, por lo que nuestro estudio lo corrobora.

Table 5. Graft survival and its effect on the quality of *Brosimum alicastrum* clones.

Cuadro 5. Sobrevivencia de injertos y su efecto en la calidad de clones de *Brosimum alicastrum*.

Treatment / Tratamiento	Grafting (%)			Number of individuals / Número de individuos	Diameter (cm) / Diámetro (cm)	Height (cm) / Altura (cm)	Shoots (n) / Brotos (n)
	30 days / 30 días	60 days / 60 días	90 days / 90 días				
Side veneer / Chapado lateral	90	75	65	13	3.09 ± 0.38 a	23.75 ± 2.17 a	3.75 ± 2.05 a
Whip and tongue grafting / Inglés	80	80	70	14	2.97 ± 0.33 a	21.89 ± 3.25 ab	3.22 ± 1.68 b
Crown grafting / Corona	100	80	80	16	2.65 ± 0.35 b	19.67 ± 2.06 b	3.14 ± 2.82 b
Budding / Yema	30	10	00	00	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 c

Means with the same letter per column are not statistically different according to Tukey's test ($P = 0.05$).

Medias con la misma letra por columna no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($P = 0.05$).

These results are consistent with those reported by Santillán-Fernández et al. (2021b) in regions of Campeche, where the species grows naturally. The side veneer, whip and tongue grafting, and crown grafting are all scion grafting techniques, in which direct contact is established between corresponding tissues (epidermis, vascular tissue, and parenchyma) of both the rootstock and the scion. In contrast, bud grafting involves primarily bark tissue and a minimal portion of cambium in the bud, which is attached on a tangent of the cambium of the rootstock (Xu et al., 2022). This structural difference may explain why bud or patch grafts are not viable for *B. alicastrum*.

Evaluation of a plantation using layering and grafting

At 120 days after the establishment of the *in vivo* experiments, grafting treatments showed survival rates exceeding 60 %, with crown grafting showing the highest survival (80 %, 16 experimental units), followed by whip and tongue grafting (70 %, 14 units) and side veneer (65 %, 13 units). Bud grafting, however, resulted in complete mortality, with no surviving experimental units. In the case of air layering treatments, the application of rooting hormone did not have a statistically significant effect. Furthermore, due to the destructive sampling process and mortality of some experimental units, treatments were grouped based on the type of substrate: forest soil (16 surviving units, combining those with and without rooting hormone), peat moss (14 units, combining those with and without rooting hormone), and coconut fiber (5 units).

In the initial plantation, five experimental units from the air layering treatment using coconut fiber as substrate were included; however, all five units failed to survive within the first 20 days. From April to July, the greatest increases in height and stem diameter were observed in individuals propagated by seed (control group) (Figure 5). According to Molina-Escalante et al. (2015), this can be attributed to the species' physiology, as seedlings propagated sexually tend to show greater growth compared to those propagated asexually. Additionally, the control plants were propagated in November 2021, whereas the air layers and grafts were established in November 2022.

On the other hand, when analyzing the cumulative increases in tree-measurement variables from April to July (using the initial measurements taken at the time of planting in March as the baseline), it was found that the *air layering_Forest soil* group showed the highest growth increments, with the highest flowering (70 %) and fruit production (50 %) percentages (Table 6). In fact, the fruits from air-layered plants were visually larger compared to those from grafted plants (Figure 6).

Las técnicas de injerto chapado lateral e inglés presentaron las mejores medias de prendimiento para los parámetros morfológicos evaluados. Estos resultados coinciden con los reportados por Santillán-Fernández et al. (2021b) en regiones de Campeche donde la especie se distribuye de manera natural. Los injertos chapado lateral, inglés y corona son injertos de vareta, donde al realizarse se hace contacto directo con cada órgano (epidermis, tejido vascular y parénquima) tanto del portainjerto como del injerto (vástago); mientras que en el injerto de yema la mayor parte es corteza y una proporción mínima de cámbium en la yema, mismas que se unen sobre una tangente del cámbium del portainjerto (Xu et al., 2022), lo que puede explicar porque los injertos de yemas o parches para *B. alicastrum* no son viables.

Evaluación de una plantación con acodos e injertos

A los 120 días de establecidos los experimentos *in vivo*, los tratamientos de injerto tuvieron sobrevivencia superior al 60 %: chapado lateral (65 %, 13 unidades experimentales), inglés (70 %, 14) y corona (80 %, 16) a excepción del injerto yema donde no sobrevivió alguna unidad experimental. Para el caso de los tratamientos de acodo, dado que el enraizador no tuvo efecto estadísticamente significativo y, debido al muestreo destructivo y a la mortandad de algunas unidades experimentales, se agruparon en tratamientos de: tierra de monte (sobrevivieron 16 unidades experimentales contabilizando las unidades con y sin enraizador), *peat moss* (14, sumando unidades con enraizador y sin enraizador) y fibra de coco (cinco).

En la plantación inicial se consideraron las cinco unidades experimentales del tratamiento de acodo con sustrato fibra de coco; sin embargo, a los 20 días, las cinco unidades experimentales no sobrevivieron. De abril a julio el mayor incremento en altura y diámetro lo presentaron aquellos ejemplares propagados mediante semilla (Testigo) (Figura 5), lo que se explica, de acuerdo con Molina-Escalante et al. (2015), por la fisiología de la especie, ya que el crecimiento de las plántulas propagadas sexualmente tiende a ser mayor que el de los ejemplares reproducidos asexualmente. Además, los testigos se propagaron en noviembre de 2021 y los acodos e injertos en noviembre de 2022.

Por otra parte, al analizar la suma de los incrementos en las variables dasométricas de abril a julio (tomando como base las medidas iniciales al establecer la plantación en marzo), se encontró que los ejemplares de Acodo_Tierra tuvieron los incrementos más altos e incluso presentaron los porcentajes de floración (70 %) y producción de frutos (50 %) más altos (Cuadro 6). De hecho, los frutos de acodo presentaron visualmente los mayores tamaños respecto a los de injerto (Figura 6).

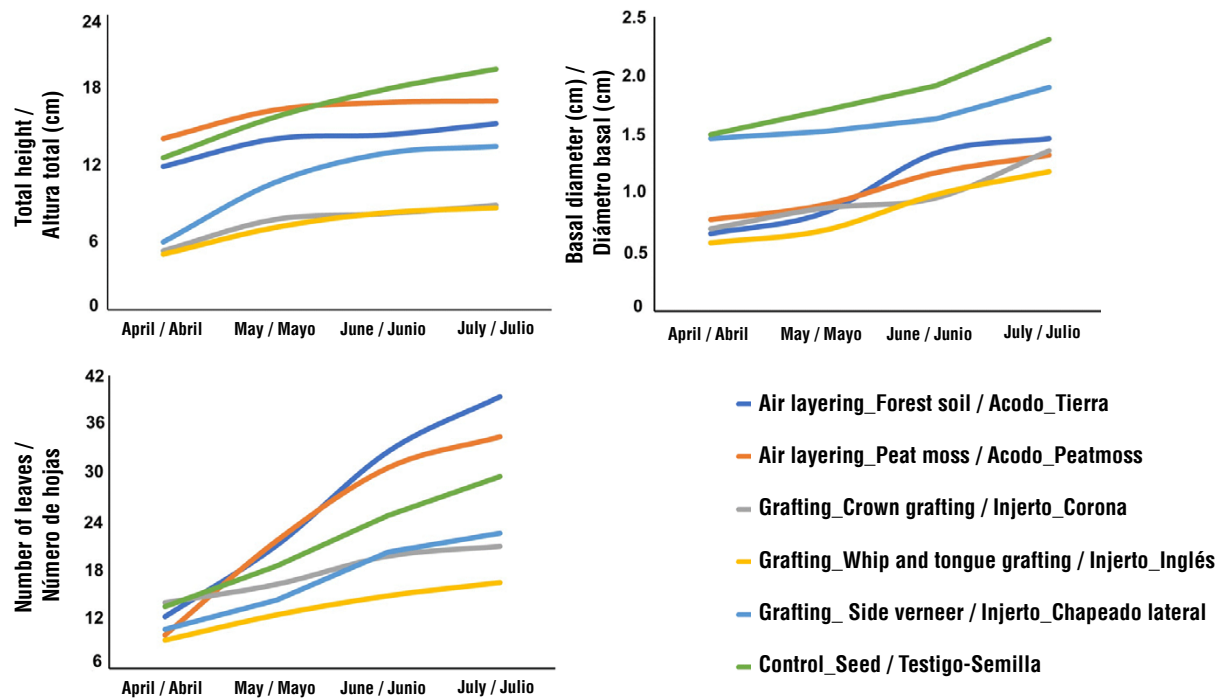


Figure 5. Temporal development of tree-measurement variables in *Brosimum alicastrum* propagated via asexual (air layering and grafting) and sexual (seed) techniques.

Figura 5. Desarrollo temporal de variables dasométricas de *Brosimum alicastrum* de ejemplares propagados mediante técnicas asexuales (acodo e injerto) y sexual (semilla).

Table 6. Increases in tree-measurement variables of *Brosimum alicastrum* individuals propagated by asexual techniques (air layering and grafting) and sexual techniques (seed) from April to July in Campeche, Mexico.

Cuadro 6. Incrementos en las variables dasométricas de individuos de *Brosimum alicastrum* propagados mediante técnicas asexuales (acodo e injerto) y sexual (semilla) en el periodo abril-julio en Campeche, México.

Treatment / Tratamiento	Individuals / Individuos		Tree measurement variables / Variables dasométricas			Structures / Estructuras	
	Initial / Inicial	Final	Total height (cm) / Altura total (cm)	Basal diameter (cm) / Diámetro basal (cm)	Number of leaves / Número de hojas	Flowering (%) / Floración (%)	Fruit (%) / Fruto (%)
Grafting_Side veneer / Injerto_Chapado Lateral	10	7	22.73 ± 4.23 b	2.93 ± 0.56 a	39.33 ± 9.64 c	20	0
Control_Seed / Testigo_Semilla	10	8	30.03 ± 10.72 a	3.12 ± 0.83 a	53.29 ± 11.53 b	0	0
Grafting_Whip and tongue grafting / Injerto_Inglés	10	5	15.70 ± 3.34 c	2.42 ± 0.67 b	33.60 ± 9.11 c	40	20
Grafting_Crown grafting / Injerto_Corona	10	6	15.35 ± 2.31 c	2.65 ± 0.89 b	35.00 ± 6.63 c	40	20
Air layering_Forest soil / Acodo_Tierra	10	8	29.49 ± 5.91 ab	2.73 ± 0.21 b	90.00 ± 12.79 a	70	50
Air layering_Peat moss / Acodo_Peat moss	10	6	32.33 ± 6.72 a	2.20 ± 0.27 b	81.33 ± 15.75 a	30	0

Means with the same letter per column are not statistically different according to Tukey's test ($P = 0.05$).

Medias con la misma letra por columna no son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($P = 0.05$).

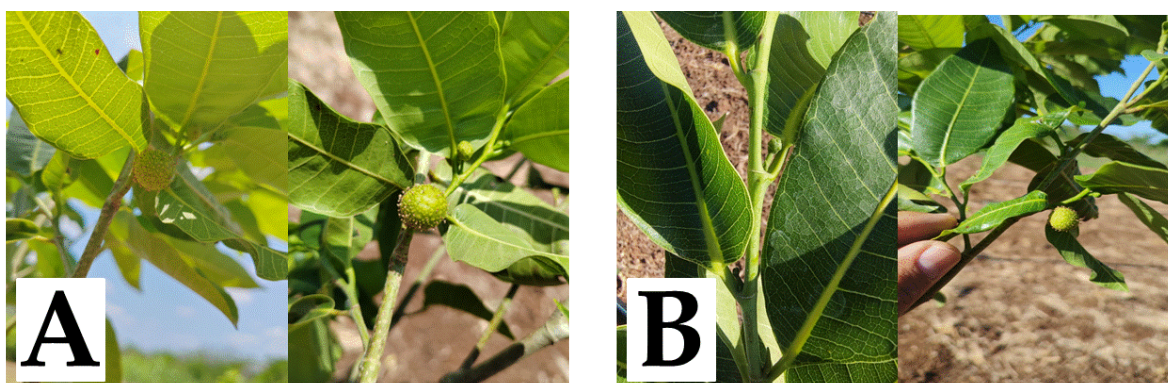


Figure 6. Visual differences in fruit size of *Brosimum alicastrum* propagated via air layering (A) and grafting (B).

Figura 6. Diferencias visuales en tamaños de fruto de *Brosimum alicastrum* propagados mediante acodo (A) e injerto (B).

However, there is limited scientific literature reporting on propagation techniques using air layering and grafting for *B. alicastrum* (Espinosa-Grande et al., 2023a), which suggests that these findings may contribute to improving the propagation of a species with emerging economic potential.

Conclusions

In air layering propagation, the type of substrate favored root development and the growth of *Brosimum alicastrum* clones, whereas the application of rooting hormones had no significant effect. Therefore, under conditions similar to those studied, the use of rooting hormones is not considered necessary. Bud grafting was also not a viable method. It is recommended to explore alternative grafting techniques, given the limited knowledge of their effects on this species, as well as to examine other management factors and the timing of propagation. It is important to note that while some air layering and grafting techniques showed positive results in nursery, the propagated individuals did not survive after transplantation. Clones propagated through air layering using forest soil as a substrate had the greatest increases in growth, flowering rates, and fruit production in plantation, likely due to enhanced root development.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) for the scholarship granted to the corresponding author. This work is part of the project entitled “Relationship between seed morphometry and viability, nursery seedling quality, and adaptation to plantation conditions in *Brosimum alicastrum* Swartz in the Yucatán Peninsula, Mexico”, project code CONV_RGAA_2023_06. The project was funded by the Colegio de Postgraduados under Call 2023-03, aimed

No obstante, se encontró poca literatura científica que reporte las técnicas de propagación por acodos e injertos para *B. alicastrum* (Espinosa-Grande et al., 2023a), por lo que estos resultados pueden ayudar a mejorar la propagación de una especie con reciente potencial económico.

Conclusiones

En la propagación por acodo, el tipo de sustrato propició el desarrollo de raíces y el crecimiento de los clones de *Brosimum alicastrum*, mientras que el enraizador no tuvo efecto significativo; por tanto, bajo condiciones similares a las estudiadas, es más viable no aplicar enraizadores. El injerto por yema tampoco fue viable. Se recomienda aplicar otras técnicas de injerto dado el escaso conocimiento de su efecto en la especie y examinar otros factores de manejo y la época del año en la que se desarrolle. Es importante considerar que algunas técnicas de acodo e injerto tuvieron buenos resultados en vivero, pero sus ejemplares no sobrevivieron en la plantación. Los clones de los acodos con tierra de monte como sustrato tuvieron los mayores incrementos en crecimiento y porcentajes de floración y producción de frutos en la plantación, como respuesta a un mayor desarrollo de raíces.

Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la cátedra otorgada al autor de correspondencia. Este trabajo forma parte del proyecto “Relación de la morfometría con la viabilidad en las semillas, calidad de plántula en vivero y adaptación a una plantación de *Brosimum alicastrum* Swartz en la península de Yucatán, México” con clave CONV_RGAA_2023_06, financiado por el Colegio de Postgraduados en el marco de la convocatoria 2023-03, para el apoyo de proyectos de investigación e incidencia orientados a fortalecer las actividades de conservación,

at supporting research and outreach projects focused on strengthening the conservation, preservation, and sustainable use of genetic resources for food and agriculture (RGAA).

Conflicts of interest

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

preservación y uso sustentable de los recursos genéticos para la alimentación y la agricultura (RGAA).

Conflictos de interés

Los autores declaramos que no tenemos conflictos de intereses económicos ni relaciones personales conocidas que pudieran haber influido en la investigación presentada en este artículo.

End of English version

Fin de la versión en español

References / Referencias

- Abdi, H., & Williams, L. J. (2010). Principal component analysis. *Wiley interdisciplinary reviews: Computational Statistics*, 2(4), 433–459. <https://doi.org/10.1002/wics.101>
- Ahsan, M. U., Hayward, A., Alam, M., Bandaralage, J. H., Topp, B., Beveridge, C. A., & Mitter, N. (2019). Scion control of miRNA abundance and tree maturity in grafted avocado. *BMC Plant Biology*, 19(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1994-5>
- Alvarado-Aguayo, A., & Munzón-Quintana, M. (2019). Evaluación de la efectividad de gel de sábila y agua de coco como enraizantes naturales en diferentes sustratos para propagación asexual de árboles de *Ficus benjamina*. *Agronomía Costarricense*, 44(1), 65–77. <https://doi.org/10.15517/rac.v44i1.40002>
- Asadi, Z. A. M., & Shekafandeh, A. (2021). In vitro grafting of ‘Sahand’ cultivar on two wild almond rootstocks and evaluation of its some physiological and biochemical traits vis-a-vis different rootstocks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 145, 507–516. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02021-6>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2024). *Portal de Geoinformación. Climatología*. <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/>
- Durán-Casas, S., Veloza Suan, C., Magnitskiy, S., & Lancheros, H. O. (2013). Evaluation of uva camarona (*Macleania rupestris* Kunth AC Smith) propagation with air layering. *Agronomía Colombiana*, 31(1), 18–26. <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v31n1/v31n1a03.pdf>
- Espinosa-Grande, E., Chávez-Vergara, B. M., Vargas-Díaz, A. A., Tadeo-Noble, A. E., Bautista-Ortega, J., Cetina-Alcalá, V. M., Uicab-Brito, L. A., & Santillán-Fernández, A. (2023a). El efecto de los consorcios micorrícicos y el tipo de fertilización en la calidad de plántulas en un vivero del árbol Ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz) en Campeche, México. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 24(3), e3082. https://doi.org/10.21930/rcta.vol24_num3_art:3082
- Espinosa-Grande, E., Santillán-Fernández, A., Chávez-Vergara, B., Vargas-Díaz, A. A., Tadeo-Noble, A. E., & Bautista-Ortega, J. (2023b). Space-time analysis of scientific research on *Brosimum alicastrum* Swartz. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 76(1), 10247–10261. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v76n1.101008>
- Espinoza-Arellano, J. J., Chew-Madinaveitia, Y. I., & Gaytán-Mascorro, A. (2012). Evaluación económica del uso de injerto en tomate (*Lycopersicon esculentum* M.) bajo condiciones de invernadero. *Agrofaz: publicación semestral de investigación científica*, 12(4), 57–62. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5504046>
- Hernández-González, O., Vergara-Yoisura, S., & Larqué-Saavedra, A. (2015). Primeras etapas de crecimiento de *Brosimum alicastrum* Sw. en Yucatán. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(27), 38–49. <https://www.scielo.org.mx/pdf/remcf/v6n27/v6n27a4.pdf>
- Liao-Torres, J. O., Imán-Correa, S. A., & Soplin-Ríos, J. A. (2012). Efecto de la ubicación y diámetro de la rama en tres genotipos promisorios de *Myrciaria dubia* (H.B.K.) “camu camu” para propagación vegetativa por acodo aéreo. *Scientia Agropecuaria*, 3(3), 225–233. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2012.03.04>
- Molina-Escalante, M. O., Castillo-Guerra, L. O., Parada-Berrios, F. A., Lara-Ascencio, F., & Linares, A. Y. (2015). Caracterización morfológica *in situ* de Ojushte (*Brosimum alicastrum* Swartz) y su incidencia en la selección de germoplasma de alto potencial nutricional en El Salvador. *Producción Agropecuaria y Desarrollo Sostenible*, 3, 61–76. <https://doi.org/10.5377/payds.v3i0.3972>
- Ramírez-Sánchez, S., Ibáñez-Vázquez, D., Gutiérrez-Peña, M., Ortega-Fuentes, M. S., García-Ponce, L. L., & Larqué-Saavedra, A. (2017). El Ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz) una alternativa para la seguridad alimentaria en México. *Agro Productividad*, 10(1), 80–83. <https://www.revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/943>
- Rodríguez-Pérez, L. (2006). Implicaciones fisiológicas de la osmorregulación en plantas. *Agronomía Colombiana*, 24(1), 28–37. <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v24n1/v24n1a04.pdf>
- Rueda-Sánchez, A., Benavides-Solorio, J. d. D., Prieto-Ruiz, J. Á., Sáenz-Reyez, J., Orozco-Gutiérrez, G., & Molina-Castañeda, A. (2012). Calidad de planta producida en los viveros forestales de Jalisco. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 3(14), 69–82. <https://www.scielo.org.mx/pdf/remcf/v3n14/v3n14a6.pdf>
- Santillán-Fernández, A., Calva-Castillo, A., Vázquez-Bautista, N., Huicab-Pech, Z. G., Larqué-Saavedra, A., & Bautista-Ortega, J. (2021a). Balance hidro-climático de *Brosimum alicastrum* Sw. y su variabilidad ante escenarios de cambio climático en la península de Yucatán, México. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 44(1), 41–49. <https://doi.org/10.35196/rfm.2021.1.41>
- Santillán-Fernández, A., Castañeda-Alonso, S. S., Carrillo-Ávila, E., Tadeo-Noble, A. E., Bautista-Ortega, J., Vera López, J. E., &

- Alatorre-Cobos, F. (2023). Morphometry and viability of *Brosimum alicastrum* Sw. seeds in the state of Campeche. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 14(77), 31 – 55. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v14i77.1345>
- Santillán-Fernández, A., López-Frías, J. E., Tadeo-Noble, A. E., Barba-Costeño, H., Velasco-Casarez, L., & Vera-López, J. E. (2024). Zonas potenciales de *Brosimum alicastrum* Sw. y su variabilidad ante escenarios de cambio climático. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 16(87), 48 – 71. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v16i87.1507>
- Santillán-Fernández, A., Santiago-Santes, O. V., Espinosa-Grande, E., Huicab-Pech, Z. G., Larqué-Saavedra, F. A., & Bautista-Ortega, J. (2021b). Propagación sexual y asexual de *Brosimum alicastrum* Swartz en Campeche, México. *LA GRANJA Revista de Ciencias de la Vida*, 34(2), 105 – 116. <https://doi.org/10.17163/lgr.n34.2021.07>
- Vallejos, J., Badilla, Y., Picado, F., & Murillo, O. (2010). Metodología para la selección e incorporación de árboles plus en programas de mejoramiento genético forestal. *Agronomía Costarricense*, 34(1), 105 – 119. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/ac/v34n1/a11v34n1.pdf>
- Venables, W. N., & Smith, D. M. (2023). *An introduction to R. Notes on R: A programming environment for data analysis and graphics. Version 4.3.0.* R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <https://cran.r-project.org/doc/manuals/r-release/R-intro.pdf>
- Xu, P., Zhang, T., Chen, L., Huang, W., & Jiang, K. (2022). Study on the method of matched splice grafting for melon seedlings based on visual image. *Agriculture*, 12(7), 929. <https://doi.org/10.3390/agriculture12070929>
- Yang, L., Perrera, V., Saplaoura, E., Apelt, F., Bahin, M., Kramdi, A., Olas, J., Mueller-Roeber, B., Sokolowska, E., Zhang, W., Li, R., Pitzalis, N., Heinlein, M., Zhang, S., Genovesio, A., Colot, V., & Kragler, F. (2019). m5C methylation guides systemic transport of messenger RNA over graft junctions in plants. *Current Biology*, 29(15), 2465 – 2476. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.06.042>