

ISSN e: 2007-4018

REVISTA CHAPINGO SERIE
CIENCIAS
FORESTALES
Y DEL AMBIENTE



AÑO 31, VOL. XXXI, 2025.

Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, Año 30, Volumen 30, núm. 3, septiembre-diciembre de 2024, es una publicación cuatrimestral editada por la Universidad Autónoma Chapingo, a través de la Coordinación de Revistas Institucionales de la Dirección General de Investigación y Posgrado. Oficina 114, edificio Dr. Efraím Hernández X, carretera México-Texcoco, Chapingo, Texcoco, Estado de México, C.P. 56230, Tel. +52 (595) 952-1569 y +52 (55) 5133-1108, ext.1569, <https://revistas.chapingo.mx/forestales/>, rforest@chapingo.mx. Editora responsable: Ma. Amparo Máxima Borja de la Rosa.

Reserva de Derechos al Uso Exclusivo No.: 04-2011-083011584800-102, e-ISSN: 2007-4018, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor.

Responsable de la última actualización de este número: Coordinación de Revistas Institucionales de la Universidad Autónoma Chapingo, Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez, Oficina 114, edificio Dr. Efraím Hernández X. km 38.5 carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México, fecha de la última modificación, 30 de diciembre de 2024.

Consejo Editorial

Dra. Amparo Borja De La Rosa
Editora Principal

Dr. Diódoro Granados Sánchez
Universidad Autónoma Chapingo. México

Dr. Raúl Salas González
Universidad de Coimbra. Portugal

Dr. Raymundo Dávalos Sotelo
Instituto de Ecología, Jalapa, Ver. México

Dr. Celedonio Aguirre Bravo
Universidad Estatal de Colorado, E.U.

Dr. Santiago Vignote
Universidad Politécnica de Madrid, España.

Dr. Eusebio Cano Carmona
Universidad de Jaén, España.

Dra. Graciela Inés Bolzón De Muñiz
Universidad Federal de Paraná, Brasil.

Dr. Ignacio J. Díaz Maroto Hidalgo
Universidad de Santiago de Compostela, España.

Dr. Fernando González Andrés
Universidad de León, España.

Directorio UACH

Dr. Ángel Garduño García
Rector

M.C. Noe López Martínez
Director General Académico

Dra. Consuelo Silvia Olivia Lobato Calleros
Director General de Investigación y Posgrado

Ing. Jorge Torres Bribiesca
Director General de Administración

Dr. Samuel Pérez Nieto
Director General de Patronato

Mtra. Tania Jessica Pérez Buendía
Dirección General de Difusión Cultural y Servicio

Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez
Coordinador de Revistas Institucionales

Créditos

M. C. María De Jesús Ochoa Rosas
Edición técnica

M.C. Sacnité Y. López Gonzaga
Traducción

M.D. Carlos De La Cruz Ramírez
Diseño Editorial

Dr. Roberto Machuca Velasco
Vocal De Difusión

Fotografía de portada:

Pinus patula de 25 años de edad - Chignahuapan Puebla
Tomada por: M. C. Daisy Barrera Ortega

Index / Índice

Vol. XXXI, 2025

Potencial de captura de carbono en plantaciones de *Retrophyllum rospigliosii* (Pilg.) C. N. Page con fines de restauración en la región Andina colombiana

Camilo E. Ruiz-Erazo, Royer I. Riascos-Acosta, Edilber S. Guerrero-Martínez, Adriana M. Marín-Vélez, Carlos A. Sierra, Jorge A. Ramírez-Correa

Diversidad y actualización del listado de especies de tardígrados limnoterrestres en Quintana Roo, México

Wilbert A. Pérez-Pech, Roberto Guidetti, Abril Anguas-Escalante, Juana I. Crisanto-Rodríguez, Leopoldo Q. Cutz-Pool

Estado de salud de *Ficus microcarpa* L. f. evaluado mediante los indicadores condición de copa y daños al arbolado en Cuernavaca, Morelos

Xochiquetzaly G. Salazar-García, Tomás Martínez-Trinidad, Dionicio Alvarado-Rosales, Luz de L. Saavedra-Romero, Armando Equihua-Martínez

Alternativas de almacenamiento de bellotas de *Quercus durifolia* Seemen

Rosa E. Madrid-Aispuro, José Á. Prieto-Ruíz, Arnulfo Aldrete, Silvia Salcido-Ruíz, José Á. Sigala-Rodríguez

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

Carlos A. Ortigoza-García, Alberto Santillán-Fernández, Alfredo E. Tadeo-Noble, Benigno Rivera-Hernández, Eugenio Carrillo-Ávila, Jaime Bautista-Ortega

Aislamientos nativos de *Metarhizium brunneum* Petch con potencial de biocontrol sobre la chinche negra (*Antiteuchus tripterus* Fabricius) del cacao

Miguel A. Mayo-Hernández, Magdiel Torres-de-la-Cruz, Manuel Pérez-de-la-Cruz, Ángel F. Huamán-Pilco, Aracely de la Cruz-Pérez, Lenin Arias-Rodríguez

La investigación dendrocronológica en México: un análisis bibliométrico

Teodoro Carlón-Allende, Karla A. De La Peña-Guillén, José Villanueva-Díaz, José L. Macías-Vázquez

Carbon sequestration potential in *Retrophyllum rospigliosii* (Pilg.) C. N. Page plantations for restoration purposes in the Colombian Andean region

Potencial de captura de carbono en plantaciones de *Retrophyllum rospigliosii* (Pilg.) C. N. Page con fines de restauración en la región Andina colombiana

Camilo E. Ruiz-Erazo¹; Royer I. Riascos-Acosta¹; Edilber S. Guerrero-Martínez¹; Adriana M. Marín-Vélez²; Carlos A. Sierra³; Jorge A. Ramírez-Correa^{1*}

¹Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias. Calle 5 núm. 4-70, Popayán, Cauca. Colombia.

²Smurfit-Westrock Colombia, Departamento de Investigación Forestal. Calle 15 núm. 18-109, Puerto Isaacs, Yumbo, Valle del Cauca. Colombia.

³Max Planck Institute for Biogeochemistry. Hans-Knöll-Str. 10, 07745, Jena. Germany.

*Corresponding author: j.ramirez@unicauca.edu.co

Abstract

Introduction: Podocarpaceae is the only family of native conifers in the tropical Andes. In Colombia, *Retrophyllum rospigliosii* (Pilg.) C. N. Page is significant due to its wide geographic distribution; however, no biomass and carbon equations exist for this species.

Objective: To estimate the carbon capture potential of mature *R. rospigliosii* plantations established for restoration purposes.

Materials and methods: Thirty trees were selected based on diameter distribution of trees to evaluate stem volume and aboveground biomass, and 12 trees were analyzed to assess belowground biomass and carbon content in tree components (stem, branches, leaves, and roots). The variables – volume, biomass, and carbon – were correlated with diameter at breast height and total height using Husch and Spurr models.

Results and discussion: The adjusted models achieved R^2 values greater than 94 %. The stem provided the highest percentage of biomass, followed by coarse roots, branches, fine roots, and leaves. Carbon content in *R. rospigliosii* components ranged between 41.08 % and 49.97 %. Over a 20-year period, high-density monoculture plantations (1666 trees·ha⁻¹) of *R. rospigliosii* were estimated to produce 316.26 ± 187.26 Mg·ha⁻¹ of biomass and sequester 156.08 ± 92.80 Mg·ha⁻¹ of carbon.

Conclusion: Biomass and carbon sequestration of *R. rospigliosii* in plantations were relatively low compared to individuals in natural forests. The models indicate the low productivity of this species in terms of carbon sequestration.

Keywords: aboveground biomass; belowground biomass; allometric equations; Husch model; Podocarpaceae.

Resumen

Introducción: Las podocarpáceas son la única familia de coníferas nativas en los Andes tropicales. En Colombia, *Retrophyllum rospigliosii* (Pilg.) C. N. Page es importante por su amplia distribución geográfica; sin embargo, no existen ecuaciones de biomasa y carbono para la especie.

Objetivo: Estimar el potencial de captura de carbono de plantaciones maduras de *R. rospigliosii* establecidas con fines de restauración.

Materiales y métodos: Se seleccionaron 30 árboles a partir de su distribución diamétrica para evaluar el volumen del fuste y biomasa aérea, y 12 para evaluar la biomasa subterránea y el contenido de carbono de los componentes del árbol (fuste, ramas, hojas y raíces). Las variables volumen, biomasa y carbono se relacionaron en función del diámetro a la altura del pecho y la altura total usando los modelos de Husch y Spurr.

Resultados y discusión: Los modelos ajustados alcanzaron valores de R^2 mayores de 94 %. El fuste aportó el mayor porcentaje de biomasa, seguido de las raíces gruesas, ramas, raíces finas y hojas. El contenido de carbono en los componentes de *R. rospigliosii* varió entre 41.08 % y 49.97 %. En 20 años, se estima que las plantaciones mono-específicas y de alta densidad (1666 árboles·ha⁻¹) de *R. rospigliosii* registraron 316.26 ± 187.26 Mg·ha⁻¹ de biomasa y 156.08 ± 92.80 Mg·ha⁻¹ de captura de carbono.

Conclusión: La biomasa y captura de carbono de *R. rospigliosii* en plantaciones fueron relativamente bajas en comparación con los individuos en bosques naturales. Los modelos indican una baja productividad de la especie en términos de captura de carbono.

Palabras clave:

biomasa aérea; biomasa subterránea; ecuaciones alométricas; modelo de Husch; podocarpáceas.

Introduction

Most global climate action agreements have given significant attention to forests due to their potential for carbon sequestration and climate change mitigation (Federici et al., 2015; Griscom et al., 2017). One of the most important compartments in carbon fixation in forests is tree biomass, which is quantified through field measurements and the use of remote sensing or geographic information systems. However, beyond the technique used, it is essential to have high-quality biomass equations with a high degree of fit to obtain accurate estimates (Picard et al., 2012).

Typical biomass equations aim to estimate biomass at the tree or stand level based on its allometric relationship with easily measurable variables such as diameter at breast height or total tree height (Kershaw et al., 2017). Currently, there are generalized biomass equations (Chojnacky et al., 2014) or those specific to a particular biome (Alvarez et al., 2012; Chave et al., 2014). However, it has been shown that intraspecific variation affects the accuracy of estimates (Affleck, 2019; Araujo et al., 2023), due to the species-specific allometric relationship between biomass and tree dimensions (Teobaldelli et al., 2009). Therefore, it is recommended to use species-specific biomass equations that allow for high-precision estimates (Temesgen et al., 2015).

There are biomass equations for most commercial forest species, such as pines and eucalypts (Correia et al., 2018; Han & Park, 2020; Hernández-Ramos et al., 2017). Most of these equations are based on generic models commonly used for perennial woody species, such as those by Schumacher, Spurr, Husch, and Meyer, which are selected according to goodness-of-fit statistics (Loetsch et al., 1973). However, biomass equations for native species in tropical forests are scarce (Chave et al., 2014; Liu et al., 2023), especially for localized and uncommon species. This is the case of *Retrophyllum rospigliosii* (Pilg.) C. N. Page, a podocarp native to the tropical Andes, distributed at elevations ranging from 1500 to 3300 m, for which no biomass equations have been reported. The importance of understanding the amount of accumulated biomass lies in identifying its carbon sequestration potential, thereby quantifying one of the environmental services provided by these native forests. This information is critical for their conservation, restoration, and meeting the goals established in national climate change agreements.

Podocarps in Colombia have experienced a decline of nearly 30 % in recent decades due to deforestation and selective harvesting for timber production (Ortega & Muñoz, 2020). As a result, the species is classified as vulnerable on the International Union for Conservation

Introducción

La mayoría de los convenios globales de acción climática han dado gran atención a los bosques por su potencial de captura de carbono y mitigación del cambio climático (Federici et al., 2015; Griscom et al., 2017). Uno de los compartimentos de mayor importancia en la fijación de carbono de los bosques es la biomasa de los árboles, la cual se cuantifica a través de mediciones en campo y con el uso de sensores remotos o de sistemas de información geográfica. No obstante, más allá de la técnica utilizada, se debe contar con ecuaciones de biomasa de calidad y con un nivel alto de ajuste para obtener estimaciones precisas (Picard et al., 2012).

Las ecuaciones de biomasa típicas tienen como objetivo estimar la biomasa a nivel de árbol o rodal, a partir de su relación alométrica con variables de medición fácil como el diámetro a la altura del pecho o la altura total de los árboles (Kershaw et al., 2017). Actualmente, existen ecuaciones de biomasa generalizadas (Chojnacky et al., 2014) o de un bioma en particular (Alvarez et al., 2012; Chave et al., 2014). No obstante, a partir de estas, se ha comprobado que la variación intraespecie afecta la precisión de las estimaciones (Affleck, 2019; Araujo et al., 2023), debido a la especificidad en la relación alométrica entre la biomasa y las dimensiones de los árboles de cada especie (Teobaldelli et al., 2009). Por tanto, es recomendable disponer de ecuaciones de biomasa únicas por especie que permitan estimaciones con un grado alto de precisión (Temesgen et al., 2015).

Existen ecuaciones de biomasa para la mayoría de las especies forestales comerciales como pinos y eucaliptos (Correia et al., 2018; Han & Park, 2020; Hernández-Ramos et al., 2017). La mayoría se basan en modelos genéricos utilizados frecuentemente en especies leñosas perennes; por ejemplo, Schumacher, Spurr, Husch y Meyer, los cuales se seleccionan según estadísticas de bondad de ajuste (Loetsch et al., 1973). Sin embargo, las ecuaciones de biomasa para especies nativas de los bosques tropicales son escasas (Chave et al., 2014; Liu et al., 2023), en especial para especies localizadas y poco comunes. Es el caso de *Retrophyllum rospigliosii* (Pilg.) C. N. Page, una podocarpácea nativa de los Andes tropicales que se distribuye entre los 1500 hasta 3300 m, para la cual no existen ecuaciones de biomasa reportadas. La importancia de conocer la cantidad de biomasa acumulada radica en identificar su potencial de captura de carbono y con ello cuantificar uno de los servicios ambientales que proveen estos bosques nativos de cara a su conservación, restauración y cumplimiento de las metas establecidas en los acuerdos nacionales sobre cambio climático.

Las podocarpáceas en Colombia han presentado un declive de casi 30 % en las últimas décadas debido a procesos de deforestación y cosecha selectiva para la producción de

of Nature's (IUCN) Red List of Threatened Species (Gardner & Thomas, 2013). The threatened status of *R. rospigliosii* underscores the need to establish restoration and reforestation programs to ensure its survival. To date, approximately 25 ha of *R. rospigliosii* have been established in Colombia, particularly in the southern regions, with plantings dating back to the late 1990s. In Andean forests, *R. rospigliosii* is a species of high ecological value due to its ability to colonize nutrient-poor soils, facilitating the establishment of various Andean species under its canopy. It also provides shelter for wildlife (Marín, 1998). Furthermore, this species produces timber that is ideal for construction and artisanal woodworking, making it a valuable resource for local communities (Marín, 1998).

In this context, the present study aimed to estimate the carbon sequestration potential of mature *R. rospigliosii* plantations established for restoration purposes in the Colombian Andes. To achieve this goal, biomass production was evaluated, and allometric equations were developed to determine its ecological productivity and contribution to carbon sequestration.

Materials and Methods

Study area

The study was conducted in an experimental *R. rospigliosii* plantation established in 1999 by the Federación Nacional de Cafeteros de Colombia and Smurfit-Westrock Colombia. The plantation is located in the western region of the Cauca department (El Tambo municipality), Colombia, between coordinates 2° 28' 0"-2° 29' 40" N and 76° 48' 30"-76° 50' 0" W (Figure 1), at an elevation of about 1775 m. According to data from the local weather station, the average annual temperature is 19.4 °C, and average annual precipitation 2298 mm, with a bimodal distribution pattern and lower rainfall between June and September (Ramírez et al., 2021). The area is classified as premontane wet forest (bh-PM) according to Holdridge's life zone classification system (1982).

The study was established using seeds collected from a natural forest in the southwestern region of the Antioquia department (Támesis municipality, Colombia) on Finca La Playa. The seedlings were produced in a nursery and transplanted into the field when they reached a height of 30 cm.

The experimental plantation covers 8 ha and was initially established at a density of 1666 trees·ha⁻¹. This density has gradually decreased due to mortality and selective removal of individuals, leaving an approximate current density of 300 trees·ha⁻¹.

madera (Ortega & Muñoz, 2020). Por lo anterior, la especie se encuentra catalogada como vulnerable según la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y Recursos Naturales (IUCN, por sus siglas en inglés; Gardner & Thomas, 2013). La condición de amenaza en la que se encuentra *R. rospigliosii* genera la necesidad de establecer programas de restauración y reforestación con el fin de asegurar su permanencia; hasta el momento se han establecido en Colombia, especialmente al sur del país, cerca de 25 ha de *R. rospigliosii*, las cuales fueron plantadas a finales de los años 90. En los bosques andinos, *R. rospigliosii* es una especie de alto valor ecológico, debido a su capacidad de colonizar terrenos con baja disponibilidad de nutrientes y permitir así el establecimiento de diversas especies andinas bajo el dosel, además de que genera refugio para la fauna silvestre (Marín, 1998). Asimismo, esta especie produce madera ideal para la construcción y la carpintería artesanal, por lo que las comunidades la utilizan con fines productivos (Marín, 1998).

En tal contexto, el presente estudio tuvo como objetivo estimar el potencial de captura de carbono de plantaciones maduras de *R. rospigliosii* establecidas con fines de restauración en la región Andina colombiana. En cumplimiento de este objetivo se evaluó la producción de biomasa y se generaron ecuaciones alométricas para determinar su productividad ecológica y su contribución en términos de captura de carbono.

Materiales y métodos

Área de estudio

El estudio se hizo en una plantación experimental de *R. rospigliosii* establecida en 1999 por la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia y Smurfit-Westrock Colombia. La plantación está ubicada en el occidente del departamento del Cauca (municipio de El Tambo), Colombia, entre las coordenadas 2° 28' 0"-2° 29' 40" N y 76° 48' 30"-76° 50' 0" O (Figura 1), a una elevación aproximada de 1775 m. Según los datos de la estación meteorológica del lugar, la temperatura promedio anual es 19.4 °C y la precipitación media anual es 2298 mm con régimen de distribución bimodal y menor precipitación entre los meses de junio y septiembre (Ramírez et al., 2021). La zona corresponde a bosque húmedo premontano (bh-PM), según la clasificación de zonas de vida de Holdridge (1982).

El estudio se estableció con semillas recolectadas de un bosque natural al suroeste del departamento de Antioquia (municipio de Támesis, Colombia) en la finca La Playa. Las plántulas se produjeron en vivero y se sembraron en campo cuando alcanzaron 30 cm de altura. La plantación experimental tiene 8 ha y se estableció a una densidad de

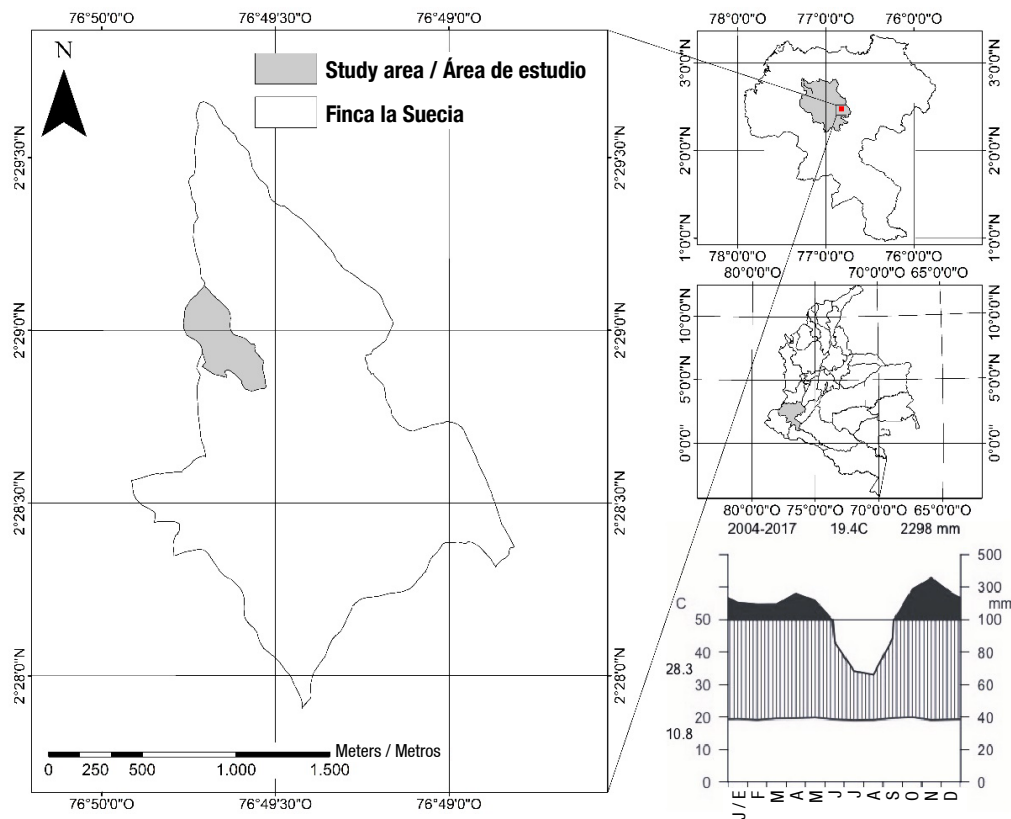


Figure 1. Location of the experimental *Retrophyllum rospigliosii* plantation in the Cauca department, Colombia.

Figura 1. Localización de la plantación experimental de *Retrophyllum rospigliosii* en el departamento del Cauca, Colombia.

Field methods

Initially, a plantation inventory was conducted to evaluate its condition and generate diameter class distributions. The diameter at breast height (DBH) of each tree was measured using a diameter tape, and total height was measured with a Vertex IV hypsometer. Diameter distributions were established, classifying the trees into six classes based on diameter size, ranging from the smallest (0.03 m) to the largest (0.42 m). From each diameter class, five individuals were selected for aboveground biomass quantification (30 in total) and two individuals for belowground biomass quantification (12 in total). This sampling method ensured the inclusion of individuals from all size categories present in the stand.

Aboveground biomass quantification

The trees selected for aboveground biomass quantification were cut down in 2019. Branches and leaves were separated from the main stem. In the field, the fresh biomass of the stem, branches, and leaves were weighed, and samples from each component were collected for moisture content and density

1666 árboles·ha⁻¹, la cual se ha reducido gradualmente por mortalidad y extracción de individuos a una densidad aproximada de 300 árboles·ha⁻¹.

Métodos en campo

Inicialmente se hizo un inventario de la plantación para determinar su estado y generar distribuciones por clases diamétricas. En cada árbol se midió el diámetro a la altura del pecho (DAP) con cinta diamétrica y la altura total con hipsómetro Vertex IV. Se establecieron distribuciones diamétricas en las que se clasificaron los árboles en seis clases según el tamaño de su diámetro, desde los más pequeños (0.03 m) hasta los más grandes (0.42 m). De cada clase diamétrica se seleccionaron cinco individuos para la cuantificación de la biomasa aérea (30 en total) y dos individuos para la cuantificación la biomasa subterránea (12 en total); de esta forma, se garantizó el muestreo de individuos de todos los tamaños que conforman el rodal.

Cuantificación de la biomasa aérea

Los árboles seleccionados para la cuantificación de la biomasa aérea se derribaron en el año 2019. Del fuste

measurements. The main stem of each tree was divided into ten equal-length sections, and the diameter at both ends of each section was measured to calculate the volume (Picard et al., 2012).

Belowground biomass quantification

A 2 x 3 m area was marked around each tree, according to the planting density of the plantation. Fine roots were then sampled every 30 cm from the center of the stump to the edge of the sampling area (1.5 m) using cylinders with a diameter of 10 cm and a depth of 30 cm. Finally, the root system of each tree was removed to evaluate coarse roots. The roots were cleaned to remove impurities and weighed in the field. Samples of both fine and coarse roots were taken to determine moisture content in the laboratory.

Volume, biomass, and carbon content estimation

In the laboratory, the density of each *R. rospigliosii* tissue was measured. The volume of each sample was determined using the water displacement method. Then, the samples of the stem, branches, leaves, and roots were placed in a drying oven to obtain their dry weight and assess moisture content. The samples were dried at 70 °C until constant weight and were weighed immediately to prevent any increase in weight due to air moisture. Moisture content of each component (Ch_i) was determined based on the dry weight of the sample of component i (ms_i) and the fresh weight of the sample of component i (mf_i) using the equation: $Ch_i = (ms_i / mf_i)$.

The volume of the stem sections was calculated using Smalian's equation:

$$V = \frac{\pi}{8} L (d_{in}^2 + d_{sn}^2)$$

where,

L = length (m) of the stem section

d_{in} = lower diameter (m) of stem section n

d_{sn} = upper diameter (m) of stem section n .

The biomass of each component (B_i) was calculated using the following equation:

$$B_i = Pf_i * Ch_i$$

where,

Pf_i = fresh weight (kg) of component i

Ch_i = moisture content (kg) of component i .

When the component was divided into parts, the dry weight was obtained by adding the dry weight of all the parts of component i .

se separaron las ramas y las hojas. En campo se pesó la biomasa fresca del fuste, ramas y hojas y se tomaron muestras de cada componente para la cuantificación de humedad y densidad. El fuste principal de cada árbol se dividió en decimos de igual longitud; de cada décimo se tomaron medidas del diámetro en cada extremo de la sección para el cálculo del volumen (Picard et al., 2012).

Cuantificación de la biomasa subterránea

Se hizo una delimitación de 2 x 3 m alrededor de cada árbol según la densidad de siembra de la plantación. Posteriormente, las raíces finas se muestrearon cada 30 cm desde el centro del tocón hasta el borde del área de muestreo (1.5 m) con ayuda de cilindros de 10 cm de diámetro y 30 cm de profundidad. Finalmente, el sistema radicular de cada árbol se desenterró para la evaluación de las raíces gruesas. Las raíces se limpiaron para eliminar impurezas y se pesaron en campo. Se tomaron muestras de raíces finas y gruesas con el fin de determinar su contenido de humedad en el laboratorio.

Determinación del volumen, biomasa y carbono

En el laboratorio se determinó la densidad de cada tejido de *R. rospigliosii*. Para ello, se midió el volumen de cada muestra a través del método de desplazamiento de agua. Posteriormente, las muestras de fuste, ramas, hojas y raíces se llevaron al horno de secado para obtener el peso seco y así determinar contenido de humedad. Las muestras se secaron a 70 °C hasta alcanzar peso constante y se pesaron inmediatamente para evitar el incremento de peso debido a la humedad del aire. El contenido de humedad de cada componente (Ch_i) se determinó a partir del peso seco de la muestra del componente i (ms_i) y el peso fresco de la muestra del componente i (mf_i) mediante la ecuación $Ch_i = (ms_i / mf_i)$.

El volumen de las trozas se obtuvo mediante la ecuación de Smalian:

$$V = \frac{\pi}{8} L (d_{in}^2 + d_{sn}^2)$$

donde,

L = longitud (m) de la troza

d_{in} = diámetro inferior (m) de la troza n

d_{sn} = diámetro superior (m) de la troza n .

La biomasa de cada componente (B_i) se calculó con la siguiente ecuación:

$$B_i = Pf_i * Ch_i$$

donde,

Pf_i = peso fresco (kg) del componente i

Ch_i = contenido de humedad (kg) del componente i .

The aboveground biomass expansion factors (*BEF*) were estimated based on the dry biomass (*B*) of the stem, branches, and leaves. The factors were calculated using the equation $BEF = [(B\ stem + B\ leaf + B\ branch) / B\ stem]$.

Finally, to determine the elemental carbon content of the plant tissues of *R. rospigliosii*, 84 samples were taken from the 12 trees in which both aboveground and belowground biomass were quantified. The elemental carbon analyses were conducted at the Max Planck Institute for Biogeochemistry in Jena, Germany. Carbon content was measured using a carbon-nitrogen analyzer (Vario Max Cube, Elementar GmbH, Germany), and the results were expressed as percentage.

Data processing

Aboveground and belowground biomass were treated separately and then combined to estimate total biomass. Two total biomass models were fitted; the first used the belowground biomass values from the 12 sampled trees, while the second used the estimated belowground biomass values from the 30 sampled trees based on the model obtained for this component. Data normality was assessed using the Shapiro-Wilk test, and then the variation in volume, biomass, and carbon was related to the DBH and height by fitting linear and nonlinear models from Berkhout, Kopezky, Husch, and Spurr, both in their linear and nonlinear forms as proposed by Loetsch et al. (1973) (Table 1). The selected regression models were those with the highest likelihood, meaning those with the lowest AIC (Akaike Information Criterion) and the smallest residual standard error. Additionally, the coefficient of determination (*R*²) and significance at 95 % confidence were used for model selection. Finally, the normality of residuals was evaluated with the Shapiro-Wilk test, and homoscedasticity was assessed using the Breusch-Pagan test. All analyses were conducted using R software version 4.3.2 (R Core Team, 2023).

Cuando el componente estaba dividido por partes, el peso seco se obtuvo sumando el peso seco de todas las partes del componente *i*.

Los factores de expansión en biomasa aérea (*FEB*) se estimaron a partir de la biomasa seca (*B*) del fuste, ramas y hojas. Los factores se calcularon con la ecuación $FEB = [(B\ fuste + B\ hoja + B\ rama) / B\ fuste]$.

Finalmente, para determinar el contenido de carbono elemental de los tejidos vegetales de *R. rospigliosii* se tomaron 84 muestras provenientes de los 12 árboles en los cuales se cuantificó biomasa aérea y subterránea. Los análisis de carbono elemental se hicieron en el Instituto Max Planck de biogeoquímica en Jena, Alemania. El carbono se cuantificó en un analizador de carbono-nitrógeno (Vario Max Cube, Elementar GmbH, Alemania) y el resultado se presentó en porcentaje.

Procesamiento de datos

La biomasa aérea y subterránea se trató independiente y, posteriormente, conjuntamente para estimar la biomasa total. Se ajustaron dos modelos de biomasa total; en el primero se usaron los valores de biomasa subterránea de los 12 árboles muestreados, y en el segundo, los valores estimados de la biomasa subterránea de los 30 árboles muestreados con el modelo obtenido para este componente. La normalidad de los datos se evaluó mediante una prueba de Shapiro-Wilk y posteriormente la variación del volumen, la biomasa y el carbono se relacionaron respecto al DAP y la altura, mediante el ajuste a los modelos lineales y no lineales de Berkhout, Kopezky, Husch, y Spurr en su forma lineal y no-lineal según las ecuaciones propuestas por Loetsch et al. (1973) (Cuadro 1). Los modelos de regresión seleccionados fueron los que tuvieron mayor verosimilitud; es decir, los que presentaron menor AIC (criterio de información de Akaike) y error estándar residual más bajo. Adicionalmente se usó, con fines de selección, el

Table 1. Regression models to establish allometric equations for *Retrophyllum rospigliosii* (according to Loetsch et al., 1973).
Cuadro 1. Modelos de regresión para establecer las ecuaciones alométricas de *Retrophyllum rospigliosii* (según Loetsch et al., 1973).

Name / Nombre	Model / Modelo	
	Linear	Lineal
Berkhout	$y = a + b\ DBH$	$y = a + b\ DAP$
Kopezky	$Y = a + b\ (DBH^2)$	$Y = a + b\ (DAP^2)$
Spurr	$y = a + b\ (DBH^2H)$	$y = a + b\ (DAP^2H)$
	Non-linear	No lineal
Husch (potential)	$y = aDBH^b$	$y = aDAP^b$
Spurr	$y = a\ (DBH^2H)^b$	$y = a\ (DAP^2H)^b$

In the models *y* can represent volume (*V*, m³), biomass (*B*, Mg), or carbon (*C*, Mg). DBH corresponds to diameter at breast height (1.3 m) and *H* to total height (m). The letters *a* and *b* correspond to the model parameters.
En los modelos *y* puede ser volumen (*V*, m³), biomasa (*B*, Mg) o carbono (*C*, Mg). DAP corresponde al diámetro a la altura del pecho (1.3 m) y *H* a la altura total (m). Las letras *a* y *b* corresponden a parámetros del modelo.

Results

Diameter class distribution

According to the initial sampling, trees had an average DBH of 0.22 ± 0.04 m and a height of 10.97 ± 1.25 m (Table 2). The individuals were divided into six diameter classes ranging from 3 to 42 cm, with a width of 6.67 cm, showing a typical unimodal distribution characteristic of forest plantations.

Aboveground and belowground biomass

As shown in Table 2, the average volume of *R. rospigliosii* trees was 0.27 m^3 with a form factor of 0.52. The basic wood density was $0.36 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. On average, 0.14 Mg of aboveground biomass and 0.05 Mg of belowground biomass were obtained per tree. The greatest variability in biomass was recorded in the stem and coarse roots, while the lowest variability was observed in the biomass of leaves.

Allometric models

The selected models showed adjustments exceeding 94 %, higher likelihood, and lower standard error compared to the other evaluated models (Table 3; Figure 2). Additionally, the residuals of the selected models were normal, generally randomly distributed, and never exceeded 0.06 Mg (Appendices 1 and 2). The Hush model provided the best fit for estimating tree volume, biomass (aboveground and belowground), and carbon sequestration. For total biomass, the best-fitting model was Spurr's nonlinear form, using belowground

coeficiente de determinación (R^2) y significancia del 95 %. Finalmente, la normalidad de residuos se evaluó con la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad con la prueba de Breusch Pagan. En todos los análisis se empleó el programa R en su versión 4.3.2 (R Core Team, 2023).

Resultados

Distribución de clases diamétricas

De acuerdo con el muestreo inicial, los individuos presentaron un promedio de 0.22 ± 0.04 m de DAP y 10.97 ± 1.25 m de altura (Cuadro 2). Los individuos se dividieron en seis clases diamétricas entre los 3 y 42 cm de diámetro con amplitud de 6.67 cm, donde se evidenció una distribución unimodal típica de plantaciones forestales.

Biomasa aérea y subterránea

Acorde con el Cuadro 2, el volumen promedio de los árboles de *R. rospigliosii* fue 0.27 m^3 con un factor de forma de 0.52. La densidad básica de la madera fue $0.36 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. En promedio, se obtuvieron 0.14 Mg de biomasa aérea y 0.05 Mg de biomasa subterránea por árbol. La mayor variabilidad de la biomasa se registró en el fuste y en las raíces gruesas, mientras que la menor variabilidad se exhibió en la biomasa de las hojas.

Modelos alométricos

Los modelos seleccionados presentaron ajustes superiores de 94 %, mayor verosimilitud y menor error estándar respecto al resto de modelos evaluados

Table 2. Variables analyzed for the biomass quantification of *Retrophyllum rospigliosii*.

Cuadro 2. Variables analizadas para la cuantificación de biomasa de *Retrophyllum rospigliosii*.

Variables	Number of trees / Número de árboles	Minimum / Mínimo	Maximum / Máximo	Average per tree / Promedio por árbol
DBH (m) / DAP (m)	30	0.03	0.42	0.22 ± 0.04
Height (m) / Altura (m)	30	3.90	15.80	10.97 ± 1.25
Stem volume (m^3) / Volumen del fuste (m^3)	30	0.00	0.81	0.27 ± 0.09
Form factor / Factor de forma	30	0.38	0.78	0.52 ± 0.03
Density ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) / Densidad ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	30	0.32	0.40	0.36 ± 0.01
Stem biomass (Mg) / Biomasa fuste (Mg)	30	0.00	0.27	0.09 ± 0.03
Leaf biomass (Mg) / Biomasa hoja (Mg)	30	0.00	0.03	0.01 ± 0.00
Branches biomass (Mg) / Biomasa ramas (Mg)	30	0.00	0.18	0.04 ± 0.02
Coarse root biomass (Mg) / Biomasa raíz gruesa (Mg)	12	0.00	0.11	0.04 ± 0.02
Fine root biomass (Mg) / Biomasa raíz fina (Mg)	12	0.00	0.02	0.01 ± 0.00
Aboveground biomass (Mg) / Biomasa aérea (Mg)	30	0.00	0.48	0.14 ± 0.05
Belowground biomass (Mg) / Biomasa subterránea (Mg)	12	0.00	0.12	0.05 ± 0.02
Total biomass (Mg) / Biomasa total (Mg)	12	0.00	0.60	0.20 ± 0.11

DBH: Diameter at breast height (1.3 m). $\pm$ standard error of the mean.

DAP: diámetro a la altura del pecho (1.3 m). $\pm$ error estándar de la media.

Table 3. Summary of selected allometric models for estimating volume, biomass, and carbon of *Retrophyllum rospigliosii*.
Cuadro 3. Resumen de los modelos alométricos seleccionados para la estimación del volumen, biomasa y carbono de *Retrophyllum rospigliosii*.

Model / Modelo			Estimated / Estimado		Standard error / Error estándar	T value / Valor t	T probability / Prob. t	N	AIC	Adjusted R ² (%) / R ² ajustado (%)	Residual standard error / Error estándar residual
Volume (m ³) / Volumen (m ³)	Husch	$V = aDBH^b$	a	5.10	0.35	14.38	< 0.001	29	-125.24	98.86	0.03
			b	2.07	0.06	32.83	< 0.001				
Aboveground biomass (Mg) / Biomasa aérea (Mg)	Husch	$B = aDBH^b$	a	2.84	0.30	9.34	< 0.001	30	-144.40	97.19	0.02
			b	2.07	0.10	22.00	< 0.001				
Belowground biomass (Mg) / Biomasa subterránea (Mg)	Husch	$B = aDBH^b$	a	0.36	0.07	5.49	< 0.001	11	-67.97	97.36	0.01
			b	1.32	0.15	8.62	< 0.001				
Total biomass a (Mg) / Biomasa total a (Mg)	Spurr	$B = a(DBH^2H)^b$	a	0.24	0.00	53.14	< 0.001	29	-143.49	99.60	0.02
			b	0.81	0.03	29.46	< 0.001				
Total biomass b (Mg) / Biomasa total b (Mg)	Spurr	$B = a(DBH^2H)^b$	a	0.25	0.01	21.62	< 0.001	12	-42.72	98.50	0.03
			b	0.82	0.06	13.87	< 0.001				
Aboveground carbon (Mg) / Carbono aéreo (Mg)	Husch	$C_a = aDBH^b$	a	1.80	0.24	7.54	< 0.001	12	-75.67	98.46	0.01
			b	2.34	0.13	18.57	< 0.001				
Belowground carbon (Mg) / Carbono subterráneo (Mg)	Husch	$C_s = aDBH^b$	a	0.17	0.03	6.26	< 0.001	12	-94.71	94.40	0.00
			b	1.31	0.13	9.81	< 0.001				
Total carbon (Mg) / Carbono total (Mg)	Husch	$C_T = aDBH^b$	a	1.72	0.20	8.51	< 0.001	12	-70.96	98.48	0.01
			b	2.06	0.11	18.95	< 0.001				

DBH: diameter at breast height (1.3 m), H: height (m), n: number of trees, AIC: Akaike Information Criterion.
DAP: diámetro a la altura del pecho (1.3 m), H: altura (m), n: número de árboles, AIC: criterio de información de Akaike.

biomass estimates from all sampled trees. Finally, for fitting the models to estimate volume, belowground biomass, and total biomass (a), data from one individual was eliminated (N = 11 and N = 29) since was very far from the regression curve, probably because it was the tree selected with the smallest diameter and height.

The model that best fitted the biomass of the stem, branches, leaves, coarse roots, and fine roots was the Husch model (Table 4; Figure 3). It was observed that the aboveground components achieved a better fit (>80 %) compared to the belowground components (ranging between 56 % and 77 %).

Biomass expansion factor

The average BEF was 1.50, with a minimum value of 1.16 and a maximum of 1.90 (Table 5). In general, the average values increased as the diameter class increased.

(Cuadro 3; Figura 2). Adicionalmente, los residuos de los modelos seleccionados son normales, se distribuyeron generalmente en forma aleatoria y nunca superaron más de 0.06 Mg (Apéndices 1 y 2). En general, el modelo de Husch fue el que mejor se ajustó para la estimación del volumen, biomasa (aérea y subterránea) y captura de carbono de los árboles. En el caso de la biomasa total, el modelo que mejor se ajustó fue el de Spurr en su forma no lineal y usando las estimaciones de biomasa subterránea de todos los árboles muestreados. Finalmente, para el ajuste de los modelos de la estimación del volumen, biomasa subterránea y biomasa total (a) se eliminó el dato de un individuo (N = 11 y N = 29) muy alejado de la curva de regresión, probablemente por ser el árbol seleccionado con el menor diámetro y altura.

El modelo que mejor se ajustó a la biomasa del fuste, ramas, hojas, raíces gruesas y raíces finas fue el de Husch (Cuadro 4; Figura 3). Se evidenció que los

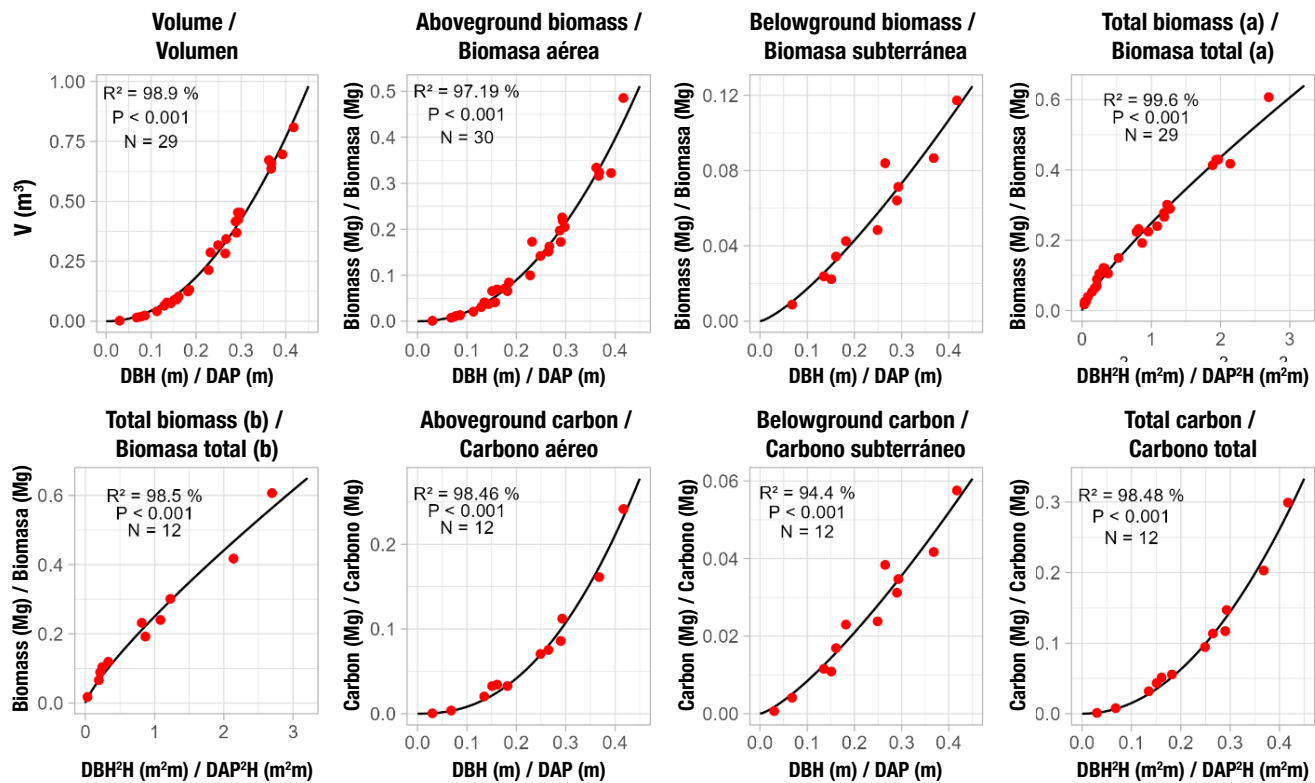


Figure 2. Models fitted for the estimation of volume, biomass, and carbon of *Retrophyllum rospigliosii*. DBH: Diameter at breast height, H: Height.

Figura 2. Modelos ajustados para la estimación del volumen, biomasa y carbono de *Retrophyllum rospigliosii*. DAP: diámetro a la altura del pecho, H: altura.

Table 4. Summary of statistics according to the Husch model for estimating the biomass (B) of each component (Mg) of *Retrophyllum rospigliosii*.

Cuadro 4. Resumen de los estadísticos según el modelo de Husch para estimar la biomasa (B) de cada componente (Mg) de *Retrophyllum rospigliosii*.

				Standard error/ Error estándar	T value/ Valor t	T probability/ Prob. t	n	AIC	Adjusted R² (%)/ R² ajustado (%)	Residual standard error/ Error estándar residual
Model/ Modelo		Estimated/ Estimado								
Stem/ Fuste	$B = aDBH^b$	a	1.38	0.14	9.71	< 0.001	30	-170.40	96.94	0.01
		b	1.91	0.09	20.90	< 0.001				
Branches/ Ramas	$B = aDBH^b$	a	2.12	0.52	4.07	< 0.001	30	-177.91	97.25	0.01
		b	3.00	0.24	12.64	< 0.001				
Leaves/ Hojas	$B = aDBH^b$	a	0.11	0.03	4.20	< 0.001	29	-242.65	80.89	0.00
		b	1.69	0.21	8.20	< 0.001				
Coarse roots / Raíces gruesas	$B = aDBH^b$	a	0.27	0.09	3.00	< 0.001	12	-63.46	77.09	0.01
		b	1.23	0.28	4.48	< 0.001				
Fine roots/ Raíces finas	$B = aDBH^b$	a	0.04	0.02	2.26	< 0.001	12	-98.62	56.26	0.00
		b	1.03	0.35	2.94	< 0.001				

DBH: diameter at breast height (1.3 m), n: number of trees, AIC: Akaike Information Criterion.

DAP: diámetro a la altura del pecho (1.3 m), n: número de árboles, AIC: criterio de información de Akaike.

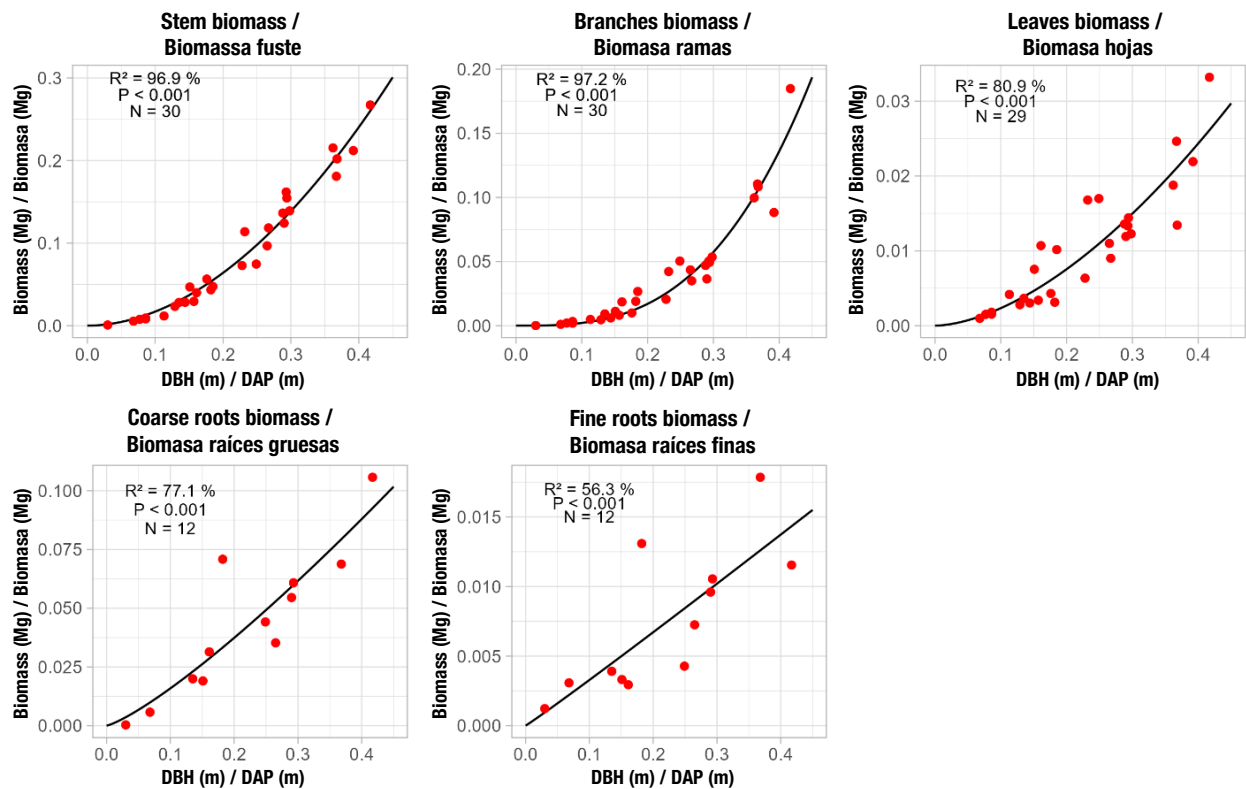


Figure 3. Models fitted to estimate the biomass of each component of *Retrophyllum rospigliosii*. DBH: Diameter at breast height. Figura 3. Modelos ajustados para estimar la biomasa de cada componente de *Retrophyllum rospigliosii*. DAP: diámetro a la altura del pecho.

Table 5. Biomass expansion factor (BEF) for aboveground biomass of *Retrophyllum rospigliosii* trees per diameter class. Cuadro 5. Factor de expansión de biomasa aérea (FEB) para árboles de *Retrophyllum rospigliosii* por clase diamétrica.

BEF/FEB	Class I/Clase I 2.0 - 8.7	Class II/Clase II 8.7 - 15.3	Class III/Clase III 15.3 - 22.0	Class IV/Clase IV 22.0 - 28.7	Class V/Clase V 28.7 - 35.3	Class VI/Clase VI 35.3 - 42.0
Average (cm)/ Promedio (cm)	1.40 ± 0.17	1.45 ± 0.19	1.54 ± 0.22	1.53 ± 0.22	1.42 ± 0.04	1.65 ± 0.13
Range (cm)/ Rango (cm)	1.16-1.62	1.32-1.77	1.25-1.78	1.37-1.90	1.39-1.47	1.52-1.82

± standard error of the mean.
± error estándar de la media.

Biomass per tree section

The tree section contributing the most to total biomass was the stem, with 46.65 %, followed by coarse roots at 22.67 %, branches at 20.12 %, fine roots at 5.36 %, and leaves at 5.2 % (Table 6).

Carbon per tree section

The carbon content was similar among sections (around 49 %), except for fine roots, which had 41.08 % (Figure 4). On average, each tree stores 0.09 ± 0.06 Mg C. Therefore, it is estimated that a plantation of *R. rospigliosii* with 1666 trees·ha⁻¹ stores a total of 156.09 ± 92.80 Mg C·ha⁻¹ (Figure 4).

componentes de la sección aérea tuvieron mayor ajuste (>80 %) que los componentes de la sección subterránea (entre 56 y 77 %).

Factor de expansión de biomasa

El FEB promedio fue 1.50 con valor mínimo de 1.16 y máximo de 1.90 (Cuadro 5). En general, los valores promedio aumentaron a medida que la clase diamétrica incrementó.

Biomasa por sección del árbol

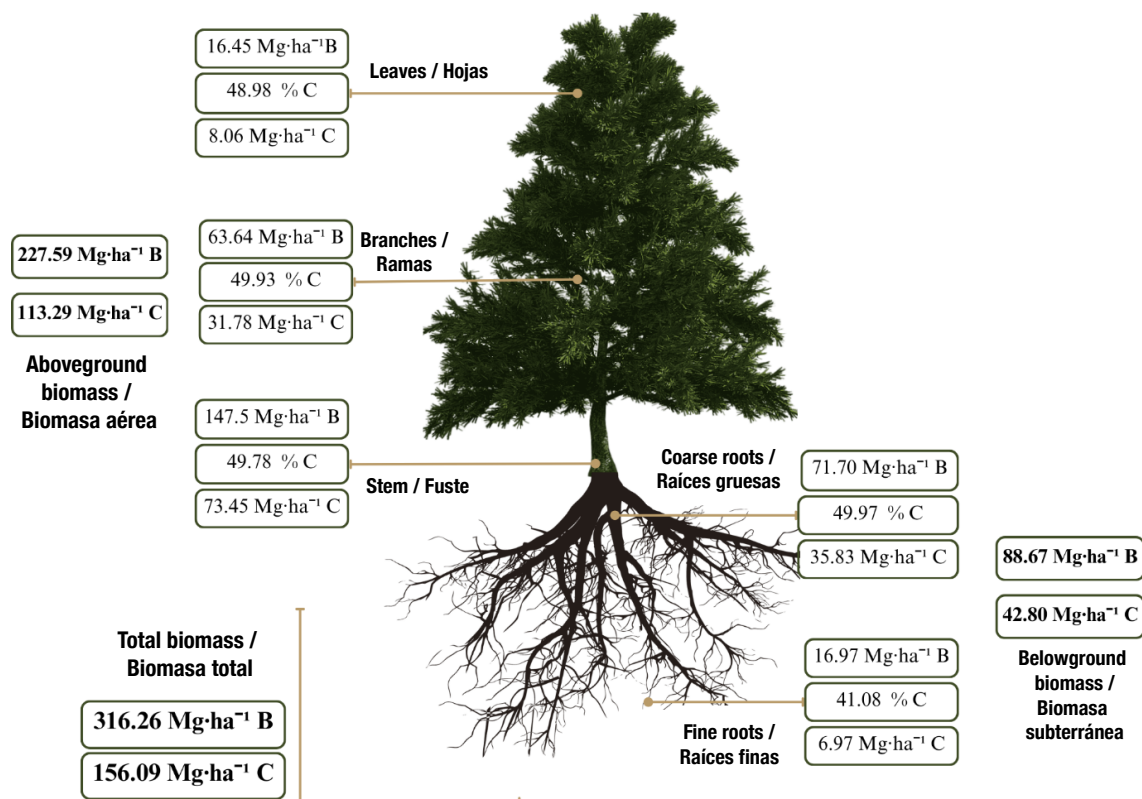
La sección del árbol que más aportó a la biomasa total fue el fuste con 46.65 %, seguido por las raíces gruesas

Table 6. Biomass of each section of *Retrophyllum rospigliosii* tree.**Cuadro 6. Biomasa por sección del árbol de *Retrophyllum rospigliosii*.**

Biomass / Biomasa	Stem / Fuste	Leaves / Hojas	Branches / Ramas	Coarse roots / Raíz gruesa	Fine roots / Raíz fina
Aboveground (%) / Aérea (%)	67.59 ± 7.80	8.74 ± 3.88	23.67 ± 6.93	-	-
Belowground (%) / Subterránea (%)	-	-	-	81.07 ± 12.42	18.93 ± 12.42
Total (%)	46.65 ± 8.37	5.20 ± 2.06	20.12 ± 6.76	22.67 ± 9.22	5.36 ± 8.69

Average value ± standard error.

Valor promedio ± error estándar.

**Figure 4. Biomass and carbon Content per tree section of *Retrophyllum rospigliosii*.****Figura 4. Contenido de biomasa y carbono por sección del árbol de *Retrophyllum rospigliosii*.**

Discussion

Based on destructive sampling, the average volume per tree of *R. rospigliosii* was recorded as 0.27 m³, with a form factor of 0.50 and a wood basic density of 0.36 g·cm⁻³. According to these results, the shape of the trees can be classified as the paraboloid dendrometric type (Kershaw et al., 2017). A study of a forest dominated by *R. rospigliosii* and *Prumnopitys harmsiana* (Pilg.) Laub. in Ecuador reported a volume of 510 m³·ha⁻¹, much higher than the estimate for the study area (300 m³·ha⁻¹) (Yaguana et al., 2012). Regarding wood density, it can

con 22.67 %, las ramas con 20.12 %, raíces finas con 5.36 % y por último las hojas con 5.2 % (Cuadro 6).

Carbono por sección del árbol

El contenido de carbono fue similar entre las secciones (alrededor del 49 %), con excepción de las raíces finas que tuvieron 41.08 % (Figura 4). Se estima que, en promedio, cada árbol almacena 0.09 ± 0.06 Mg C. Así, se estima que una plantación de *R. rospigliosii* con 1 666 árboles·ha⁻¹ almacena en total 156.09 ± 92.80 Mg C·ha⁻¹ (Figura 4).

be classified as soft and light, coinciding with the basic density ($0.34 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) of the same species reported by Portillo et al. (2019). However, these density values are much lower than those presented by Baker et al. (2004), who measured $0.57 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ in wood from natural forests. A similar trend was reported for 19 species planted for restoration purposes in tropical areas of Ghana, where the wood density of the species was lower compared to individuals in forests (Yeboah et al., 2014). This reduction is because individuals experience greater intraspecific competition in plantations than under natural conditions (Nguyen et al., 2014). The reduction in basic wood density of plantation species is also evidence of a possible reduction in the rate of carbon sequestration (Yeboah et al., 2014), an aspect that should be considered in the management of plantations for restoration purposes.

Regarding the biomass per *R. rospigliosii* tree, average values of 0.14 Mg of aboveground biomass and 0.05 Mg of belowground biomass were found. In all individuals of the plantation, aboveground biomass was greater than belowground biomass. However, the belowground component plays an important role, as this compartment contributes the most to the total biomass after the stem, as described by Rodríguez et al. (2019) in *Pinus patula* Schltdl. & Cham. trees.

The Husch model provided the best fit for estimating aboveground, belowground, and total carbon, as well as for estimating aboveground and belowground biomass of *R. rospigliosii*, while the nonlinear Spurr model was a better fit for estimating total biomass. It is important to emphasize that, overall, all models showed optimal fits to the dataset ($R^2 > 94 \%$). The Husch and Spurr models have been widely used in forestry estimation due to their good fit and ability to generate accurate predictions (Kiviste et al., 2002).

In the present study, the biomass of each component of *R. rospigliosii* was estimated using the Husch model. A higher fit was observed for the models of the aboveground tree components ($R^2 > 80 \%$), while the estimation of coarse root biomass ($R^2 = 77 \%$) and fine root biomass ($R^2 = 56 \%$) showed lower fits. These results are consistent with reports on biomass and carbon estimation in other conifer species. For instance, in *Cupressus lusitanica* Mill. in Costa Rica, Fonseca-González et al. (2023) reported a 97 % fit for total biomass using the Husch model. In Mexico, Carrillo et al. (2014) used the Husch model to estimate total carbon in *Pinus montezumae* Lamb. ex Gordon & Glend, achieving fits greater than 98 %, and later obtained a 98 % fit when estimating the aboveground biomass of *Pinus hartwegii* Lindl. (Carrillo et al., 2016). Similarly, Rodríguez et al. (2019) estimated the root biomass of 90 *Pinus patula* trees with a 92 % fit and total biomass with a 97 % fit. Other plantation broadleaf species, such as *Tectona*

Discusión

Mediante el muestreo destructivo, en promedio por árbol de *R. rospigliosii*, se registró volumen de 0.27 m^3 , factor de forma de 0.50 y densidad básica de la madera de $0.36 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. A partir de estos resultados se puede clasificar la forma de los árboles en el tipo dendrométrico paraboloide (Kershaw et al., 2017). La evaluación de un bosque dominado por *R. rospigliosii* y *Prumnopitys harmsiana* (Pilg.) de Laub. en Ecuador reportó un volumen de $510 \text{ m}^3\cdot\text{ha}^{-1}$, muy superior al estimado para el área de estudio ($300 \text{ m}^3\cdot\text{ha}^{-1}$) (Yaguana et al., 2012). En cuanto a la densidad de la madera, esta se puede clasificar como blanda y liviana, coincidiendo con la densidad básica ($0.34 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) de la misma especie reportada por Portillo et al. (2019). No obstante, estos valores de densidad son mucho más bajos que los expuestos por Baker et al. (2004) con mediciones de $0.57 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ en madera de bosque natural. Una tendencia similar fue reportada para 19 especies plantadas con fines de restauración en zonas tropicales de Ghana, donde la densidad específica de la madera de las especies fue menor en comparación con la de individuos presentes en los bosques (Yeboah et al., 2014). Probablemente, dicha reducción se deba a que los individuos experimentan mayor competencia intraespecífica en las plantaciones que en condiciones naturales (Nguyen et al., 2014). La disminución de la densidad básica de la madera de las especies provenientes de plantaciones evidencia también una posible reducción en la tasa de captura de carbono (Yeboah et al., 2014), aspecto que debe ser considerado en la gestión de las plantaciones con fines de restauración.

En cuanto a la biomasa por árbol de *R. rospigliosii*, se encontraron valores promedio de 0.14 Mg de biomasa aérea y 0.05 Mg de biomasa subterránea. En todos los individuos de la plantación, la biomasa aérea fue mayor que la biomasa subterránea. No obstante, el componente subterráneo juega un papel importante, ya que este compartimento es el que más aporta a la biomasa total después del fuste, como lo exponen Rodríguez et al. (2019) en árboles de *Pinus patula* Schltdl. & Cham.

El modelo de Husch presentó el mejor ajuste para la estimación del carbono aéreo, subterráneo y total, así como de la biomasa aérea y subterránea de *R. rospigliosii*, mientras que, el modelo no lineal de Spurr se ajustó mejor para la estimación de biomasa total. Es importante resaltar que, en general, todos los modelos presentaron ajustes óptimos al conjunto de datos ($R^2 > 94 \%$). Los modelos de Husch y Spurr han sido usados ampliamente en la estimación forestal, se caracterizan por su buen ajuste y por generar predicciones precisas (Kiviste et al., 2002).

En el presente estudio, la biomasa por componente de *R. rospigliosii* se estimó con el modelo de Husch y se observó un mayor ajuste en los modelos de los componentes

grandis L. f. in Guatemala, showed fits of 78 % using the Husch model (López et al., 2018).

El average BEF for *R. rospigliosii* was 1.50 which is higher than the constant proposed by the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) for conifer plantations in the tropics, set at 1.30 (IPCC, 2019). In Brazil, an average BEF of 1.47 was reported for *Pinus elliottii* Engelm. and *Pinus taeda* L., established under conditions similar to those of this study (Sanquetta et al., 2011). In Costa Rica, an average BEF of 1.54 was calculated for individuals of *C. lusitanica* from plantations (Fonseca-González et al., 2023). These results are similar to those found for *R. rospigliosii* and underscore the importance of calculating specific BEFs, as relying on the IPCC constant of 1.30 could lead to underestimations in carbon estimation.

Regarding the biomass contribution per tree section for *R. rospigliosii*, the stem was the largest contributor to total biomass, followed by coarse roots, branches, fine roots, and finally, leaves. These findings are consistent with other conifers, where most of biomass is concentrated in the stem (Rodríguez et al., 2019). Notably, the root component of *R. rospigliosii* accounted for 35.35 % of the total biomass, highlighting its significance in the quantification of this species' biomass. Carbon content across components was similar (approximately 49 %), except for fine roots, where the content was lower and exhibited greater variability ($41.08 \% \pm 5.02 \%$). In other planted conifer species, carbon content ranged between 44 % and 49 % for tree components, similar to those observed in *R. rospigliosii* (Hernández-Vera et al., 2017; Pompa-García et al., 2017).

Lastly, on average, one hectare of *R. rospigliosii* with 1666 trees stores 316.26 ± 187.26 Mg of biomass and 156.09 ± 92.80 Mg C. These values are low compared to those reported for other conifer plantations and that at the end of their cycle (~15 to 20 years) can store up to 230 Mg C·ha⁻¹ (Cook et al., 2014). Additionally, carbon storage is lower than that reported in premontane moist forests in Colombia which is between 149 and 235 Mg C·ha⁻¹, with significantly lower densities (Alvarez et al., 2012; Yepes et al., 2016). Although no data were found on biomass and carbon sequestration of *R. rospigliosii* in natural forests in Colombia, reports on diameters and heights of individuals are considerably greater under these conditions, reaching up to 30 m in height and more than 1 m DBH (Marín, 1998).

Conclusions

Biomass accumulation and carbon storage were estimated in 20-year-old experimental plantations of *Retrophyllum rospigliosii* established for restoration

aéreos del árbol ($R^2 > 80 \%$) y menor en la estimación de la biomasa de las raíces gruesas ($R^2 = 77 \%$) y finas ($R^2 = 56 \%$). Los resultados coinciden con los reportes de estimación de la biomasa y carbono en otras especies de coníferas. Por ejemplo, para *Cupressus lusitanica* Mill. en Costa Rica, Fonseca-González et al. (2023) reportan ajustes del 97 % en la biomasa total con el modelo de Husch. En México, con el modelo de Husch, Carrillo et al. (2014) estimaron carbono total en *Pinus montezumae* Lamb. ex Gordon & Glend con ajustes mayores de 98 %, luego obtuvieron un ajuste de 98 % al estimar la biomasa aérea de *Pinus hartwegii* Lindl. (Carrillo et al., 2016); asimismo, Rodríguez et al. (2019) estimaron la biomasa de las raíces de 90 árboles de *Pinus patula* con un ajuste de 92 % y biomasa total con un ajuste de 97 %. Otras especies latifoliadas de plantación como *Tectona grandis* L. f en Guatemala presentaron ajustes del 78 % con el modelo de Husch (López et al., 2018).

El FEB promedio para *R. rospigliosii* fue 1.50. Este es mayor que la constante propuesta por el Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC, por sus siglas en inglés) para plantaciones de coníferas en el trópico que es de 1.30 (IPCC, 2019). En Brasil se reportó un FEB promedio de 1.47 para *Pinus elliottii* Engelm. y *Pinus taeda* L. establecidas en condiciones similares a las de este estudio (Sanquetta et al., 2011). En Costa Rica, se calculó un FEB promedio de 1.54 para individuos de *C. lusitanica* procedentes de plantaciones (Fonseca-González et al., 2023). Estos resultados son similares a los encontrados para *R. rospigliosii* y evidencia la necesidad de calcular FEB específicos, ya que se pueden generar subestimaciones en la estimación del carbono haciendo uso de la constante de 1.30 propuesta por el IPCC.

Respecto al aporte de biomasa por sección del árbol de *R. rospigliosii*, el fuste fue el componente que más aportó a la biomasa total, seguido por las raíces gruesas, ramas, raíces finas y por último las hojas. Estos resultados son comunes en coníferas, donde la mayor cantidad de biomasa se encuentra acumulada en el fuste (Rodríguez et al., 2019). Cabe resaltar que el componente radicular de *R. rospigliosii* aportó 35.35 % de la biomasa total, evidenciando la importancia de este componente en la cuantificación de la biomasa de los árboles de esta especie. Los contenidos de carbono por componente fueron similares entre ellos (alrededor del 49 %), excepto en las raíces finas donde el contenido fue menor y presentó mayor variabilidad ($41.08 \% \pm 5.02 \%$). En otras especies de coníferas plantadas se encontraron contenidos de carbono que varían entre 44 % y 49 % para los componentes de los árboles, similares a los encontrados para *R. rospigliosii* (Hernández-Vera et al., 2017; Pompa-García et al., 2017).

Finalmente, en promedio, una hectárea de *R. rospigliosii* con 1666 árboles almacena 316.26 ± 187.26 Mg de

purposes in the Colombian Andes. Individuals of this species, grown in high-density monospecific plantations, exhibited relatively low biomass values ($316.26 \pm 187.26 \text{ Mg} \cdot \text{ha}^{-1}$) and carbon sequestration ($156.08 \pm 92.80 \text{ Mg C} \cdot \text{ha}^{-1}$) compared to those in natural forests. The lack of biodiversity in monospecific plantations could limit productivity by reducing the potential for complementarity and facilitation. Given the large size attained by *R. rospigliosii* under natural conditions, this species demonstrates significant potential for carbon sequestration in stem. Therefore, restoration efforts should prioritize the enrichment of degraded forests with this species or its inclusion in agroforestry systems.

Acknowledgments

To the members of the Seedbed for Applied Silviculture of the Cauca University for their collaboration in the development of the field study and to the company Smurfit-Westrock Colombia for providing the experimental sites and for their logistical support for this work.

Conflict of interest

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

End of English version

References / Referencias

- Affleck, D. L. R. (2019). Aboveground biomass equations for the predominant conifer species of the Inland Northwest USA. *Forest Ecology and Management*, 432, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.09.009>
- Alvarez, E., Duque, A., Saldarriaga, J., Cabrera, K., de las Salas, G., del Valle, I., Lema, A., Moreno, F., Orrego, S., & Rodríguez, L. (2012). Tree above-ground biomass allometries for carbon stocks estimation in the natural forests of Colombia. *Forest Ecology and Management*, 267, 297–308. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2011.12.013>
- Araujo, E. C. G., Sanquetta, C. R., Dalla Corte, A. P., Pelissari, A. L., Orso, G. A., & Silva, T. C. (2023). Global review and state-of-the-art of biomass and carbon stock in the Amazon. *Journal of Environmental Management*, 331, 117251. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117251>
- Baker, T. R., Phillips, O. L., Malhi, Y., Almeida, S., Arroyo, L., Di Fiore, A., Erwin, T., Killeen, T. J., Laurance, S. G., & Laurance, W. F. (2004). Variation in wood density determines spatial patterns in Amazonian forest biomass. *Global Change Biology*, 10(5), 545–562. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2004.00751.x>
- Carrillo, F., Acosta Mireles, M., Flores Ayala, E., Juárez Bravo, J. E., & Bonilla Padilla, E. (2014). Estimación de biomasa y

biomasa y $156.09 \pm 92.80 \text{ Mg C}$. Estos valores son bajos en comparación con los reportados para otras plantaciones de coníferas y que al final de su ciclo (~15 a 20 años) pueden almacenar hasta de $230 \text{ Mg C} \cdot \text{ha}^{-1}$ (Cook et al., 2014). Adicionalmente, el almacenamiento de carbono es inferior al reportado en bosques húmedos premontanos en Colombia que se encuentra entre 149 y $235 \text{ Mg C} \cdot \text{ha}^{-1}$, con densidades significativamente inferiores (Alvarez et al., 2012; Yepes et al., 2016). Aunque no se encontraron datos sobre la biomasa y captura de carbono de *R. rospigliosii* en bosques naturales de Colombia, los reportes sobre diámetros y alturas de los individuos son considerablemente mayores en estas condiciones, alcanzando hasta 30 m de altura y más de 1 m de DAP (Marín, 1998).

Conclusiones

La acumulación de biomasa y el carbono almacenado se estimaron en plantaciones experimentales adultas (20 años) de *Retrophyllum rospigliosii* con fines de restauración en la región Andina colombiana. Los individuos de esta especie, establecidos en plantaciones monoespecíficas y de alta densidad, alcanzan valores de biomasa ($316.26 \pm 187.26 \text{ Mg} \cdot \text{ha}^{-1}$) y captura de carbono ($156.08 \pm 92.80 \text{ Mg C} \cdot \text{ha}^{-1}$) relativamente bajos en comparación con los individuos en bosques naturales. La falta de biodiversidad en plantaciones monoespecíficas de la especie podría limitar la productividad al reducir el potencial de complementariedad y facilitación. Dada la gran talla que alcanzan los individuos de *R. rospigliosii* en condiciones naturales, esta especie presenta un gran potencial para la captura de carbono en el fuste; por ello, se recomienda enfocar los esfuerzos de restauración en el enriquecimiento de bosques degradados con esta especie o en su incorporación en sistemas agroforestales.

Agradecimientos

A los miembros del Semillero de Investigación en Silvicultura Aplicada de la Universidad del Cauca por su colaboración en el desarrollo del trabajo de campo y a la empresa Smurfit-Westrock Colombia por facilitar los sitios experimentales y por su apoyo logístico para la realización del trabajo.

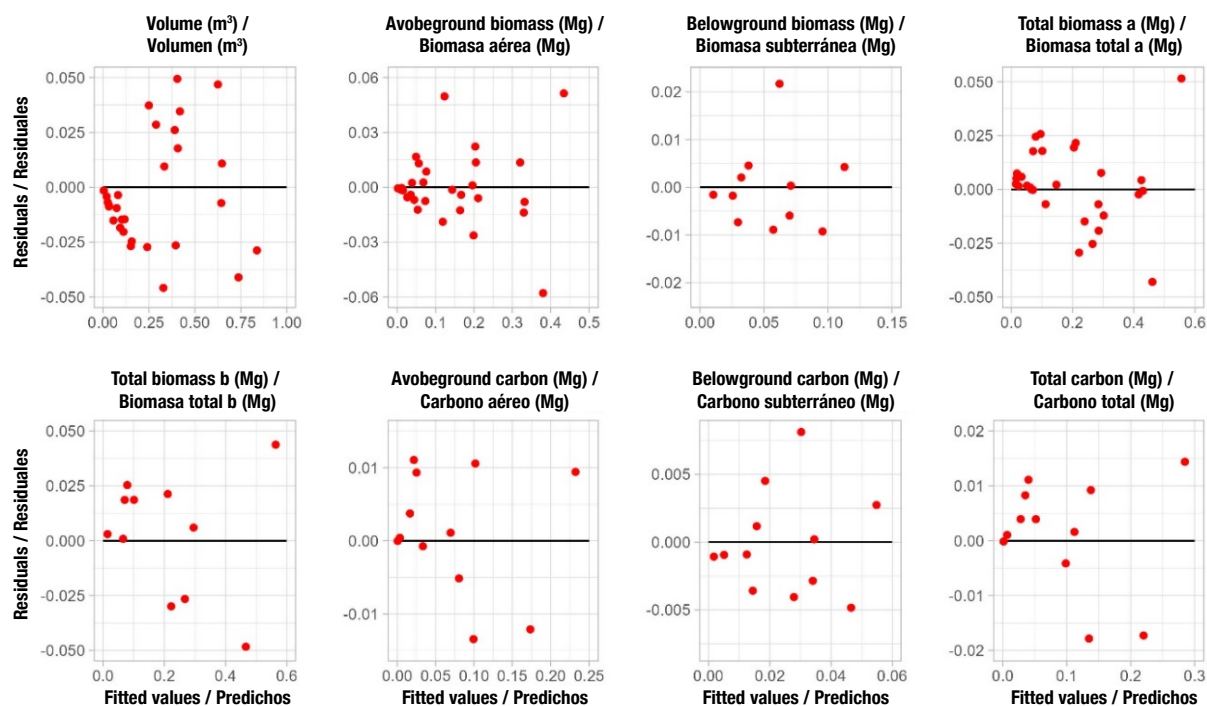
Conflicto de intereses

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.

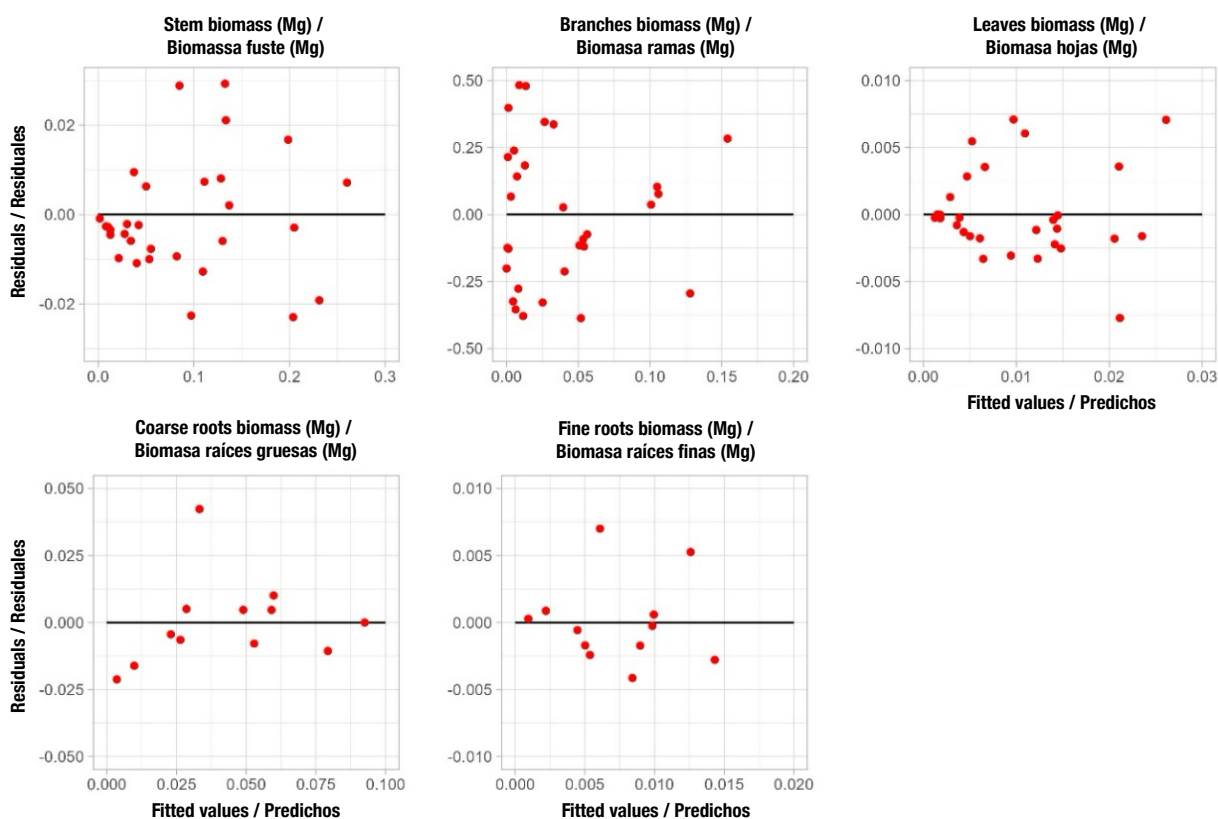
Fin de la versión en español

- carbono en dos especies arbóreas en La Sierra Nevada, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(5), 779–793. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342014000500005
- Carrillo, F., Acosta Mireles, M., Jiménez Cruz, C. del R., González Molina, L., & Etchevers Barra, J. D. (2016). Ecuaciones alométricas para estimar la biomasa y el carbono de la parte aérea de *Pinus hartwegii* en el Parque Nacional Ixta-Popo, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(3), 681–691. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i3.327>
- Chave, J., Réjou-Méchain, M., Búrquez, A., Chidumayo, E., Colgan, M. S., Delitti, W. B. C., Duque, A., Eid, T., Fearnside, P. M., Goodman, R. C., Henry, M., Martínez-Yrizar, A., Mugasha, W. A., Muller-Landau, H. C., Mencuccini, M., Nelson, B. W., Ngomanda, A., Nogueira, E. M., Ortiz-Malavassi, E., ... Vieilledent, G. (2014). Improved allometric models to estimate the aboveground biomass of tropical trees. *Global Change Biology*, 20(10), 3177–3190. <https://doi.org/10.1111/gcb.12629>
- Chojnacky, D. C., Heath, L. S., & Jenkins, J. C. (2014). Updated generalized biomass equations for North American tree species. *Forestry*, 87(1), 129–151. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpt053>
- Cogollo, A., Velásquez-Rúa, C., Toro, J. L., & García, N. (2007). Las podocarpáceas. In N. García (Ed.), *Libro rojo de plantas de Colombia* (vol. 5): *Las magnoliáceas, las miristicáceas y las podocarpáceas* (pp. 193–224). Instituto Alexander von Humboldt, Corporación Autónoma Regional del Centro de Antioquia, Jardín Botánico Joaquín Antonio Uribe de Medellín, Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. https://www.researchgate.net/publication/279204794_Libro_Rojo_de_Plantas_de_Colombia_Volumen_5_Las_magnolias_las_miristicaceas_y_las_podocarpaceas
- Cook, R. L., Binkley, D., Mendes, J. C. T., & Stape, J. L. (2014). Soil carbon stocks and forest biomass following conversion of pasture to broadleaf and conifer plantations in southeastern Brazil. *Forest Ecology and Management*, 324, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.03.019>
- Correia, A. C., Faias, S. P., Ruiz-Peinado, R., Chianucci, F., Cutini, A., Fontes, L., Manetti, M. C., Montero, G., Soares, P., & Tomé, M. (2018). Generalized biomass equations for Stone pine (*Pinus pinea* L.) across the Mediterranean basin. *Forest Ecology and Management*, 429, 425–436. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.07.037>
- Federici, S., Tubiello, F. N., Salvatore, M., Jacobs, H., & Schmidhuber, J. (2015). New estimates of CO₂ forest emissions and removals: 1990–2015. *Forest Ecology and Management*, 352, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.04.022>
- Fonseca-González, W., Rojas Vargas, M., Villalobos Chacón, R., & Alice Guier, F. (2023). Estimation of the biomass and carbon in *Cupressus lusitanica* Mill. trees in Costa Rica. *Revista de Ciencias Ambientales*, 57(2), 18330. <http://doi.org/10.15359/rca.57-6>
- Gardner, M., & Thomas, P. (2013). *Retrophyllum rospigliosii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: E. T34110A2846471. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T34110A2846471>
- Griscom, B. W., Adams, J., Ellis, P. W., Houghton, R. A., Lomax, G., Miteva, D. A., Schlesinger, W. H., Shoch, D., Siikamäki, J. V., Smith, P., Woodbury, P., Zganjar, C., Blackman, A., Campari, J., Conant, R. T., Delgado, C., Elias, P., Gopalakrishna, T., Hamsik, M. R., ... Fargione, J. (2017). Natural climate solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(44), 11645–11650. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710465114>
- Han, S. H., & Park, B. B. (2020). Comparison of allometric equation and destructive measurement of carbon storage of naturally regenerated understory in a *Pinus rigida* plantation in South Korea. *Forests*, 11(4), 425. <https://doi.org/10.3390/f11040425>
- Hernández-Ramos, J., Santos-Posadas, H. M. D., Valdez-Lazalde, J. R., Tamarit-Urías, J. C., Ángeles-Pérez, G., Hernández-Ramos, A., Peduzzi, A., & Carrero, O. (2017). Biomasa aérea y factores de expansión en plantaciones forestales comerciales de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. *Agrociencia*, 51(8), 921–938. <https://www.agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia/article/view/1336>
- Hernández-Vera, D., Pompa-García, M., Yerena-Yamallel, J. I., & Alanís-Rodríguez, E. (2017). Within-tree carbon concentration variation in three Mexican pine species. *Bosque (Valdivia)*, 38(2), 381–386. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002017000200015>
- Holdridge, L. R. (1982). *Ecología basada en zonas de vida*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). (2019). *2019 Refinement to the 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories*. Institute for Global Environmental Strategies. <https://www.ipcc.ch/report/2019-refinement-to-the-2006-ipcc-guidelines-for-national-greenhouse-gas-inventories/>
- Kershaw, J. A., Ducey, M. J., Beers, T. W., & Husch, B. (2017). *Forest mensuration* (5th edition). John Wiley & Sons, Ltd.
- Kiviste, A., Álvarez-González, J. G., Rojo-Alboreca, A., & Ruiz, A. D. (2002). *Funciones de crecimiento de aplicación en el ámbito forestal*. Monografías INIA.
- Liu, B., Bu, W., Zang, R. (2023). Improved allometric models to estimate the aboveground biomass of younger secondary tropical forests. *Global Ecology and Conservation*, 41, e02359. <http://doi.org/10.1016/j.gecco.2022.e02359>
- Loetsch, F., Zöhrer, F., & Haller, K. (1973). *Forest inventory* (2nd ed.). BLV Verlagsgesellschaft.
- López, H. G., Vaides, E. E., & Alvarado, A. (2018). Evaluación de carbono fijado en la biomasa aérea de plantaciones de teca en Chahal, Alta Verapaz, Guatemala. *Agronomía Costarricense*, 42(1), 137–153. <http://doi.org/10.15517/rac.v42i1.32201>
- Marín, A. (1998). *Ecología y silvicultura de las Podocarpáceas andinas de Colombia*. Smurfit Cartón de Colombia.
- Nguyen, H., Firn, J., Lamb, D., & Herbohn, J. (2014). Wood density: A tool to find complementary species for the design of mixed species plantations. *Forest Ecology and Management*, 334, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.08.022>
- Ortega, G., & Muñoz, V. (2020). *Rescatando la biodiversidad colombiana. Nuestra flora como escenario del bicentenario de la campaña libertadora*. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Colombia. <https://www.minambiente.gov.co/wp-content/uploads/2022/06/RESCATANDO-LA-BIODIVERSIDAD-FAUNA-Nov-84.pdf>

- Picard, N., Saint-André, L., & Henry, M. (2012). *Manual for building tree volume and biomass allometric equations: from field measurement to prediction*. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement. <https://www.fao.org/4/i3058e/i3058e.pdf>
- Pompa-García, M., Sigala-Rodríguez, J. A., Jurado, E., & Flores, J. (2017). Tissue carbon concentration of 175 Mexican forest species. *iForest - Biogeosciences and Forestry*, 10(4), 754. <https://doi.org/10.3832/for2421-010>
- Portillo, P. R., Cueva, N., Sierra, J. C., & Vásquez, Á. M. (2019). Propiedades físico mecánicas del *Retrophyllum rospigliosii* (Pilger) CN Page de 22 años en dos sistemas de plantación en Colombia. *Revista Forestal del Perú*, 34(1), 41 – 51. <http://doi.org/10.21704/rfp.v34i1.1284>
- R Core Team. (2023). R: A language and environment for statistical computing. [software]. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>
- Ramírez, J. A., Marín, A., Urrego, J. B., Castaño, Á., & Ospina, R. (2021). Efecto de la fertilización en el crecimiento de *Retrophyllum rospigliosii* de la zona andina colombiana. *Madera y Bosques*, 27(3), e2732315. <https://doi.org/10.21829/myb.2021.2732315>
- Rodríguez, G., García, J. Á., Leyva, J. C., Ruiz, C., Enríquez, J. R., & Santiago, W. (2019). Biomasa estructural y por compartimentos en regeneración de *Pinus patula* en áreas con matarrasa. *Madera y Bosques*, 25(1), e2511713. <https://doi.org/10.21829/myb.2019.2511713>
- Sanquetta, C. R., Corte, A. P., & da Silva, F. (2011). Biomass expansion factor and root-to-shoot ratio for *Pinus* in Brazil. *Carbon Balance and Management*, 6(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1750-0680-6-6>
- Temesgen, H., Affleck, D., Poudel, K., Gray, A., & Sessions, J. (2015). A review of the challenges and opportunities in estimating above ground forest biomass using tree-level models. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 30(4), 326 – 335. <https://doi.org/10.1080/02827581.2015.1012114>
- Teobaldelli, M., Somogyi, Z., Migliavacca, M., & Usoltsev, V. A. (2009). Generalized functions of biomass expansion factors for conifers and broadleaved by stand age, growing stock and site index. *Forest Ecology and Management*, 257(3), 1004 – 1013. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.11.002>
- Yaguana, C., Lozano, D., Neill, D., & Asanza, M. (2012). Diversidad florística y estructura del bosque nublado del río Numbala, Zamora-Chinchipe, Ecuador: El “bosque gigante” de Podocarpaceae adyacente al Parque Nacional Podocarpus. *Revista Amazónica: Ciencia y Tecnología*, 1(3), 226–247. <https://doi.org/10.59410/RACYT-v01n03ep05-0019>
- Yeboah, D., Burton, A. J., Storer, A. J., & Opuni-Frimpong, E. (2014). Variation in wood density and carbon content of tropical plantation tree species from Ghana. *New Forests*, 45(1), 35–52. <https://doi.org/10.1007/s11056-013-9390-8>
- Yepes, A., Sierra, A., Niño, L. M., López, M., Garay, C., Cabrera, E., & Barbosa, A. (2016). Biomasa y carbono total almacenado en robledales del sur de los Andes Colombianos: Aportes para el enfoque REDD+ a escala de proyectos. *Revista de Biología Tropical*, 64(1), 399 – 412. <https://doi.org/10.15517/rbt.v64i1.18221>



Appendix 1. Residuals of predicted values from models fitted to estimate volume, biomass, and carbon of *Retrophyllum rospigliosii*.
 Apéndice 1. Residuales de los valores predichos por los modelos ajustados para la estimación del volumen, biomasa y carbono de *Retrophyllum rospigliosii*.



Appendix 2. Residuals of predicted values from models fitted to estimate the biomass of each component of *Retrophyllum rospigliosii*.
 Apéndice 2. Residuales de los valores predichos por los modelos ajustados para estimar la biomasa de cada componente de *Retrophyllum rospigliosii*.

Diversity and updated checklist of limno-terrestrial tardigrade species in Quintana Roo, Mexico

Diversidad y actualización del listado de especies de tardígrados limnoterrestres en Quintana Roo, México

Wilbert A. Pérez-Pech^{1*}; Roberto Guidetti²; Abril Anguas-Escalante¹;

Juana I. Crisanto-Rodríguez³; Leopoldo Q. Cutz-Pool³

¹El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Chetumal, Departamento de Sistemática y Ecología Acuática. Av. Centenario km 5.5. C. P. 0440. Chetumal, Quintana Roo, México.

²University of Modena and Reggio Emilia. Via Campi 213/D, 41125, Modena, Italia.

³Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Chetumal, Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica. Av. Insurgentes núm. 330. C. P. 77013. Chetumal, Quintana Roo, México.

*Corresponding author: wilbert.perez@posgrado.ecosur.mx; tel.: +52 983 168 0767.

Abstract

Introduction. Quintana Roo is the only state in the Yucatán Peninsula where the limno-terrestrial tardigrade fauna has been documented; however, the records have been limited to generic reports.

Objective. To provide an updated checklist of limno-terrestrial tardigrades for Quintana Roo and to explore the spatiotemporal variation of these animals in two rural environments.

Materials and methods. A taxonomic review was conducted on tardigrades collected between 2016 and 2018. Moreover, during two sampling campaigns in 2018, specimens were collected from the moss *Aulacopilum* sp. and the lichen *Parmotrema* sp. in a citrus plantation and an evergreen forest fragment. Data were compared using the student's *t* test ($P < 0.05$).

Results and discussion. *Kristenseniscus kofordi*, *Milnesium* sp. 1, *Milnesium* cf. *cassandrae*, *Macrobiotus alvaroi*, *Macrobiotus* cf. *polyopus*, *Macrobiotus* cf. *ocotensis*, *Macrobiotus* sp. 1, *Macrobiotus* cf. *semmelweisi*, *Minibiotus* cf. *intermedius*, *Paramacrobiotus* cf. *savai*, *Mesobiotus* cf. *pseudopatiens* and *Ramazzottius* cf. *baumanni* were recorded. The addition of these taxa, along with previous records of *Echiniscus* sp. and *Doryphoribius chetumalensis*, increases the number of limno-terrestrial tardigrade species in Quintana Roo to 14, also the coastal mangrove forest is added to the list of environments in the entity. The highest species richness and Shannon-Wiener diversity were observed in the citrus plantation.

Conclusions. The updated checklist of limno-terrestrial tardigrades in Quintana Roo comprises 14 species. Diversity was higher in the citrus plantation, suggesting that tardigrades adapt well to anthropogenic environments.

Keywords: *Kristenseniscus kofordi*; *Macrobiotus alvaroi*; *Milnesium* sp.; *Rhizophora mangle*.

Resumen

Introducción. Quintana Roo es el único estado de la península de Yucatán donde se ha documentado la fauna de tardígrados limnoterrestres; sin embargo, los listados se han limitado a reportes genéricos.

Objetivo. Proveer el listado actualizado de tardígrados limnoterrestres para Quintana Roo y explorar la variación espacio temporal de estos animales en dos ambientes rurales.

Materiales y métodos. Se hizo una revisión taxonómica de los tardígrados recolectados entre los años 2016 y 2018. Adicionalmente, durante dos campañas de muestreo en 2018, se recolectaron especímenes en musgo *Aulacopilum* sp. y líquen *Parmotrema* sp. de un cultivo de cítricos y un fragmento de selva mediana subperennifolia; los datos se compararon con una prueba *t* de Student ($P < 0.05$).

Resultados y discusión. Se obtuvo el registro de *Kristenseniscus kofordi*, *Milnesium* sp. 1, *Milnesium* cf. *cassandrae*, *Macrobiotus alvaroi*, *Macrobiotus* cf. *polyopus*, *Macrobiotus* cf. *ocotensis*, *Macrobiotus* sp. 1, *Macrobiotus* cf. *semmelweisi*, *Minibiotus* cf. *intermedius*, *Paramacrobiotus* cf. *savai*, *Mesobiotus* cf. *pseudopatiens* y *Ramazzottius* cf. *baumanni*. La suma de estos taxones y los registros previos de *Echiniscus* sp. y *Doryphoribius chetumalensis* elevan a 14 el número de especies en la lista de tardígrados limnoterrestres de Quintana Roo; asimismo, se adiciona el bosque de manglar costero a la lista de ambientes en la entidad. La mayor riqueza y diversidad de Shannon-Wiener se encontró en el cultivo de cítricos.

Conclusiones. El listado actualizado de tardígrados limnoterrestres en Quintana Roo está conformado por 14 especies. La diversidad fue mayor en el cultivo de cítricos, lo cual sugiere que los tardígrados se adaptan bien a los ambientes antrópicos.

Palabras clave:

Kristenseniscus kofordi; *Macrobiotus alvaroi*; *Milnesium* sp.; *Rhizophora mangle*.

Introduction

Tardigrades inhabit marine, freshwater, and terrestrial ecosystems (Nelson et al., 2015). Research on this group has primarily focused on describing and listing limno-terrestrial species in natural environments (Bartels et al., 2016; Nelson et al., 2015). However, urban and rural environments can also host unique communities of limno-terrestrial tardigrades (González-Reyes et al., 2016; Guidetti et al., 2013; Meyer et al., 2013; Pérez-Pech et al., 2017).

In recent years, interest in studying tardigrade fauna in Mexico has increased (Dueñas-Cedillo et al., 2020; García-Román et al., 2022; Moreno-Talamantes et al., 2015, 2019; Moreno-Talamantes & León-Espinosa, 2019; Núñez et al., 2021). In the Yucatan Peninsula, only Quintana Roo has focused on the study of this fauna. Pérez-Pech et al. (2016, 2017) recorded tardigrades in urban environments in Chetumal and described *Doryphoribius chetumalensis* Pérez-Pech, Anguas-Escalante, Cutz-Pool & Guidetti, 2017. Moreover, Anguas-Escalante et al. (2018) and Cutz-Pool et al. (2019) studied tardigrade diversity in citrus plantations. At the national level, Quintana Roo is also a pioneer in the study of coastal marine tardigrades (Anguas-Escalante et al., 2020; Pérez-Pech et al., 2020).

The present study aimed to update the species checklist and records of tardigrades in Quintana Roo, and to compare the diversity of limno-terrestrial tardigrades between a citrus plantation and an evergreen forest fragment.

Materials and Methods

Variation in tardigrade diversity between an extensive temporary citrus plantation and an adjacent evergreen forest fragment was evaluated in the ejido El Palmar, municipality of Othón Pompeyo Blanco (18° 26' 48" N, 88° 31' 50" W). Collections were made during two sampling campaigns, one in February (the 'nortes' season, a meteorological phenomenon characterized by intense, cold winds) and another in September (the rainy season) of 2018. In both the plantation and vegetation fragment, a 5 000 m² plot was established, where two transects were located in the internal and external region (Figure 1). On each transect, six trees were selected (spaced 10 m apart); from each tree, 10 cm² samples of the moss *Aulacopilum* sp. and the lichen *Parmotrema* sp. (the only genera present in the study area) were collected at a height of 1 m. At each site, the percentage of humidity and temperature were measured using a digital thermos hygrometer (Onset HOBO® data logger).

Introducción

Los tardígrados habitan ecosistemas marinos, dulceacuícolas y terrestres (Nelson et al., 2015). Los estudios del grupo se han centrado principalmente en la descripción y listado de especies limnoterrestres en ambientes naturales (Bartels et al., 2016; Nelson et al., 2015); sin embargo, los ambientes urbanos y rurales pueden albergar una comunidad única de tardígrados limnoterrestres (González-Reyes et al., 2016; Guidetti et al., 2013; Meyer et al., 2013; Pérez-Pech et al., 2017).

En los últimos años, México ha incrementado el interés por el estudio de su fauna de tardígrados (Dueñas-Cedillo et al., 2020; García-Román et al., 2022; Moreno-Talamantes et al., 2015, 2019; Moreno-Talamantes & León-Espinosa, 2019; Núñez et al., 2021). En la península de Yucatán, solo Quintana Roo se ha centrado en el estudio de dicha fauna. Pérez-Pech et al. (2016, 2017) registraron tardígrados en ambientes urbanos de Chetumal y describieron a *Doryphoribius chetumalensis* Perez-Pech, Anguas-Escalante, Cutz-Pool & Guidetti, 2017. Asimismo, Anguas-Escalante et al. (2018) y Cutz-Pool et al. (2019) estudiaron la diversidad de tardígrados en cultivos de cítricos. A nivel nacional, Quintana Roo también es pionero en el estudio de tardígrados marinos costeros (Anguas-Escalante et al., 2020; Pérez-Pech et al., 2020).

El presente estudio tuvo como objetivo actualizar el listado de especies y registros de tardígrados en Quintana Roo, así como comparar la diversidad de tardígrados limnoterrestres entre un cultivo de cítricos y un fragmento de selva mediana subperennifolia.

Materiales y métodos

La variación en la diversidad de tardígrados entre un cultivo temporal extensivo de cítricos y un fragmento de selva mediana subperennifolia adyacente se evaluó en el ejido El Palmar, municipio de Othón Pompeyo Blanco (18° 26' 48" LN, 88° 31' 50" LO). La recolección se hizo durante dos campañas de muestreo, una en febrero (temporada de 'nortes', fenómeno meteorológico que se caracteriza por vientos intensos y fríos) y otra en septiembre (temporada de lluvias) de 2018. Tanto en el cultivo como en el fragmento de vegetación se estableció un cuadrante de 5 000 m², donde a su vez se ubicaron dos transectos en su región interna y región externa (Figura 1). Sobre cada transecto se seleccionaron seis árboles (distanciados por 10 m); en cada árbol se recolectaron muestras de 10 cm² del musgo *Aulacopilum* sp. y del líquen *Parmotrema* sp. (únicos géneros presentes en el área de estudio) a 1 m de altura. En cada sitio se midió el porcentaje de humedad y temperatura con un termohigrómetro digital (Onset HOBO® data logger).

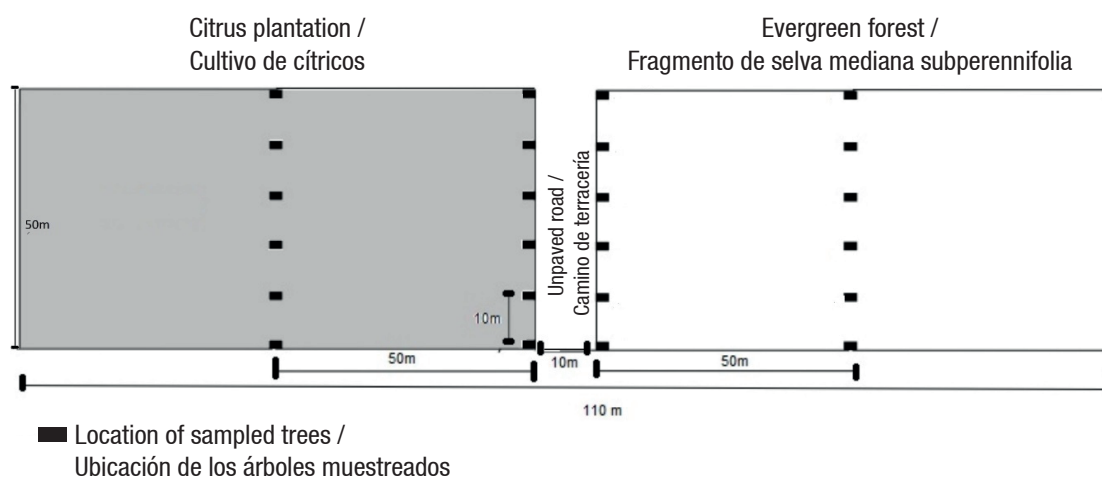


Figure 1. Sampling design of limno-terrestrial tardigrades in trees of different vegetation in the ejido El Palmar, municipality of Othón Pompeyo Blanco, Quintana Roo.

Figura 1. Diseño de muestreo de tardígrados limnoterrestres en árboles de vegetación distinta en el ejido El Palmar, municipio de Othón Pompeyo Blanco, Quintana Roo.

In the Zoology laboratory of the Tecnológico Nacional de México campus Chetumal, the samples were immersed in filtered tap water for 10 min and the pH was measured, following the methodology of Johansson et al. (2011); subsequently, the samples were sieved (mesh size 2 000 μm and 38 μm). The obtained was reviewed with a stereomicroscope Nikon C-PS ZMZ445.

En el laboratorio de Zoología del Tecnológico Nacional de México campus Chetumal, las muestras se sumergieron en agua filtrada del grifo durante 10 min y se midió el pH, siguiendo la metodología de Johansson et al. (2011); posteriormente, las muestras se tamizaron (luz de malla 2 000 μm y 38 μm). Lo obtenido se revisó con ayuda de un estereomicroscopio Nikon C-PS ZMZ445.

The tardigrades were preserved in 70 % alcohol and subsequently they were mounted in glass slides using Hoyer's liquid as medium mount. Taxonomic identifications were made with Axio Lab a1 (Zeiss) and DM RB (Leica) optical microscopes (up to 100x), using differential interference contrast (DIC) and phase contrast (PhC) using dichotomous keys (*Milnesium* [Morek et al., 2016], *Macrobiotus* [Kaczmarek & Michalczyk, 2017], *Mesobiotus* [Kaczmarek et al., 2020] *Minibiotus* [Claxton, 1998] and *Paramacrobiotus* [Kaczmarek et al., 2017]) and primary literature (Guidetti et al., 2019; Morek et al., 2016). The slides were deposited in the Tardigrade Collection associated with the Marine Nematode Collection of the Colegio de la Frontera Sur, in the Bertolani Collection of the Universidad de Modena y Reggio Emilia (Italy), and the Tardigrade Collection related to the Mite Collection of Mexico (CNAC) of the Instituto de Biología of the Universidad Nacional Autónoma de México.

Los tardígrados se preservaron en alcohol al 70 % y, posteriormente, se prepararon laminillas permanentes con líquido de Hoyer como medio de montaje. Las identificaciones taxonómicas se hicieron con microscopios ópticos Axio Lab a1 (Zeiss) y DM RB (Leica) (hasta 100x), utilizando contraste de interferencia diferencial (DIC) y el contraste de fase (PhC) con ayuda de claves dicotómicas (*Milnesium* [Morek et al., 2016], *Macrobiotus* [Kaczmarek & Michalczyk, 2017], *Mesobiotus* [Kaczmarek et al., 2020] *Minibiotus* [Claxton, 1998] y *Paramacrobiotus* [Kaczmarek et al., 2017]) y literatura primaria (Guidetti et al., 2019; Morek et al., 2016). Las laminillas se depositaron en la Colección de Tardígrados asociada a la Colección de Nemátodos Marinos del Colegio de la Frontera Sur, en la Colección Bertolani de la Universidad de Modena y Reggio Emilia (Italia), y en la Colección de Tardígrados asociada a la Colección Nacional de Ácaros (CNAC) del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

To obtain the species checklist, samples available in the Zoology laboratory of the Tecnológico Nacional de México campus Chetumal, and the Tardigrade Collection associated with the Marine Nematode Collection of the College of the Colegio de la Frontera Sur were examined. These samples were compared with the taxa identified in the plantation and forest fragment and with specimens

Para obtener el listado de especies, se examinaron muestras disponibles en el laboratorio de Zoología del Tecnológico Nacional de México campus Chetumal y la Colección de Tardígrados asociada a la Colección de Nemátodos Marinos del Colegio de la Frontera Sur, las cuales se compararon con los taxones identificados en el área de cultivo y el fragmento de selva, y con especímenes de muestras de tallos de *Rhizophora mangle* L. de la Bahía

from samples of *Rhizophora mangle* L. stems from Chetumal Bay. To achieve this, 33 permanent slides from the work of Anguas-Escalante et al. (2018), conducted in an intensive citrus plantation in 2016 in El Palmar (18° 26' 48.0" N, 88° 31' 47.0" W), were reviewed. From the same locality, 20 samples (lichen and moss) collected by Cutz-Pool et al. (2019) in an extensive citrus plantation, and 48 samples (lichen and moss) collected by Pérez-Pech in 2018 in an evergreen forest fragment (unpublished data) were also reviewed. Finally, three lichen samples collected in February 2018 by Pérez-Pech (unpublished data) from coastal mangrove stems were examined ((18° 31' 14.1" N and 88° 16' 09.4" W).).

Abundance (N) and richness (S) of tardigrades were calculated. Diversity was assessed using species accumulation curves (Chao1 estimator) and the Shannon-Wiener index (H'). The difference in tardigrade diversity between the sampled environments and temporal variation was determined using Student's t-tests in Past 2.17c (Hammer et al., 2001). Environmental variables were correlated with tardigrade diversity through multidimensional scaling (MDS) analysis in Primer 6 (Clarke et al., 2006). For this, data on ecosystem type (citrus plantation and forest fragment), humidity, temperature, pH, and type of microecosystem (mosses and lichens) were evaluated.

Results

Species of the phylum tardigrada (Spallanzani, 1777)

Kristenseniscus kofordi (Schuster & Grigarick, 1966)

This species belongs to the genus *Kristenseniscus* Gąsiorek, Morek, Stec & Michalczyk, 2019 (Table 1). A total of 69 specimens collected from an extensive citrus plantation were analyzed. The specimens showed cuticular thickenings on the first and second pairs of plates and on the scapular and terminal plates. These features are characteristic of *K. kofordi* (Figure 2), a species that has been recorded in the state of Chiapas (Pilato, 2006), so there is a high probability that it belongs to the same species.

Milnesium Doyère, 1840

Milnesium sp. 1. A single individual was examined from an intensive citrus plantation. The specimen showed a [3-3]-[3-3/4] claw configuration and a smooth cuticle.

Milnesium cf. *cassandrae*. A total of 926 specimens were examined, collected from an extensive citrus plantation and an evergreen forest fragment; 10 specimens were collected from an intensive citrus plantation; and 17 specimens were found on lichen growing on the stems of *R. mangle* in the coastal area of Chetumal.

de Chetumal. Para ello, se revisaron 33 laminillas permanentes provenientes del trabajo de Anguas-Escalante et al. (2018) realizado en un cultivo intensivo de cítricos en 2016 en El Palmar (18° 26' 48.0" LN, 88° 31' 47.0" LO). De la misma localidad, se revisaron 20 muestras (liquen y musgo) colectadas por Cutz-Pool et al. (2019) en un cultivo extensivo de cítricos, y 48 muestras (liquen y musgo) colectadas por Pérez-Pech en 2018 en un fragmento de selva mediana subperennifolia (datos no publicados). Finalmente, tres muestras de liquen recolectados en febrero de 2018 por Pérez-Pech (datos no publicados) sobre tallos de mangle costero fueron revisadas ((18° 31' 14.1" LN, 88° 16' 09.4" LO).

Se calculó la abundancia (N) y riqueza (S) de tardígrados. La diversidad se evaluó mediante la curva de acumulación de especies (estimador Chao1) y el índice de Shannon-Wiener (H'). La diferencia de la diversidad de tardígrados entre los ambientes muestreados y la temporalidad se determinó con pruebas *t* de Student en Past 2.17c. (Hammer et al., 2001). Las variables ambientales se correlacionaron con la diversidad de tardígrados mediante el análisis de escalamiento multidimensional (MDS) en Primer 6 (Clarke et al., 2006). Para ello, se evaluaron los datos del tipo de ecosistema (cultivo de cítricos y parche de selva), humedad, temperatura, pH y tipo de microecosistema (musgos y líquenes).

Resultados

Especies del filo Tardigrada (Spallanzani, 1777)

Kristenseniscus kofordi (Schuster & Grigarick, 1966)

La especie pertenece al género *Kristenseniscus* Gąsiorek, Morek, Stec & Michalczyk, 2019 (Cuadro 1). Se examinaron 69 especímenes recolectados en un cultivo extensivo de cítricos. Los especímenes presentaron engrosamientos cuticulares en el primer y segundo par de placas y en las placas escapular y terminal. Estos son característicos de *K. kofordi* (Figura 2), especie que ha sido registrada en el estado de Chiapas (Pilato, 2006), por lo que existe probabilidad alta de que pertenezca a la misma especie.

Milnesium Doyère, 1840

Milnesium sp. 1. Se examinó solo un individuo proveniente de un cultivo intensivo de cítricos. El espécimen presentó la configuración de garras [3-3]-[3-3/4] y cutícula lisa.

Milnesium cf. *cassandrae*. Se examinaron 926 especímenes recolectados en un cultivo extensivo de cítricos y en un fragmento de selva mediana subperennifolia; 10 especímenes recolectados en un cultivo intensivo de cítricos; y 17 especímenes recolectados sobre liquen en tallos de *R. mangle* costero de la ciudad de Chetumal.

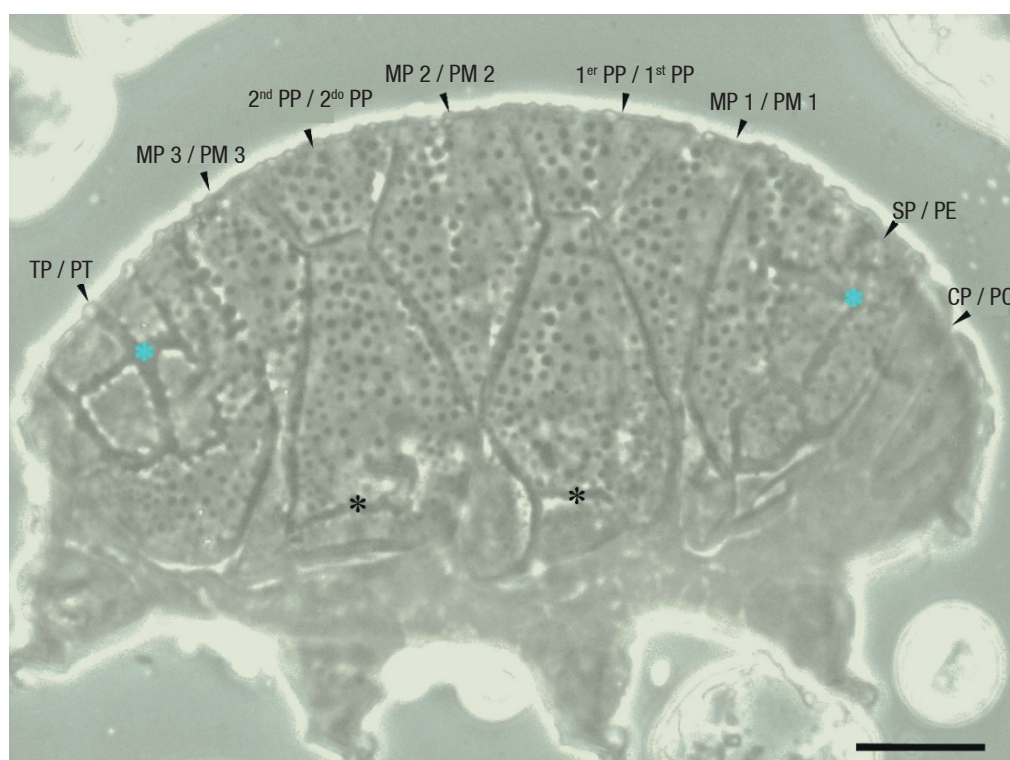


Figure 2. Dorsal region of *Kristenseniscus kofordi*. Blue asterisks indicate band-like thickenings that are interrupted, while the black asterisks indicate longitudinal band-like thickenings. Scapular plate (SP), cephalic plate (CP), median plate (MP), plate pair (PP), terminal plate (TP). Scale 20 μ m.

Figura 2. Región dorsal de *Kristenseniscus kofordi*. Los asteriscos azules señalan los engrosamientos en forma de bandas interceptadas y los asteriscos negros señalan los engrosamientos en forma de bandas longitudinales. Placa escapular (PE), placa cefálica (PC), placa media (PM), par de placas (PP), placa terminal (PT). Escala 20 μ m.

According to the identification key for the *granulatum* group, the specimens are closely related to *Milnesium cassandrae* Moreno-Talamantes, Roszkowska, García-Aranda, Flores-Maldonado & Kaczmarek, 2019, due to the presence of the [2-2]-[2-2] claw configuration. However, differences were observed in the pt index values (ratio of a character's length to the buccal tube length) at the insertion point of the support stylet, which exceeded 73 μ m (ranging from 75.18 to 93.14 μ m), and in the buccal tube length, which was greater than 23 μ m (ranging from 30.54-49.09 μ m).

Based on the description provided for *M. cassandrae* (Moreno-Talamantes et al., 2019), the collected specimens match the [2-2]-[2-2] claw configuration in juveniles and the [2-3] [3-2] configuration in adults, as well as the reticular pattern of the dorsal cuticle (Figure 3).

Another species morphologically similar to this taxon, is *Milnesium katarzynae* Kaczmarek, Michalczyk & Beasley, 2004. However, *M. katarzynae* was described in China, while *M. cassandrae* is a native species from Mexico (Morek et al., 2022).

De acuerdo con la clave para el grupo *granulatum*, los especímenes son cercanos a *Milnesium cassandrae* Moreno-Talamantes, Roszkowska, García-Aranda, Flores-Maldonado & Kaczmarek, 2019, por la presencia de la configuración de garras [2-2]-[2-2]; sin embargo, se encontraron diferencias en el rango de valores del índice pt (proporción de la longitud de un carácter con la longitud del tubo bucal) del punto de inserción del estilete de soporte, el cual fue superior a 73 μ m (75.18-93.14 μ m), y en la longitud del tubo bucal que fue superior a 23 μ m (30.54-49.09 μ m).

Con base en la descripción provista para *M. cassandrae* (Moreno-Talamantes et al., 2019), los especímenes recolectados coinciden con la configuración de garras [2-2]-[2-2] en individuos juveniles y [2-3] [3-2] en adultos, así como con el arreglo reticular de la cutícula dorsal (Figura 3).

Otra especie cercana a los especímenes es *Milnesium katarzynae* Kaczmarek, Michalczyk & Beasley, 2004; sin embargo, esta es una especie descrita en China, mientras que *M. cassandrae* es una especie mexicana (Morek et al., 2022).

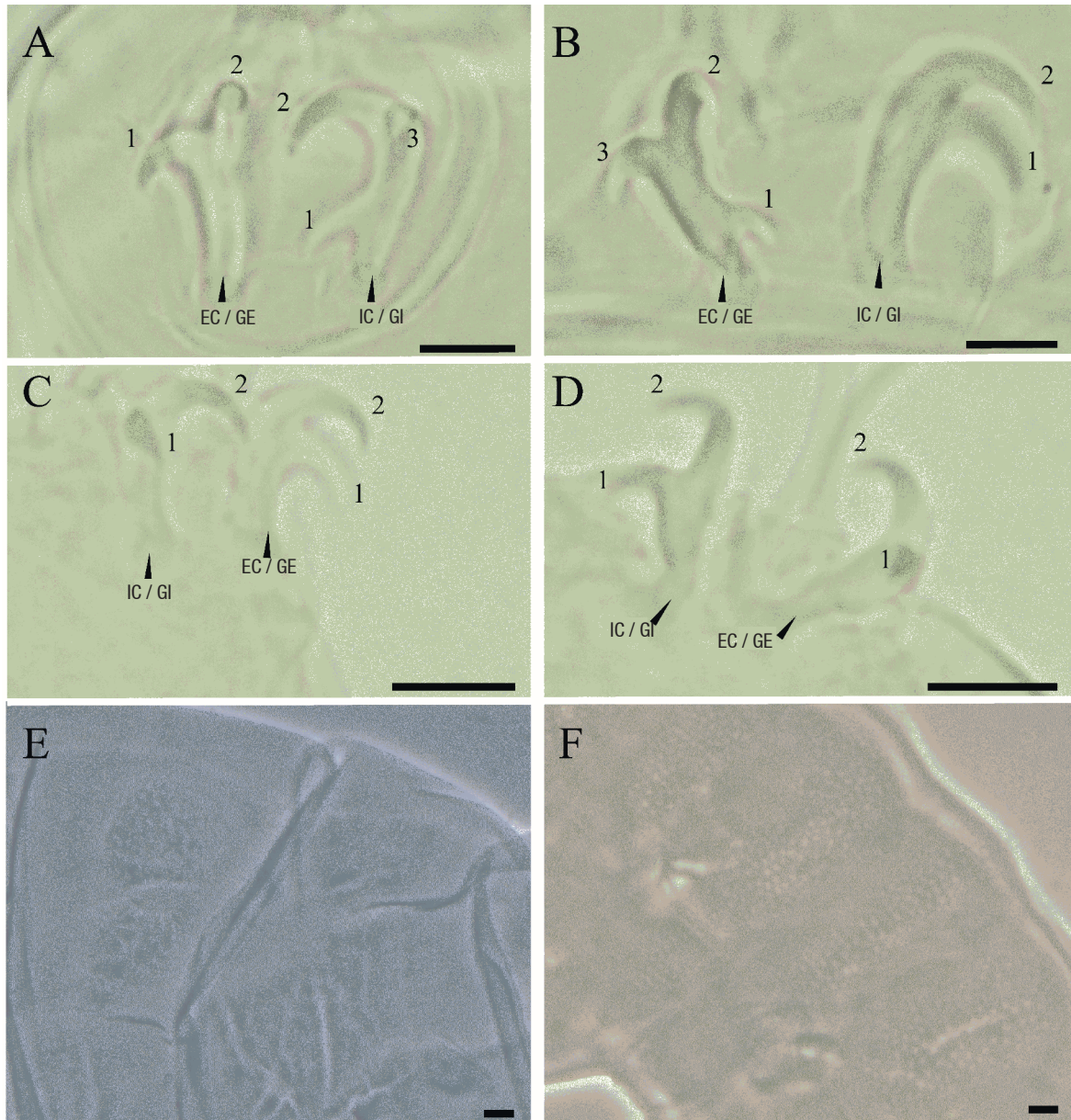


Figure 3. Diagnostic characters of the collected specimens of *Milnesium cf. cassandrae* A) Claw configuration [2-3] on leg III and B) claw configuration [3-2] on leg VI in adult specimens. C) Claw configuration [2-2] on leg II and D) Claw configuration [2-2] on leg VI in juvenile specimens. E) Reticular pattern of the dorsal cuticle in adult specimens and F) in juveniles. Internal claw (IC), external claw (EC). Scale = 20 μ m.

Figura 3. Caracteres diagn3sticos de los espec3menes recolectados de *Milnesium cf. cassandrae*. A) Configuraci3n de garras [2-3] de la pata III y B) configuraci3n de garras [3-2] de la pata VI en espec3menes adultos. C) Configuraci3n de garras [2-2] de la pata II y D) configuraci3n de garras [2-2] de la pata VI en espec3menes juveniles. E) Dise1o reticular de la cut3cula dorsal en espec3menes adultos y F) juveniles. Garra interna (GI), Garra externa (GE). Escala = 20 μ m.

Ramazzottius cf. baumanni

This species belongs to the genus *Ramazzottius* Binda & Pilato, 1986. A total of 11 adult specimens and five eggs were examined, collected from an intensive citrus plantation. The animals exhibited a sculpted dorsal cuticle similar to that of *Ramazzottius baumanni* (Ramazzotti, 1962) (Figure 4A). However, the eggs of this species remain unknown. In this study, eggs were

Ramazzottius cf. baumanni

La especie corresponde al g3nero *Ramazzottius* Binda & Pilato, 1986. Se examinaron 11 ejemplares de adultos y cinco huevos recolectados en un cultivo intensivo de c3tricos. Los animales mostraron la cut3cula dorsal esculpida similar a *Ramazzottius baumanni* (Ramazzotti, 1962) (Figura 4A); sin embargo, en esta especie los huevos son desconocidos. En el presente estudio se

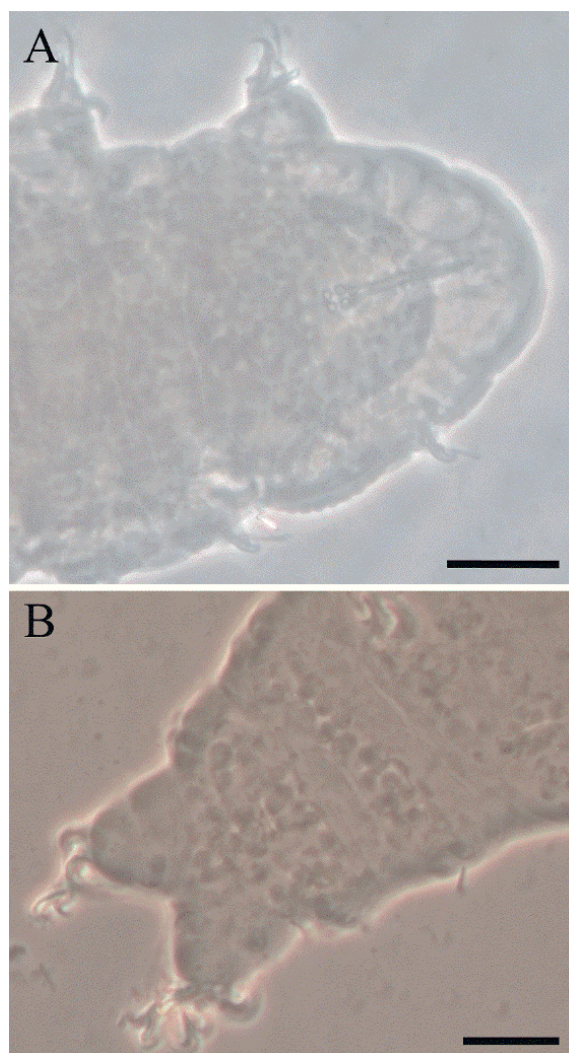


Figure 4 A) Sculpted cuticle of specimens identified as *Ramazzottius* cf. *baumanni* B) Gibbosities of the dorsal cuticle of specimens identified as *Macrobiotus* cf. *semmelweisi*. Scale = 20 μ m.

Figura 4. A) Cutícula esculpida de los especímenes identificados como *Ramazzottius* cf. *baumanni*, B) gibbosidades de la cutícula dorsal de los especímenes identificados como *Macrobiotus* cf. *semmelweisi*. Escala = 20 μ m.

collected, but an extensive comparison with other species of the genus is necessary to determine whether it represents a new species.

Macrobiotus C. A. S. Schultze 1834

Macrobiotus alvaroi Pilato and Kaczmarek, 2007. A total of 194 adult specimens and 15 eggs were examined, collected from an extensive citrus plantation. This species belongs to the *polyopus* species complex (Marcus, 1928) of the genus *Macrobiotus*. The specimens collected share morphological similarities with *M. alvaroi* and *Macrobiotus ocotensis* Pilato, 2006.

The morphology of the processes in the collected eggs matched the descriptions of *M. alvaroi*, which features a hexagonal prism-shaped basal portion,

recolectaron huevos, pero se necesita una comparación exhaustiva con las otras especies del género para determinar si se trata de una especie nueva.

Macrobiotus C. A. S. Schultze 1834

Macrobiotus alvaroi Pilato and Kaczmarek, 2007. Se examinaron 194 especímenes adultos y 15 huevos recolectados en un cultivo extensivo de cítricos. La especie pertenece al complejo de especies *polyopus* Marcus, 1928, del género *Macrobiotus*; las más cercanas en morfología a los especímenes recolectados son *M. alvaroi* y *Macrobiotus ocotensis* Pilato, 2006.

La morfología de los procesos en los huevos recolectados correspondió a los descritos para *M. alvaroi*, el cual tiene una porción basal en forma de

a conical distal portion with an apex, and egg walls with a regular reticular design composed of hexagonal meshes (Pilato & Kaczmarek, 2007). Additionally, the buccal apparatus morphometry observed in both embryonated eggs and adult specimens corresponds to that of *M. alvaroi*, including the thickening at the end of the buccal tube, where the pharyngeal apophyses are connected (Figure 5).

The most significant differences between *M. alvaroi* and *M. ocotensis* are the shape of the egg processes and the buccal tube. The egg processes have a hexagonal prism-shaped basal portion, a conical distal portion with an apical tip, and a shell with a regular reticular design composed of hexagonal meshes (typical of *M. alvaroi*). The buccal tube shows thickening. These characteristics, typical of *M. alvaroi*, were observed in the examined specimens (Figure 6A).

Macrobiotus cf. polyopus. A total of 992 adult tardigrades and 43 eggs were examined, collected from an extensive citrus plantation and an evergreen forest fragment. The morphology of both the tardigrades and the examined eggs is characteristic of the *Macrobiotus polyopus* group (Figure 6B). However, the shape of the egg processes differs from all known species of the group, requiring a detailed review to determine whether it represents a new species.

prisma hexagonal, una porción distal cónica con un ápice y paredes del huevo con un diseño reticular regular con mallas hexagonales (Pilato & Kaczmarek, 2007). Además, la morfometría del aparato bucal observada en los huevos embrionados y en animales es similar a dicha especie, tal como el engrosamiento en el extremo del tubo bucal, al cual se conectan las apófisis faríngeas (Figura 5).

Las diferencias más importantes entre *M. alvaroi* y *M. ocotensis* son la forma de los procesos del huevo y el tubo bucal. Los procesos del huevo tienen una porción basal en forma de prisma hexagonal, una porción distal cónica con una apical y cascarón con un diseño reticular regular con mallas hexagonales (típico de *M. alvaroi*). El tubo bucal presenta engrosamiento. Dichos caracteres presentes en *M. alvaroi* se observaron en los ejemplares (Figura 6A).

Macrobiotus cf. polyopus. Se examinaron 992 tardígrados adultos y 43 huevos recolectados en un cultivo extensivo de cítricos y un fragmento de selva mediana subperennifolia. La morfología de los tardígrados y los huevos examinados son característicos de *Macrobiotus* grupo *polyopus* (Figura 6B). No obstante, la forma de los procesos de los huevos difiere de todas las especies del grupo; por tanto, es necesaria una revisión exhaustiva para determinar si se trata de una nueva especie.

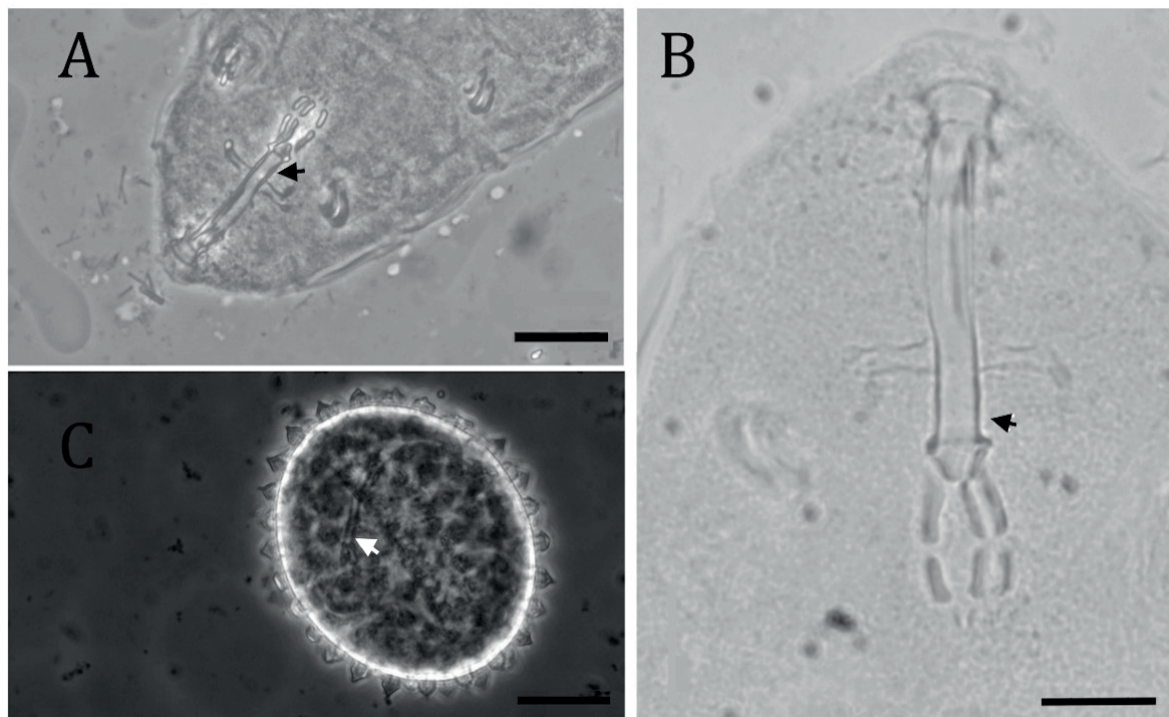


Figure 5. Buccal apparatus (A and B) and embryonated egg (C) of specimens identified as *Macrobiotus alvaroi*. Arrows indicate thickening at the end of the buccal tube. Scale = 20 μ m.

Figura 5. Aparato bucal (A y B) y huevo embrionado (C) de los especímenes identificados como *Macrobiotus alvaroi*. Las flechas señalan el engrosamiento en el extremo del tubo bucal. Escala 20 μ m.

Macrobotus cf. ocotensis. A single egg was examined, collected from an extensive citrus plantation. The egg diameter (excluding the processes) and the shape of the processes were similar to those documented for *M. ocotensis* (60 μm without processes and 80 μm with processes) (Figure 6C). However, the number of processes was lower than in *M. ocotensis*, with 20 processes along the circumference and 54 processes in a single hemisphere.

Macrobotus sp. 1. A total of 899 adult individuals and four eggs were examined, collected from an intensive citrus plantation. The specimens exhibited claws, a buccal apparatus, and eggs characteristic of the *hufelandi* group. The buccal tube was wider than that documented in the other species in this study. The eggs were not embryonated (Figure 6D), making it difficult to associate them with the adult specimens and, consequently, preventing their identification.

Macrobotus cf. semmelweisi. A total of 468 adults and nine eggs were examined, collected from an extensive citrus plantation. According to the identification key for the *Macrobotus hufelandi* group (Kaczmarek & Michalczyk, 2017), the examined tardigrades belong to the *Macrobotus* group with protuberances (Figure 4), which were similar to those documented for *M. semmelweisi*. However, the eggs differed in morphology from those described for this species (Figure 6F). Therefore, a thorough review is necessary to determine whether they represent a new species and to provide a formal description.

Minibiotus cf. intermedius

This species belongs to the genus *Minibiotus* R. O. Schuster, 1980 (Table 1). A total of 92 tardigrades and 10 eggs were examined, collected from an extensive citrus plantation. Although the observed set of characteristics in both the tardigrades and eggs corresponds to the description of *M. intermedius* (Plate, 1888) (Claxton, 1998; Figure 6E), it cannot be confirmed as this species. This uncertainty arises because Kaczmarek et al. (2016) classified records of *M. intermedius* in North America as doubtful.

Mesobiotus cf. pseudopatiens

This species belongs to the genus *Mesobiotus* Vecchi, Cesari, Bertolani, Jönsson, Rebecchi & Guidetti, 2016 (Table 1). A total of 485 individuals and 25 eggs were examined, collected from both extensive and intensive citrus plantations and an evergreen forest fragment.

Based on the identification key for *Mesobiotus* species by Kaczmarek et al. (2020), the specimens are close to *Mesobiotus wuzhishanensis* (Yin, L. Wang & X. Li, 2011) and

Macrobotus cf. ocotensis. Se examinó un huevo recolectado en un cultivo extensivo de cítricos. El diámetro del huevo (sin los procesos) y la forma de los procesos fueron similares a los documentados para *M. ocotensis* (60 μm sin procesos y 80 μm con procesos) (Figura 6C); sin embargo, el número de procesos, tanto en su circunferencia (20 procesos) como en un hemisferio (54 procesos), fue menor que en *M. ocotensis*.

Macrobotus sp. 1. Se examinaron 899 individuos adultos y cuatro huevos recolectados en un cultivo intensivo de cítricos. Los ejemplares presentaron garras, aparato bucal y huevos del grupo *hufelandi*. El tubo bucal fue más amplio que el documentado en las otras especies en este estudio. Los huevos no estaban embrionados (Figura 6D), por lo que fue difícil asociarlos con los animales y, por consiguiente, no permitieron la identificación.

Macrobotus cf. semmelweisi. Se examinaron 468 adultos y nueve huevos recolectados en un cultivo extensivo de cítricos. De acuerdo con la clave del grupo *Macrobotus hufelandi* (Kaczmarek & Michalczyk, 2017), los tardígrados examinados pertenecen al grupo *Macrobotus* con gibosidades (Figura 4), mismas que fueron similares a las documentadas para *M. semmelweisi*. No obstante, los huevos difieren de la morfología documentada en dicha especie (Figura 6F); por lo tanto, es necesaria una revisión exhaustiva para determinar si se trata de una nueva especie y así proporcionar su descripción formal.

Minibiotus cf. intermedius

La especie pertenece al género *Minibiotus* R. O. Schuster, 1980 (Cuadro 1). Se examinaron 92 tardígrados y 10 huevos recolectados en un cultivo extensivo de cítricos. A pesar de que el conjunto de caracteres observados en los tardígrados y huevos corresponden a la descripción de *M. intermedius* (Plate, 1888) (Claxton, 1998; Figura 6E), no se puede asegurar que corresponde a esta especie, debido a que Kaczmarek et al. (2016) catalogaron como dudosos los registros de esta especie en Norteamérica.

Mesobiotus cf. pseudopatiens

La especie corresponde al género *Mesobiotus* Vecchi, Cesari, Bertolani, Jönsson, Rebecchi & Guidetti, 2016 (Cuadro 1). Se examinaron 485 animales y 25 huevos recolectados en cultivos de cítricos (extensivo e intensivo) y en un fragmento de selva mediana subperennifolia.

Con base en la clave de especies de *Mesobiotus* de Kaczmarek et al. (2020), los especímenes resultan cercanos a *Mesobiotus wuzhishanensis* (Yin, L. Wang & X. Li, 2011) y *Mesobiotus pseudopatiens* Kaczmarek &

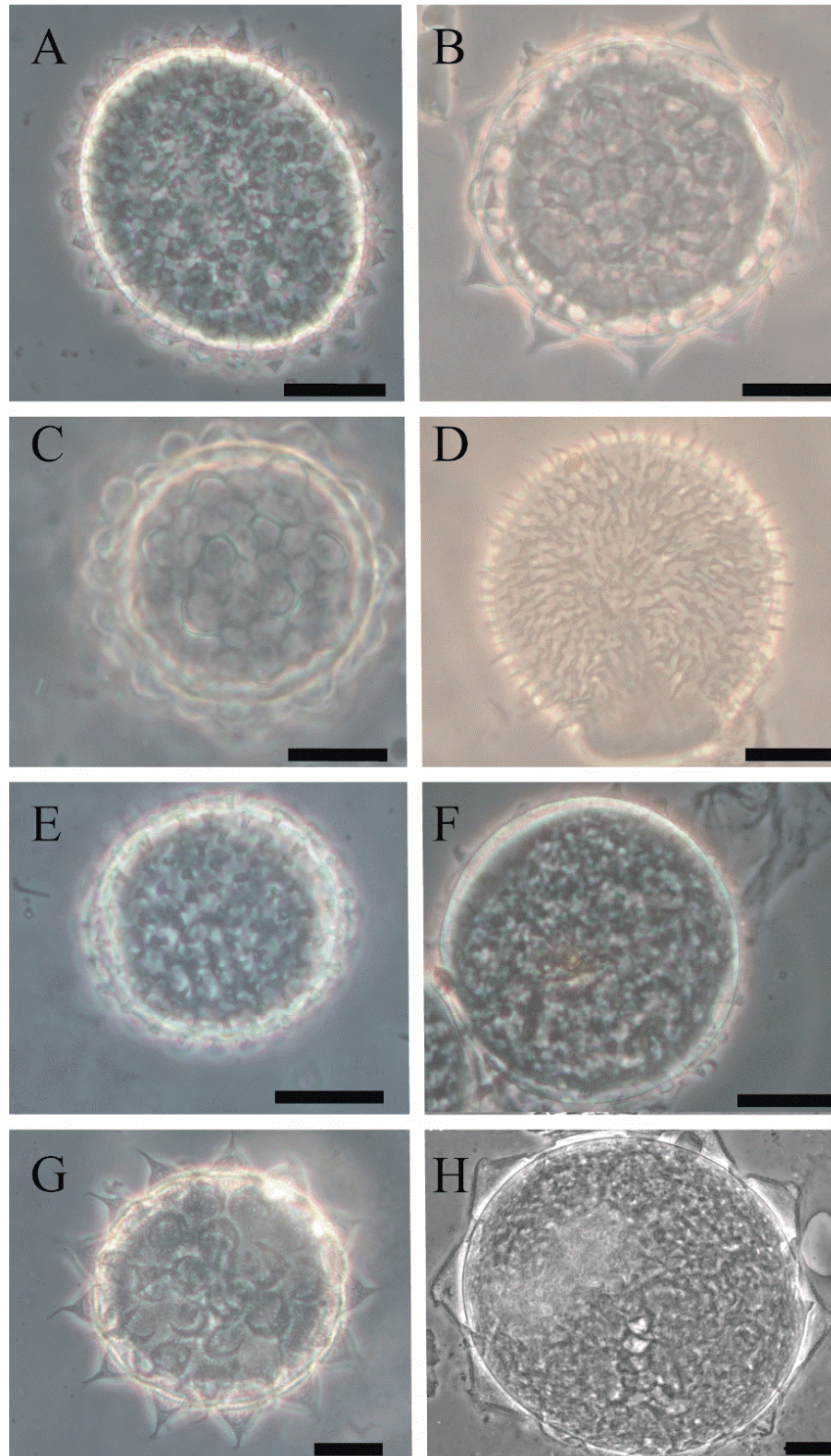


Figure 6. Eggs of the taxa identified during the study. A) *Macrobiotus savai*, B) *Macrobiotus cf. polyopus*, C) *Macrobiotus cf. ocotensis*, D) *Macrobiotus sp.* (*hufelandi* group), E) *Minibiotus cf. intermedius*, F) *Macrobiotus cf. semmelweisi*, G) *Mesobiotus cf. pseudopatiens*, H) *Paramacrobiotus cf. savai*. Scale 20 μ m.

Figura 6. Huevos de los taxones identificados durante el estudio. A) *Macrobiotus savai*, B) *Macrobiotus cf. polyopus*, C) *Macrobiotus cf. ocotensis*, D) *Macrobiotus sp.* (grupo *hufelandi*), E) *Minibiotus cf. intermedius*, F) *Macrobiotus cf. semmelweisi*, G) *Mesobiotus cf. pseudopatiens*, H) *Paramacrobiotus cf. savai*. Escala 20 μ m.

Table 1. Updated list of limno-terrestrial tardigrades in Quintana Roo and biotopes (moss *Aulacopilum* sp., Lichen *Parmotrema* sp., and Mangrove *Rhizophora mangle*).

Cuadro 1. Listado actualizado de tardígrados limnoterrestres en Quintana Roo y los biotopos donde se han colectado (musgo *Aulacopilum* sp., líquen *Parmotrema* sp. y mangle *Rhizophora mangle*).

Taxa/ Taxones	Record/ Registro	Microecosystem/ Microecosistema	Source/ Fuente
Class / Clase: Heterotardigrada Marcus, 1927	<i>Echiniscus</i> sp.1	Soil in urban area/ Suelo en zona urbana	Pérez Pech et al. (2016, 2017)
Order / Orden: Echiniscoidea Richters, 1926	<i>Kristenseniscus kofordi</i>	Lichen and moss/ Liquen y musgo	Cutz-Pool et al. (2019); this study / presente estudio
Family / Familia: Echiniscidae Thulin, 1928	(Schuster & Grigarick, 1966)		
Class / Clase: Eutardigrada Richters, 1926	<i>Milnesium</i> sp. 1	Lichen/ Liquen	Anguas-Escalante et al. (2018)
Order / Orden: Apochela Schuster, Nelson, Grigarick & Christenberry, 1980	<i>Milnesium</i> cf. <i>cassandrae</i>	Lichen, mossy and mangle/ Liquen, musgo y mangle	Anguas-Escalante et al. (2018); Cutz-Pool et al. (2019); this study / presente estudio
Family / Familia: Milnesiidae Ramazzotti, 1962			
Class / Clase: Eutardigrada Richters, 1926	<i>Doryphoribius chetumalensis</i>	Soil in urban area/ Suelo en zona urbana	Pérez Pech et al. (2016, 2017)
Order / Orden: Apochela Schuster, Nelson, Grigarick & Christenberry, 1980	Pérez-Pech, Anguas-Escalante, Cutz-Pool & Guidetti, 2017		
Family / Familia: Doryphoribiidae Gąsiorek, Stec, Morek & Michalczyk, 2019			
Class / Clase: Eutardigrada Richters, 1926	<i>Ramazzottius</i> cf. <i>baumanni</i>	Lichen/ Liquen	Anguas-Escalante et al. (2018)
Order / Orden: Parachela Schuster, Nelson, Grigarick, Christenberry, 1980			
Family / Familia: Ramazzottiidae Sands, McInnes, Marley, Goodall-Copestake, Convey & Linse, 2008			
Class / Clase: Eutardigrada Richters, 1926	<i>Macrobiotus</i> cf. <i>semmelweisi</i>	Moss and lichen/ Musgo y líquen	Cutz-Pool et al. (2019); this study / presente estudio
Order / Orden: Apochela Schuster, Nelson, Grigarick & Christenberry, 1980	<i>Macrobiotus</i> cf. <i>polyopus</i>	Moss and lichen/ Musgo y líquen	Cutz-Pool et al. (2019); this study / presente estudio
Family / Familia: Macrobiotidae Thulin, 1928	<i>Macrobiotus</i> sp. 1	Moss and lichen/ Musgo y líquen	Cutz-Pool et al. (2019); this study / presente estudio
	<i>Macrobiotus alvaroi</i> Pilato & Kaczmarek 2007	Moss and lichen/ Musgo y líquen	Cutz-Pool et al. (2019); this study / presente estudio
	<i>Macrobiotus</i> cf. <i>ocotensis</i>	Lichen / Liquen	Cutz-Pool et al. (2019)
	<i>Mesobiotus</i> cf. <i>pseudopatiens</i>	Moss and lichen/ Musgo y líquen	Anguas-Escalante et al. (2018), Cutz-Pool et al (2019), this study / presente estudio
	<i>Minibiotus</i> cf. <i>intermedius</i>	Moss and lichen/ Musgo y líquen	Cutz-Pool et al. (2019); this study / presente estudio
	<i>Paramacrobiotus</i> cf. <i>savai</i>	Moss and lichen/ Musgo y líquen	Cutz-Pool et al. (2019); this study / presente estudio

Mesobiotus pseudopatiens Kaczmarek & Roszkowska, 2016. However, the former species is tooth-shaped in posterior lunules, while *M. pseudopatiens* has eyes and smooth lunules. Additionally, the egg morphology closely resembles *M. pseudopatiens*, a species described in Costa Rica (Figure 6G). For this reason, the specimens are more appropriately designated as *Mesobiotus* cf. *pseudopatiens*.

Roszkowska, 2016; sin embargo, el primero tiene dientes en las lúnulas posteriores y *M. pseudopatiens* tiene ojos y lúnulas lisas. Por otro lado, la morfología de los huevos se asemeja a *M. pseudopatiens* que fue descrita en Costa Rica (Figura 6G). Por esta razón, es más pertinente nombrar a la especie como *Mesobiotus* cf. *pseudopatiens*.

Paramacrobiotus cf. savai

The genus is *Paramacrobiotus* Guidetti, Schill, Bertolani, Dandekar & Wolf, 2009 (Table 1). A total of 66 individuals and four eggs were examined, collected from an evergreen forest fragment.

According to the taxonomic key for *Paramacrobiotus* (Kaczmarek et al., 2017; Kayastha et al., 2023), the species closest to the collected specimens is *P. savai* (Binda & Pilato, 2001). However, these specimens differ in the smaller egg diameter without processes (90 µm in *P. savai* and 76.4–77.2 µm in the specimens) and the shape and size of the egg processes (12–18 µm in height in *P. savai* and 5.8–13.41 µm in the study specimens) (Figure 6H).

Ecology

A total of 4 725 tardigrades and 118 eggs, corresponding to nine species were collected from citrus plantations and an evergreen forest fragment (Tables 2 and 3). In the citrus plantation, moss and lichen were collected from the 12 selected trees during both sampling seasons. In the forest fragment, moss was collected from five trees (41 %) and lichen from four trees (33 %) in February 2018, while in September 2018, moss was collected from four trees (33 %) and lichen from six trees (50 %). For both sampled areas, the pH ranged from 5.09 to 6.80 in moss and from 4.04 to 7.36 in lichen (Table 2), the humidity ranged from 53 % to 94 %, and the temperature ranged from 26.50 °C to 36.0 °C.

Nine species were recorded in both environments (citrus plantation and forest fragment) during the study. When this number was compared with the Chao1 estimator (nine species), it was determined that the sampling effort was sufficient to document all the species present in both ecosystems (Figure 7). In terms of species richness and diversity, differences were observed between the sampled areas (Tables 2 and 3), with the citrus plantation showing the highest richness and Shannon-Wiener diversity in both sampling intervals.

When the Shannon-Wiener diversity was compared between moss and lichen, in February 2018, there was no significant difference ($P > 0.05$). However, in September 2018, a significant difference was found ($P = 0.03 < 0.05$) in the citrus plantation (Table 3). On the other hand, tardigrade diversity showed variation between the study months ($P < 0.05$).

MDS estimated showed that diversity tended to increase toward the citrus crop during both sampling campaigns and was positively correlated with lower pH values (Figure 8A; Table 4). In September 2018, a better

Paramacrobiotus cf. savai

El género es *Paramacrobiotus* Guidetti, Schill, Bertolani, Dandekar & Wolf, 2009 (Cuadro 1). Se examinaron 66 individuos y cuatro huevos recolectados en un fragmento de selva mediana subperennifolia.

De acuerdo con la clave taxonómica de *Paramacrobiotus* (Kaczmarek et al., 2017; Kayastha et al., 2023), la especie más cercana a los especímenes colectados es *P. savai* (Binda & Pilato, 2001). No obstante, estos se diferencian por el menor diámetro de huevo sin procesos (90 µm en *P. savai* y 76.4–77.2 µm en los especímenes) y la forma y tamaño de los procesos de los huevos (12–18 µm de altura en *P. savai* y 5.8–13.41 µm en los especímenes de estudio) (Figura 6H).

Ecología

Se recolectaron 4 725 tardígrados y 118 huevos que corresponden a nueve especies provenientes de cultivo de cítricos y de un fragmento de selva media subperennifolia (Cuadros 2 y 3). En el cultivo de cítricos, durante las dos temporadas de muestreos se recolectó musgo y líquen en los 12 árboles seleccionados. En el fragmento de selva, en febrero de 2018, se recolectó musgo en cinco árboles (41 %) y líquen en cuatro árboles (33 %), mientras que en septiembre de 2018 se recolectó musgo en cuatro árboles (33 %) y líquen en seis (50 %). Para ambas áreas muestreadas, el pH varió entre 5.09 a 6.80 en musgo y 4.04 y 7.36 en líquen (Cuadro 2), la humedad osciló entre 53 % al 94 % y la temperatura entre 26.50 °C a 36.0 °C.

Durante el estudio se registraron nueve especies en los dos ambientes (cultivo de cítricos y fragmento de selva). Al comparar dicho número con el obtenido mediante el estimador Chao1 (nueve especies), se determinó que el esfuerzo de muestreo fue el adecuado para documentar el total de especies presentes en ambos ecosistemas (Figura 7). En cuanto a la riqueza y diversidad, se observa variación entre las áreas muestreadas (Cuadros 2 y 3); la mayor riqueza y diversidad de Shannon-Wiener se encontró en el cultivo de cítricos, en ambas campañas de muestreo.

Cuando se comparó la diversidad de Shannon-Wiener entre musgos y líquenes, se observó que en febrero de 2018 fue similar ($P > 0.05$), pero sí hubo diferencias significativas ($P = 0.03 < 0.05$) en septiembre de 2018 (cultivo de cítricos, Cuadro 3). Por otro lado, la diversidad de tardígrados mostró variación entre los meses de estudio ($P < 0.05$).

El MDS calculado mostró que la diversidad tendió a aumentar hacia el cultivo de cítricos durante las dos campañas de muestreo y esta se correlacionó positivamente con los valores más bajos del pH (Figura 8A;

Cuadro 2. Parámetros de diversidad de tardígrados limnoterrestres recolectados en febrero de 2018 en un área de cultivo de cítricos y un fragmento de selva en Quintana Roo.

Table 2. Diversity parameters of limno-terrestrial tardigrades collected in February 2018 in a citrus plantation and forest fragment in Quintana Roo.

Species/Especies	Citrus plantation/ Cultivo de cítricos		Forest fragment/ Fragmento de selva	
	Moss/Musgo	Lichen/Liquen	Moss/Musgo	Lichen/Liquen
<i>Macrobiotus</i> cf. <i>semmelweisi</i>	32	109	0	0
<i>Macrobiotus</i> grupo <i>hufelandi</i>	317	59	0	0
<i>Macrobiotus</i> cf. <i>polyopus</i>	524	28	0	2
<i>Macrobiotus</i> <i>alvaroi</i>	102	30	0	0
<i>Paramacrobiotus</i> cf. <i>savai</i>	0	0	4	0
<i>Mesobiotus</i> cf. <i>pseudopatiens</i>	76	51	0	10
<i>Minibiotus</i> <i>intermedius</i>	82	4	0	0
<i>Milnesium</i> cf. <i>cassandrae</i>	341	142	1	23
<i>Kristenseniscus</i> <i>kofordi</i>	212	11	0	0
Abundance/Abundancia	1 686	434	5	41
Richness/Riqueza	8	8	2	3
Número de muestras	12	12	5	5
Diversidad de Shannon-Wiener (H')/ Shannon-Wiener diversity (H')	1.79	1.73	0.50	0.79
P value (t-test)/P valor (prueba t)	0.07	0.27		

Table 3. Diversity parameters of limno-terrestrial tardigrades collected in September 2018 in a citrus plantation and forest fragment in Quintana Roo.

Cuadro 3. Parámetros de diversidad de tardígrados limnoterrestres recolectados en septiembre de 2018 en un área de cultivo de cítricos y un fragmento de selva en Quintana Roo.

Species	Citrus plantation		Forest fragment	
	Moss	Lichen	Moss	Lichen
<i>Macrobiotus</i> cf. <i>semmelweisi</i>	63	264	0	0
<i>Macrobiotus</i> grupo <i>hufelandi</i>	264	259	0	0
<i>Macrobiotus</i> cf. <i>polyopus</i>	331	107	0	0
<i>Macrobiotus</i> <i>alvaroi</i>	36	28	0	0
<i>Paramacrobiotus</i> cf. <i>savai</i>	0	0	1	61
<i>Mesobiotus</i> cf. <i>pseudopatiens</i>	98	209	1	29
<i>Minibiotus</i> <i>intermedius</i>	0	6	0	0
<i>Milnesium</i> cf. <i>cassandrae</i>	290	161	2	3
<i>Kristenseniscus</i> <i>kofordi</i>	265	81	0	0
Richness/Riqueza	1 347	1 115	4	93
Número de muestras	12	12	4	6
Diversidad de Shannon-Wiener (H')/ Shannon-Wiener diversity (H')	7	8	3	3
P value (t-test)/P valor (prueba t)	1.74	1.81	1.04	0.75
P value (t-test)	0.03	0.88		

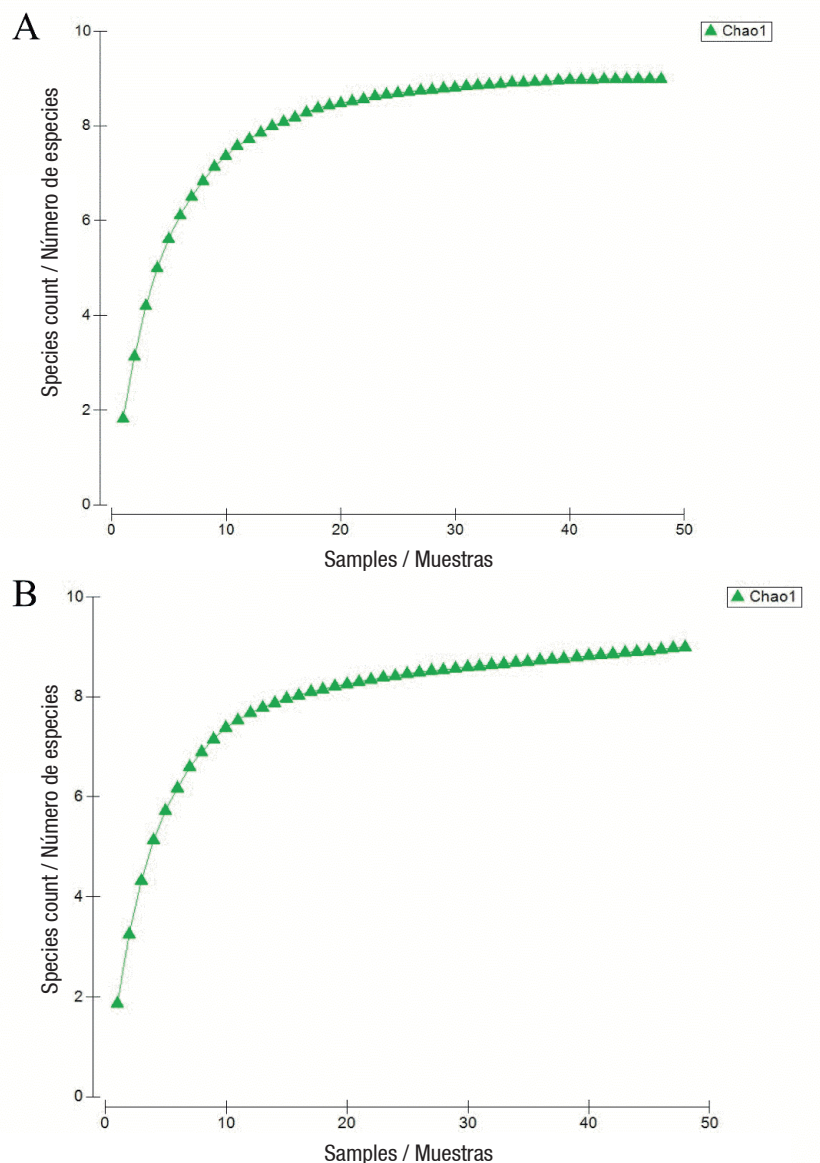


Figure 7. Accumulation curve of limno-terrestrial tardigrades species in Quintana Roo from two sampling dates: A) February 2018 and B) September 2018.

Figura 7. Curva de acumulación de especies de tardígrados limnoterrestres en Quintana Roo en dos fechas de muestreo: A) febrero de 2018 y B) septiembre de 2018.

stratification was observed regarding the similarity of diversity among the collection sites, which was related to the type of ecosystem (citrus plantation and forest fragment; Figure 8B).

Discussion

Currently, the cosmopolitan distribution of certain Tardigrada species is considered questionable (Gąsiorek, 2023; Kaczmarek et al., 2016; Morek et al., 2021); indeed, Mogle et al. (2018) proposed that, in the Americas, the distribution of limno-terrestrial tardigrades over large distances may be mediated by migratory birds. Gąsiorek (2023) established that the hypothesis “everything

Cuadro 4). En septiembre de 2018 se observó una mejor estratificación en cuanto a la similitud de la diversidad entre los sitios de colecta, la cual estuvo relacionada con el tipo de ecosistema (cultivo de cítricos y fragmento de selva; Figura 8B).

Discusión

Actualmente, la distribución cosmopolita de determinadas especies de Tardigrada se considera dudosa (Gąsiorek, 2023; Kaczmarek et al., 2016; Morek et al., 2021); inclusive, cuando Mogle et al. (2018) propusieron que, en América, la distribución de tardígrados limnoterrestres a grandes distancias

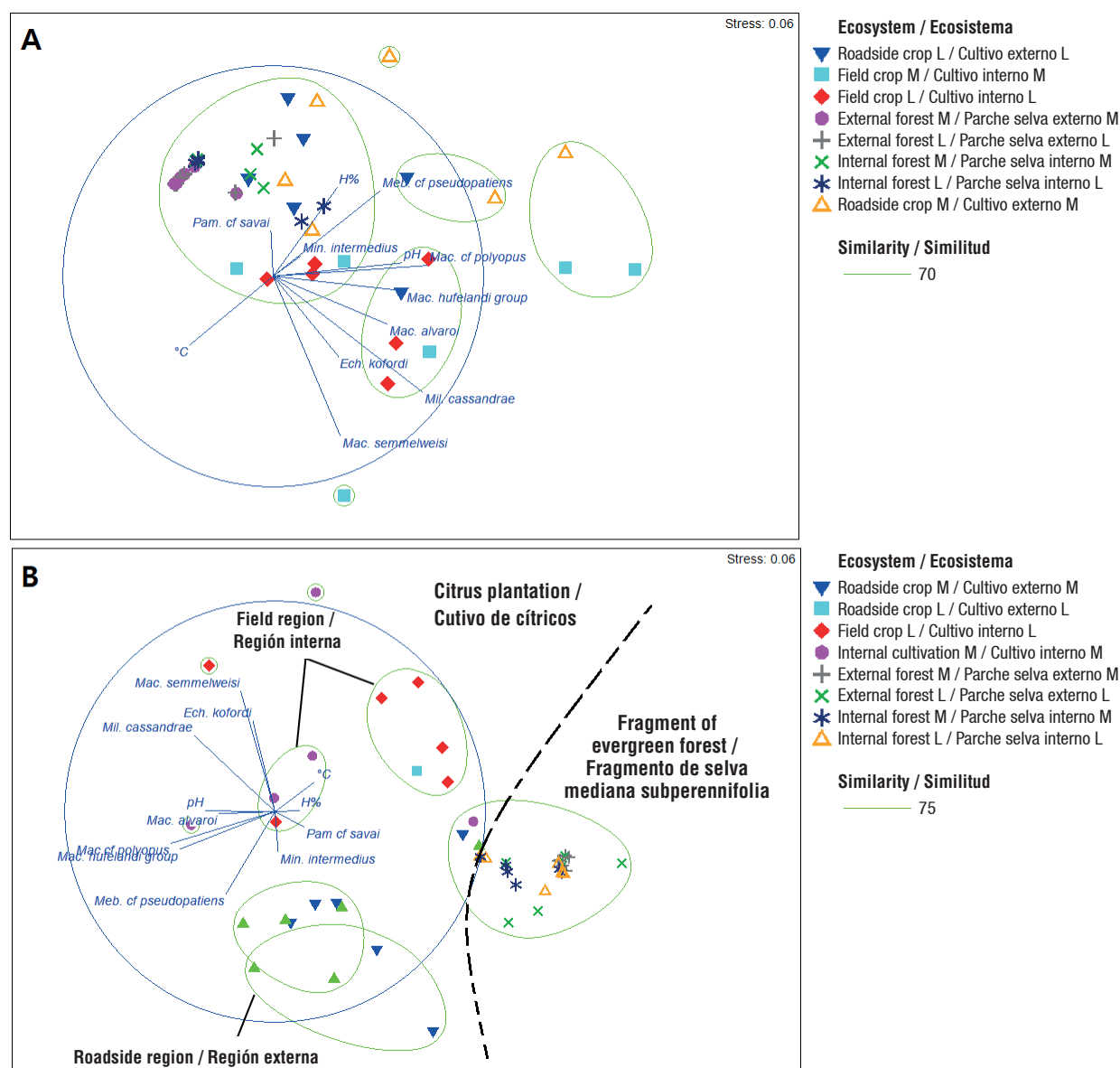


Figure 8. Multidimensional scaling analysis of pH, temperature, humidity, richness, microhabitat, and sampled environments for the collection of limno-terrestrial tardigrades on two dates: A) February 2018, B) September 2018. M: moss, L: lichen. External cultivation refers to the crop area adjacent to the unpaved road, while internal cultivation refers to the area located at the center of the cultivation site.

Figura 8. Análisis de escalamiento multidimensional entre el pH, temperatura, humedad, riqueza, microhábitat y ambientes muestreados para la recolección de tardígrados limnoterrestres en dos fechas: A) febrero de 2018, B) septiembre de 2018. M: musgo y L: líquen. Cultivo externo se refiere a la zona del cultivo adyacente al camino de terracería y cultivo interno es la zona ubicada en el centro del área de cultivo.

is everywhere, but the environment selects” as a starting point for the biogeography of limno-terrestrial tardigrades has come to an end and has been replaced by a regional diversity approach.

Tardigrades are a poorly studied phylum worldwide. The number of species and the rate of their description is limited, which is reflected in the diversity estimates of the group, classifying it as species-poor (Bartels et

puede ser mediada por aves migratorias. Gąsiorek (2023) estableció que la hipótesis “todo está en todas partes, pero el medio ambiente selecciona”, como punto de partida para la biogeografía de tardígrados limnoterrestres, ha llegado a su fin y ha sido reemplazada por un enfoque regional de la diversidad.

Tardígrada es un filo poco estudiado a nivel mundial. El número de especies y la velocidad de su descripción

Table 4. Parameters measured in the sampled areas (citrus plantation and evergreen forest fragment) for the collection of limno-terrestrial tardigrades in Quintana Roo.

Cuadro 4. Parámetros medidos en las áreas muestreadas (cultivo de cítricos y fragmento de selva perennifolia) para la recolección de tardígrados limnoterrestres en Quintana Roo.

Parameter/ Parámetro	Strata /Sustrato	February 2018 / Febrero 2018				September 2018 / Septiembre 2018			
		Minimum/ Mínimo	Maximum/ Máximo	Mean/ Media	SD	Minimum/ Mínimo	Maximum/ Máximo	Mean/ Media	SD
pH	Moss - citrus/ Musgo - cítricos	5.09	5.90	5.49	0.28	5.34	6.36	5.71	0.32
	Moss - forest/ Musgo - selva	5.80	6.38	6.04	0.24	6.03	6.80	6.39	0.33
	Lichen - citrus/ Liquen - cítricos	4.04	5.30	4.93	0.34	4.89	6.36	5.27	0.38
	Lichen - forest/ Liquen - selva	5.10	6.79	6.14	0.70	5.62	7.36	6.34	0.68
Humedy (%)	Moss - citrus/ Musgo - cítricos	53.00	94.00	71.33	14.24	57.00	76.00	69.83	5.47
	Moss - forest/ Musgo - selva	57.00	76.00	67.92	7.27	64.00	90.00	77.08	8.39
	Lichen - citrus/ Liquen - cítricos	53.00	94.00	71.33	14.24	57.00	76.00	69.83	5.47
	Lichen - forest/ Liquen - selva	57.00	76.00	67.73	7.27	64.00	90.00	77.08	8.39
°C	Moss - citrus/ Musgo - cítricos	26.50	32.00	29.68	2.11	28.50	34.90	31.58	2.14
	Moss - forest/ Musgo - selva	26.40	34.50	29.94	3.50	29.00	36.00	31.67	2.39
	Lichen - citrus/ Liquen - cítricos	26.50	32.00	29.68	2.11	28.50	34.90	31.58	2.14
	Lichen - forest/ Liquen - selva	26.40	34.50	29.88	3.50	29.00	36.00	31.67	2.39

SD: standard deviation of the mean
DE: desviación estándar de la media.

al., 2016). Today, the systematics of the group is based on a limited number of morphological traits for species delimitation, which is why many of these species are grouped into complexes, and their cryptic diversity is only revealed through molecular studies (Gąsiorek, 2023). In this study, 66 % of the identified taxa were found to be similar to other species (*Milnesium* cf. *cassandrae*, *Macrobiotus* cf. *polyopus*, *Macrobiotus* cf. *ocotensis*, *Macrobiotus* cf. *semmelweisi*, *Minibiotus* cf. *intermedius*, *Paramacrobiotus* cf. *savai* and *Ramazzottius* cf. *baumanni*) and were considered morphospecies (*Milnesium* sp. 1 and *Macrobiotus* sp. 1). These taxa are likely new species for science. However, integrative taxonomy methods and molecular sequences are necessary to describe them (Gąsiorek, 2023).

son limitados, lo cual, se refleja en las estimaciones de diversidad del grupo que lo clasifican como pobre en especies (Bartels et al., 2016). Hoy en día, la sistemática del grupo está basada en un número reducido de rasgos morfológicos para la delimitación de especies, por lo que muchas de estas se agrupan en complejos y su diversidad críptica es encontrada solo a través de estudios moleculares (Gąsiorek, 2023). En este trabajo, 66 % de los taxones identificados se establecieron como similares a otras especies (*Milnesium* cf. *cassandrae*, *Macrobiotus* cf. *polyopus*, *Macrobiotus* cf. *ocotensis*, *Macrobiotus* cf. *semmelweisi*, *Minibiotus* cf. *intermedius*, *Paramacrobiotus* cf. *savai* y *Ramazzottius* cf. *baumanni*) y como morfoespecies (*Milnesium* sp. 1 y *Macrobiotus* sp. 1). Es probable que estos taxones sean también nuevas especies para la

M. ocotensis was described for the state of Chiapas; however, it was not possible to confirm that our specimens belong to the same species due to the variations observed in the number of processes in the single egg collected (Pilato, 2006). In the case of *M. cassandrae*, its distribution in Quintana Roo could be assumed, as it is a Mexican species. It is distributed in northern Mexico, an area biogeographically located in the Nearctic, which has shown differentiated diversity from the Neotropics, the region where the study area of this work is located (Kaczmarek et al., 2016). Therefore, it would be premature to assert that this species is distributed in the study area. Although the genus *Milnesium* was long considered to consist of cosmopolitan species, the advent of molecular biology has cast doubt on this assumption (Gąsiorek, 2023). In 2021, Morek et al. determined that *Milnesium* has limited dispersal capabilities, and therefore its species are likely restricted to unique zoogeographical regions. In this regard, only the integration of molecular analysis into the morphological description of the collected specimens of *Macrobiotus cf. ocotensis* and *Milnesium cf. cassandrae* could confirm the presence of these species in Quintana Roo or support the description of new species for science.

On the other hand, the species *K. kofordi* and *M. alvaroi*, previously recorded in Chiapas (Dueñas-Cedillo et al., 2020; García-Román et al., 2022), represent new records for Quintana Roo, contributing to the knowledge of the distribution of these species in Mexico. The addition of the taxa documented here, along with the previous records of *Echiniscus sp.* and *D. chetumalensis*, brings the total number of species on the list of limno-terrestrial tardigrades in Quintana Roo to 14 (Pérez-Pech et al., 2016, 2017) (Table 1). Additionally, the coastal mangrove forest is added to the list of environments for these animals in the state. Previously, limno-terrestrial tardigrades had only been reported in citrus crops (Anguas-Escalante et al., 2018; Cutz-Pool et al., 2019) and accumulated sediment along the asphalt streets of the city of Chetumal (Pérez-Pech et al., 2016, 2017).

The 14 limno-terrestrial tardigrade taxa for Quintana Roo, along with the record of marine tardigrade species, bring the total to 28 species (Anguas-Escalante et al., 2020; Pérez-Pech et al., 2020). This study also provides images of the tardigrade eggs collected, which are important elements for species-level identification (Kaczmarek et al., 2017, 2020; Kaczmarek & Michalczyk, 2017; Morek et al., 2016). This information is crucial for use in future studies in the Yucatán Peninsula.

Regarding the ecology of urban and rural tardigrades, Meyer et al. (2013) suggest that environments created in the Anthropocene may support the maintenance

ciencia; sin embargo, para su descripción, es necesario implementar métodos de taxonomía integrativa y secuencias moleculares (Gąsiorek, 2023).

M. ocotensis es una especie descrita para el estado de Chiapas; sin embargo, las variaciones observadas en el número de procesos de único huevo recolectado no permiten asegurar que pertenezca a la misma (Pilato, 2006). En el caso de *M. cassandrae*, se podría suponer su probable distribución en Quintana Roo, debido a que es una especie mexicana. Esta se distribuye en el norte del México, zona que se localiza biogeográficamente en el Neártico, la cual ha mostrado diversidad diferenciada del Neotrópico, región donde se localiza el área de estudio del presente trabajo (Kaczmarek et al., 2016). Por lo tanto, sería aventurado asegurar que esta especie esté distribuida en el área de estudio. Aunque el género *Milnesium* se consideró por mucho tiempo integrado por especies cosmopolitas, el advenimiento de la biología molecular ha puesto en duda este supuesto (Gąsiorek, 2023). En 2021, Morek et al. determinaron que *Milnesium* tiene capacidades limitadas de dispersión y, por tanto, sus especies están probablemente restringidas a regiones zoogeográficas únicas. En este sentido, solo la integración de análisis moleculares a la descripción morfológica de los especímenes recolectados de *Macrobiotus cf. ocotensis* y *Milnesium cf. cassandrae* podría confirmar la presencia de estas especies en Quintana Roo o en su caso dar soporte a la descripción de nuevas especies para la ciencia.

Por otra parte, las especies *K. kofordi* y *M. alvaroi*, registradas previamente en Chiapas (Dueñas-Cedillo et al., 2020; García-Román et al., 2022), representan nuevos registros para Quintana Roo, por lo que se contribuye al conocimiento de la distribución de estas especies en México. La suma de los taxones aquí documentados, junto con los registros previos de *Echiniscus sp.* y *D. chetumalensis*, elevan a 14 el número de especies en la lista de tardígrados limnoterrestres de Quintana Roo (Pérez-Pech et al. 2016, 2017) (Cuadro 1); asimismo, se adiciona el bosque de manglar costero a la lista de ambientes de dichos animales en el estado. Anteriormente, solo había reportes de tardígrados limnoterrestres en cultivos de cítricos (Anguas-Escalante et al., 2018; Cutz-Pool et al., 2019) y sedimento acumulado a orillas de las calles de asfalto de la ciudad de Chetumal (Pérez-Pech et al., 2016, 2017).

Los 14 taxones de tardígrados limnoterrestres para Quintana Roo, junto al registro de especies de tardígrados marinos, suman 28 especies (Anguas-Escalante et al., 2020; Pérez-Pech et al., 2020). En este estudio también se proveen imágenes de los huevos de tardígrados recolectados, los cuales son elementos importantes para la identificación a nivel especie (Kaczmarek et al., 2017, 2020; Kaczmarek & Michalczyk, 2017; Morek et

of biodiversity with a unique composition. This was observed in the present study, as it was found that citrus crops (regardless of the biotope type), an environment altered and modified by human action, can harbor high levels of tardigrade richness, diversity, and abundance compared to vegetation fragments. In terms of diversity (H'), there was generally no variation between lichen and moss samples from the same plots, with variation only observed during the September 2018 sampling in the plantation area. This agrees with findings by Dastych (1988) in Poland, who discovered that rather than ecosystem type (e.g., forest or soil types), the microenvironment type was the factor most related to the variation in the diversity and abundance of limno-terrestrial tardigrades, not the bryophyte species to which they were associated. This has also been observed in boreal forests in Norway, where tardigrade communities varied more regarding the substrate (leaf litter, lichen, and bryophytes) than with the type of ecosystem (Guidetti et al., 2024).

This study also documented differences in the availability of habitats for tardigrades in the environments studied. In the case of citrus, the availability of lichen and moss was 100 % during both sampling periods, while in the forest fragment, the presence of lichen and moss was recorded in 33 % and 55 % of the sampled trees, respectively. Therefore, it is possible that the citrus crop provides greater habitat availability for tardigrades compared to the vegetation fragment. In Costa Rica, Kaczmarek et al. (2011) found similar results when comparing modified environments to natural ones and concluded that the former may harbor greater diversity. However, the researchers demonstrated that this fact was strongly correlated with humidity (and less so with plant and substrate types). In contrast, in this study, the MDS values showed little correlation between the structure of the tardigrade community and humidity levels. On the other hand, when analyzing the MDS results between physical (humidity and temperature), chemical (pH) parameters, and diversity, it was found that pH correlated better with species arrangement. These results agree with those of Utsugi (1984) and Johansson et al. (2011), who mentioned that pH is a parameter that drives the variation in limno-terrestrial tardigrade diversity. Utsugi (1984) considered that tardigrades prefer environments with a neutral pH (6.5-8.0), and Johansson et al. (2011) found that tardigrades in rural environments prefer slightly acidic pH levels (4.5 to 6.0); in this study, the values were slightly acidic and neutral (pH 5.1-7.4).

On the other hand, considering the postulation by Meyer et al. (2013) regarding the uniqueness of the tardigrade community in anthropogenic environments, it is important to add that some taxa may adapt better to these environments and, in turn, show high dominance. This could also influence the determination of the tardigrade community structure in rural environments,

al., 2016). Esta información es importante para el uso en futuros estudios en la península de Yucatán.

En cuanto a la ecología de tardígrados urbanos y rurales, Meyer et al. (2013) consideran que los ambientes originados en el Antropoceno pueden permitir el mantenimiento de la biodiversidad con una composición única. Esto se constató en el presente estudio, ya que se pudo observar como el cultivo de cítricos (sin importar el tipo de biotopo), el cual es un ambiente intervenido y modificado por acción antropogénica, puede albergar niveles altos de riqueza, diversidad y abundancia de tardígrados frente al fragmento de vegetación. En cuanto a la diversidad (H'), en general, no hubo variación entre muestras de liquen y musgo de las mismas parcelas, solo se observó variación durante el muestreo de septiembre de 2018 en el área de cultivo. Esto coincide con lo encontrado por Dastych (1988) en Polonia, quien encontró que, más que el tipo de ecosistema (v. g., tipos de bosque o suelo), el tipo de microambiente fue el factor que se relacionó con la variación de la diversidad y abundancia de tardígrados limnoterrestres y no la especie de briofita a la cual se asociaron. Esto también se ha observado en bosques boreales de Noruega, donde las comunidades de tardígrados variaron más con respecto al sustrato (hojarasca, liquen y briofitas) que con el tipo de ecosistema (Guidetti et al., 2024).

En el presente estudio también se documentó diferencia entre la disponibilidad de hábitats para tardígrados en los ambientes estudiados. En el caso del cultivo de cítricos, la disponibilidad de liquen y musgo fue del 100 % en las dos temporalidades de muestreo, mientras que, en el fragmento de selva, la presencia de liquen y musgo se registró en 33 y 55 % de los árboles muestreados, respectivamente. Por tanto, es posible que el cultivo de cítricos provea mayor disponibilidad de hábitats para tardígrados frente al fragmento de vegetación. En Costa Rica, Kaczmarek et al. (2011) encontraron algo similar cuando compararon ambientes modificados frente a ambientes naturales y concluyeron que los primeros pueden albergar mayor diversidad. No obstante, los investigadores demostraron que este hecho estuvo ampliamente correlacionado con la humedad (y una menor correlación con los tipos de planta y sustrato). Sin embargo, en este estudio, los valores del MDS mostraron poca correlación entre la estructura de la comunidad de tardígrados y los valores de humedad. Por otro lado, al analizar los resultados de los MDS entre parámetros físicos (humedad y temperatura), químicos (pH) y la diversidad, se encontró que el pH se correlaciona mejor con el arreglo de especies. Estos resultados coinciden con los de Utsugi (1984) y Johansson et al. (2011), quienes mencionan que el pH es un parámetro que dirige la variación de la diversidad de tardígrados limnoterrestres. Utsugi (1984) consideró que los tardígrados prefieren ambientes con

as documented by Gonzales-Reyes et al. (2016), who, like in the present study, identified the genus *Macrobiotus* as dominant. The results showed clear differentiation of tardigrade communities between the two environments in September 2018, with significant difference ($P < 0.05$) in overall diversity by study month. This demonstrates that the diversity of limno-terrestrial tardigrades is affected by time. This study covered the rainy season and the 'nortes' season; therefore, the observed changes in diversity between the studied environments and time periods could be affected by changes in climatic variables.

Conclusions

The updated list of limno-terrestrial tardigrades in Quintana Roo consists of 14 species; furthermore, the coastal mangrove forest is added to the list of environments for these animals in the region. The richness and Shannon-Wiener diversity were higher in the citrus plantation than in the evergreen forest fragment, suggesting that tardigrades adapt well to anthropogenic environments. The results indicate that the patterns of tardigrade diversity in modified and natural environments are influenced by multifactorial processes. At the landscape level, the type of ecosystem is a factor that determines habitat availability for tardigrades. Additionally, microenvironmental conditions such as pH, and to a lesser extent humidity, also influence the structure and composition of limno-terrestrial tardigrade communities.

Acknowledgments

The first author thanks the Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación for the funding provided during the development of the study (CVU 77783). The fifth author thanks the institutional project 5805.19-P from the *Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Chetumal* for the funding provided. The authors also thank Dr. Alberto de Jesús Navarrete and the Colegio de la Frontera Sur for providing the facilities and equipment from Laboratorio de Pesquerías Sección Meiofauna, during the identification of the taxa; thanks to M. C. Héctor Ortiz León for the support given at the Laboratorio de Zoología del Tecnológico Nacional de México, campus Chetumal, during sample separation; and to the anonymous reviewers for their feedback on this article.

Conflict of Interest Declaration

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

End of English version

pH neutro (6.5-8.0) y Johansson et al. (2011) encontraron que los tardígrados en ambientes rurales prefieren niveles de pH ligeramente ácidos (4.5 a 6.0); en el presente estudio, los valores fueron ligeramente ácidos y neutros (pH 5.1-7.4).

Por otra parte, considerando lo postulado por Meyer et al. (2013), sobre lo singular de la comunidad de tardígrados en ambientes antrópicos, es importante agregar que algunos taxones pueden adaptarse mejor en estos ambientes y, a su vez, mostrar alta dominancia. Esto podría influir también al determinar la estructura de la comunidad de tardígrados en ambientes rurales, tal como han documentado Gonzales-Reyes et al. (2016), donde al igual que en el presente estudio, señalan al género *Macrobiotus* como dominante. Los resultados mostraron clara diferenciación de las comunidades de tardígrados entre los dos ambientes en septiembre del 2018 y diferencias significativas ($P < 0.05$) en las diversidades globales por mes de estudio. Lo anterior demuestra que la diversidad de tardígrados limnoterrestres es afectada por el tiempo. Este estudio abarcó las temporadas de lluvias y 'nortes'; por lo tanto, los cambios en la diversidad observada entre los ambientes estudiados y la temporalidad podrían estar sujetos a los cambios de las variables climáticas.

Conclusiones

El listado actualizado de tardígrados limnoterrestres en Quintana Roo está conformado por 14 especies; asimismo, se adiciona el bosque de manglar costero a la lista de ambientes de dichos animales en la entidad. La riqueza y diversidad de Shannon-Wiener fue mayor en el cultivo de cítricos que en el fragmento de selva mediana subperennifolia, lo cual sugiere que los tardígrados se adaptan bien a los ambientes antrópicos. Los resultados indican que los patrones de diversidad de tardígrados en ambientes modificados y naturales obedecen a procesos multifactoriales. A nivel de paisaje, el tipo de ecosistema es un factor que determina la disponibilidad de hábitats para tardígrados. Por otra parte, las condiciones microambientales como el pH y, en menor grado, la humedad, también influyen en la estructura y composición de las comunidades de tardígrados limnoterrestres.

Agradecimientos

El primer autor agradece a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación por el financiamiento durante el desarrollo del estudio (CVU 77783). El quinto autor agradece al proyecto institucional 5805.19-P del Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Chetumal por su financiamiento. Agradecemos también al Dr. Alberto

References / Referencias

- Anguas-Escalante, A., de Jesús-Navarrete, A., Demilio, E., Perez-Pech, W. A., & Hansen, J. G. (2020). A new species of Tardigrada from a Caribbean reef lagoon, *Florarctus yucatanensis* sp. nov. (Halechiniscidae: Florarctinae). *CBM - Cahiers de Biologie Marine*, 61, 377–385. <https://doi.org/10.21411/CBM.A.CD1B185A>
- Anguas-Escalante, A., Pérez-Pech, W. A., Guidetti, R., Cutz-Pool, L. Q., & Ortiz León, H. (2018). Tardígrados asociados a una plantación de cítricos de traspaso en la comunidad de El Palmar en Quintana Roo, México. *Investigación y Ciencia*, 73, (26), 20–26. <https://doi.org/10.33064/iycuaa201873203>
- Bartels, P. J., Apodaca, J. J., Mora, C., & Nelson, D. R. (2016). A global biodiversity estimates of a poorly known taxon: phylum Tardigrada. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 178(4), 730–736. <https://doi.org/10.1111/zoj.12441>
- Clarke, K. R., & Gorley, R. N. (2006). *PRIMER V6: User Manual/tutorial*. PRIMER-E. Plymouth.
- Claxton, S. K. (1998). A revision of the genus *Minibiotus* (Tardigrada: Macrobiotidae) with descriptions of eleven new species from Australia. *Records of the Australian Museum*, 50(2), 125–160. <https://doi.org/10.3853/j.0067-1975.50.1998.1276>
- Cutz-Pool, L., Crisanto, J., Pérez-Pech, W. A., Anguas-Escalante, A., & Guidetti, R. (2019). Caracterización de la fauna de tardígrados (Ecdysozoa: Tardigrada) de liquen y musgo en dos sitios con diferente uso de suelo en Quintana Roo, México. En W. Cetzal-Ix, F. Casanova-Lugo, A. J. Chay-Canul, & J. F. Martínez-Puc (Eds.), *Agroecosistemas tropicales: Conservación de recursos naturales y seguridad alimentaria* (1.ª ed., pp. 193–200). Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Chiná - Instituto Tecnológico de la Zona Maya.
- Dastych, H. (1988). *The Tardigrada of Poland*. Wyd. Naukowe.
- Dueñas-Cedillo, A., Martínez-Méndez, E., García-Román, J., Armendáriz-Toledano, F., & Ruiz, E. (2020). Tardigrades from Iztaccíhuatl Volcano (Trans-Mexican Volcanic Belt), with the description of *Minibiotus citlalium* sp. nov. (Eutardigrada: Macrobiotidae). *Diversity*, 12(271), 2–24. <https://doi.org/10.3390/d12070271>
- Gąsiorek, P. (2023). Catch me if you can, or how paradigms of tardigrade biogeography evolved from cosmopolitanism to 'localism'. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 202(2), zlad191. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlad191>
- García-Román, J., Dueñas-Cedillo, A., Cervantes-Espinoza, M., Flores-Martínez, J. J., Vargas-Mendoza, C. F., Ruiz, E. A., & Armendáriz-Toledano, F. (2022). A strategy to provide a present and future scenario of Mexican biodiversity of tardigrada. *Diversity*, 14(4), 280. <https://doi.org/10.3390/d14040280>
- González-Reyes, A., Acosta, X., Corronca, J., Rocha, M., Doma I., & Repp, E. Y. (2016). Evaluación de la diversidad en comunidades de tardígrados (Ecdysozoa, Tardigrada) en hábitats urbano y rural de la ciudad de Salta (Argentina). *Iheringia Série Zoologia*, 106, 1–8. <https://doi.org/10.1590/1678-4766e2016026>
- de Jesús Navarrete y al Colegio de la Frontera Sur por facilitar las instalaciones y equipo del Laboratorio de Pesquerías Sección Meiofauna durante la identificación de los taxones; al M. C. Héctor Ortiz León por las facilidades otorgadas en el Laboratorio de Zoología del Tecnológico Nacional de México, campus Chetumal, durante la separación de muestras; y a los revisores anónimos por sus recomendaciones al artículo.
- ### Declaración de conflicto de intereses
- 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.
- ### Fin de la versión en español
- Guidetti, R., Cesari, M., Bertolani, R., Altiero, T., & Rebecchi, L. (2019). High diversity in species, reproductive modes and distribution within the *Paramacrobiotus richtersi* complex (Eutardigrada, Macrobiotidae). *Zoological Letters*, 5(1), 2–28. <https://doi.org/10.1186/s40851-018-0113-z>
- Guidetti, R., Peluffo, J. R., Rocha, A. M., Cesari, M., & de Peluffo, M. C. M. (2013). The morphological and molecular analyses of a new South American urban tardigrade offer new insights on the biological meaning of the *Macrobiotus hufelandi* group of species (Tardigrada: Macrobiotidae). *Journal of Natural History*, 47, 2409–2426. <https://doi.org/10.1080/00222933.2013.800610>
- Guidetti, R., Ingemar Jönsson, K., Kaczmarek, Ł., Meier, T., Speed, J. D., Prestø, T., Stur, E., Topstad, L., Cesari, M., Roszkowska, M., Zawierucha, K., Hassel, K., & Ekrem, T. (2024). Tardigrade diversity and community composition across Norwegian boreal forests. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 200(1), 156–171. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlad136>
- Hammer, O., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package education and analysis. *Paleontologia Electronica*, 4(9), 2–9. https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf
- Johansson, C., Calloway, S., Miller, W. R., & Linder, E. T. (2011). Are urban and rural tardigrade (Tardigrada) communities distinct and determined by pH: a case study from Fresno County, California. *The Pan-Pacific Entomologist*, 87, 86–98. <https://doi.org/10.3956/2010-27.1>
- Kaczmarek, Ł., Bartylak, T., Stec, D., Kulpa, A., Kepel, M., Kepel, A., & Roszkowska, M. (2020). Revisiting the genus *Mesobiotus* (Eutardigrada, Macrobiotidae)—remarks, updated dichotomous key and an integrative description of new species from Madagascar. *Zoologischer Anzeiger*, 287, 121–146. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2020.05.003>
- Kaczmarek, Ł., Gawlak, M., Bartels, P. J., Nelson, D. R., & Roszkowska, M. (2017). Revision of the genus *Paramacrobiotus* Guidetti et al., 2009 with the description

- of a new species, re-descriptions and a key. *Annales Zoologici*, 67, 627–657. <https://doi.org/10.3161/00034541ANZ2017.67.4.001>
- Kaczmarek, Ł., Goldyn, B., McInnes, S. J., & Michalczyk, Ł. (2016). Diversity of limno-terrestrial tardigrades of the Americas in relation to the Great American Biotic Interchange hypothesis (GABI). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 178(4), 737–746. <https://doi.org/10.1111/zoj.12422>
- Kaczmarek, Ł., Goldyn, B., Welnicz, W., & Michalczyk, Ł. (2011). Ecological factors determining Tardigrada distribution in Costa Rica. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 49, 78–83. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2010.00603.x>
- Kaczmarek, Ł., & Michalczyk, Ł. (2017). The *Macrobiotus hufelandi* group (Tardigrada) revisited. *Zootaxa*, 4363, 101–123. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4363.1.4>
- Kayastha, P., Mioduchowska, M., Warguła, J., & Kaczmarek, Ł. (2023). A review on the genus *Paramacrobiotus* (Tardigrada) with a new diagnostic key. *Diversity*, 15(9), 977. <https://doi.org/10.3390/d15090977>
- Meyer, H. A., Hinton, J. G., & Samletzka, C. A. (2013). Water bears in the Anthropocene: a comparison of urban and woodland tardigrade (Phylum Tardigrada) communities in Southwestern Louisiana, USA. *Journal of Limnology*, 72, 123–127. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2013.s1.e15>
- Mogle, M. J., Kimball, S. A., Miller, W. R., & McKown, R. D. (2018). Evidence of avian-mediated long distance dispersal in American tardigrades. *PeerJ*, 6, e5035. <https://doi.org/10.7717/peerj.5035>
- Morek, W., Gąsiorek, P., Stec, D., Blagden, B., & Michalczyk, Ł. (2016). Experimental taxonomy exposes ontogenetic variability and elucidates the taxonomic value of claw configuration in *Milnesium Doyère*, 1840 (Tardigrada: Eutardigrada: Apochela). *Contributions to Zoology*, 85(2), 173–200. <https://doi.org/10.1163/18759866-08502003>
- Morek, W., Surmacz, B., López-López, A., & Michalczyk, Ł. (2021). “Everything is not everywhere”: Time-calibrated phylogeography of the genus *Milnesium* (Tardigrada). *Molecular Ecology*, 30(14), 3590–3609. <https://doi.org/10.1111/mec.15951>
- Morek, W., Wałach, K., & Michalczyk, Ł. (2022). Rough backs: taxonomic value of epicuticular sculpturing in the genus *Milnesium Doyère*, 1840 (Tardigrada: Apochela). *Scientific Reports*, 12(1), 9857. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10758-z>
- Moreno-Talamantes, A., Roszkowska, M., Ríos Guayasamín, P., Flores Maldonado, J. J., & Kaczmarek, Ł. (2015). First record of *Dactylobiotus parthenogeneticus* Bertolani, 1982 (Eutardigrada: Murrayidae) in Mexico. *Check List*, 11(4), 1723. <https://doi.org/10.15560/11.4.1723>
- Moreno-Talamantes, A., Roszkowska, M., García-Aranda, M. A., Flores-Maldonado, J. J., & Kaczmarek, Ł. (2019). Current knowledge on Mexican tardigrades with a description of *Milnesium cassandrae* sp. nov. (Eutardigrada: Milnesiidae) and discussion on the taxonomic value of dorsal pseudoplates in the genus *Milnesium Doyère*, 1840. *Zootaxa*, 4695, 501–524. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4695.5.5>
- Moreno-Talamantes A., & León-Espinosa G. (2019). Nuevo registro de *Diaporobotus islandicus* (Richters, 1904) (EUTARDIGRADA: RICHTERSIIDAE) para México. *Arido-Ciencia*, 6(1), 5–12. <http://fcbujed.com/aridociencia/numeros/2019/VIVN1/articulo2.pdf>
- Nelson, D., Guidetti, R., & Rebecchi, L. (2015). Phylum Tardigrada. En J. Thorp, & D. C. Rogers (Eds.), *Freshwater invertebrates* (vol. I 4th ed., pp. 347–380). San Diego: Academic Press (Elsevier Inc.). <https://www.sciencedirect.com/book/9780123850263/thorp-and-covichs-freshwater-invertebrates>
- Núñez, P. G., León-Espinosa, G. A., Vázquez, R., Peña-Salinas, M. E., Rodríguez-Almaraz, G. A., & Moreno-Talamantes, A. (2021). First tardigrade records from San Pedro Mártir, Baja California, Mexico. *Check List*, 17, 1131. <https://doi.org/10.15560/17.4.1131>
- Pérez-Pech, W. A., Anguas-Escalante, A., Cutz-Pool, L. Q., & Guidetti, R. (2017). *Doryphoribius chetumalensis* sp. nov. (Eutardigrada: Isohypsibiidae) a new tardigrade species discovered in an unusual habitat of urban areas of Mexico. *Zootaxa*, 4344, 345–356. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4344.2.9>
- Pérez-Pech, W. A., Cutz-Pool, L. Q., Guidetti, R., & Blanco-Piñón, A. (2016). Primer registro genérico de tardígrados, habitantes del área urbana de Chetumal Quintana Roo, México. *Entomología Mexicana*, 3, 912–918. <https://www.acaentmex.org/entomologia/revista/2016/SM/Em%20912-918.pdf>
- Pérez-Pech, W. A., Demilio, E., Anguas-Escalante, A., & Hansen, J. G. (2020). Marine Tardigrada from the Mexican Caribbean with the description of *Styraconyx robertoi* sp. nov. (Arthrotardigrada: Styraconyxidae). *Zootaxa*, 4731(4). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4731.4.3>
- Pilato, G. (2006). Remarks on the *Macrobiotus polyopus* group, with the description of two new species (Eutardigrada, Macrobiotidae). *Zootaxa*, 1298(1), 37–47. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5616731>
- Pilato, G., & Kaczmarek, Ł. (2007). *Macrobiotus alvaroi*, a new species of eutardigrade (Tardigrada, Macrobiotidae) of the polyopus group from Costa Rica (Central America). *Zootaxa*, 1479(1), 1–7. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1479.1.1>
- Utsugi, K. (1984). Tardigrades found in the mosses of cities of Japan. *Zoological Science* 1, 999.

Health condition of *Ficus microcarpa* L. f. assessed using crown condition indicators and tree damage in Cuernavaca, Morelos

Estado de salud de *Ficus microcarpa* L. f. evaluado mediante los indicadores condición de copa y daños al arbolado en Cuernavaca, Morelos

Xochiquetzaly G. Salazar-García^{1*}; Tomás Martínez-Trinidad²; Dionicio Alvarado-Rosales¹; Luz de L. Saavedra-Romero¹; Armando Equihua-Martínez¹

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Postgrado en Fitosanidad. km 36.5 Carretera México-Textcoco, col. Montecillo. C. P. 56230. Textcoco, Estado de México, México.

²Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Postgrado en Ciencias Forestales. km 36.5 Carretera México-Textcoco, col. Montecillo. C. P. 56230. Textcoco, Estado de México, México.

*Corresponding author: xochiquetzaly.sg@gmail.com; tel.: +52 777 387 1193.

Abstract

Introduction. Due to practicality and reliability, the indicators 'crown condition' and 'tree damage' have been used to assess the health condition of urban trees.

Objective. To determine the health condition of *Ficus microcarpa* L. f. trees using the indicators 'crown condition' and 'tree damage' in Cuernavaca, Morelos.

Materials and methods. A total of 387 *F. microcarpa* trees were assessed for the following variables: live crown ratio (LCr), crown density, crown dieback, foliage transparency, and the presence of biotic, abiotic, and anthropogenic damage.

Results and discussion. In Cuernavaca, *Ficus microcarpa* trees have heights ranging from 3 to 5 m and diameters between 20 and 40 cm, classified as young to mature trees. Health condition of trees was considered good, with an average LCR of 70 %, crown diameter of 65 %, and dieback of 5 %, except for foliage transparency, which, at 35 %, classified the trees into a moderate health category. The most frequent tree damage was reduced living space (55.21 %) and topiary (18 %). Only 32 dead trees (8.26 %) were recorded.

Conclusion. Crown condition and tree damage indicators were used to determine *F. macrocarpa* health. Foliage transparency is an early stress indicator that can be attributed to damage agents, mostly of abiotic and anthropogenic origin.

Keywords: urban trees; reduced living space; dieback; topiary; foliage transparency.

Resumen

Introducción. Por su practicidad y confiabilidad, los indicadores 'condición de copa' y 'daños al arbolado' han servido para determinar, de manera rápida, el estado de salud del arbolado en zonas urbanas.

Objetivo. Determinar el estado de salud de los árboles de *Ficus microcarpa* L. f. mediante los indicadores 'condición de copa' y 'daños al arbolado' en Cuernavaca, Morelos.

Materiales y métodos. En 387 árboles de *F. microcarpa* se midieron las variables proporción de copa viva (PCV), densidad de copa, muerte regresiva y transparencia de follaje, así como la presencia de daños bióticos, abióticos y antropogénicos.

Resultados y discusión. En la ciudad de Cuernavaca predominan árboles de *Ficus microcarpa* con alturas de 3 a 5 m y diámetro entre los 20 y 40 cm, catalogados como árboles jóvenes-maduros. El estado de salud del arbolado se considera bueno con una media de PCV de 70 %, diámetro de copa de 65 % y muerte regresiva de 5 %, a excepción de la transparencia del follaje con 35 %, la cual clasificó a los árboles en una categoría de salud moderada. Los daños al arbolado más frecuentes fueron el espacio vital reducido (55.21 %) y la poda topiaria (18 %). Solo se registraron 32 árboles muertos (8.26 %).

Conclusión. Los indicadores de condición de copa y daños al arbolado contribuyeron a determinar la salud de *F. microcarpa*. La transparencia del follaje es un indicador de estrés temprano que puede atribuirse a los agentes de daño, en su mayoría, de origen abiótico y antropogénico.

Palabras clave: árboles urbanos; espacio vital reducido; muerte regresiva; poda topiaria; transparencia de follaje.

Introduction

In recent years, trees in urban areas have gained importance due to the multiple benefits they provide to the population (Houlden et al., 2021; Nesbitt et al., 2017). Therefore, the conservation and maintenance of green spaces has become a key objective in sustainable urban development plans (United Nations [UN], 2023). The urban environment often increases stress on trees and shortens their lifespan; thus, the periodic monitoring and evaluation of urban trees play a crucial role in decision-making, helping to develop effective management plans that maintain tree health and, in turn, provide greater benefits to the population (Fang et al., 2023; Mullaney et al., 2015).

Several methods have been proposed to assess the condition of trees, such as “The Guide for Plant Appraisal” (Council of Tree and Landscape Appraisers [CTLA], 2018), the i-Tree ECO program (USDA Forest Service, 2013), the “Forest Inventory Analysis” (USDA Forest Service, 2016), and the “Urban Tree Health” method (Bond, 2021). In Mexico, forest health has been a topic of study primarily since 2012, when the National Forest and Soil Inventory (INFYS) and the Health Management Division of Mexico’s National Forestry Commission (CONAFOR) agreed to begin measuring two forest health indicators: ‘crown condition’ and ‘tree damage’ (Alvarado-Rosales et al., 2021). These indicators have been used to determine the health condition of trees by means of quick, practical, cost-effective, and reliable assessments in urban areas (Saavedra-Romero et al., 2016; Zaragoza Hernández et al., 2015).

In Mexico, the *Ficus* genus is one of the most used for street trees in parks, gardens, and public spaces (Alanís-Rodríguez et al., 2023; Martínez-Trinidad et al., 2021). In Cuernavaca, Morelos, about 89 % of the trees are exotic species, and *Ficus microcarpa* L. f. is among the four species that make up 76 % of the urban tree population (Ramírez-Rodríguez et al., 2020). Given the abundance of *F. microcarpa* in the city of Cuernavaca, this study aims to assess the health condition of this species in the urban area using the indicators ‘crown condition’ and ‘tree damage.’

Materials and Methods

Study area

The study was carried out from July 2022 to February 2023 in the municipality of Cuernavaca, in the northwestern state of Morelos (19° 01' 29" N y 99° 20' 31" W).

A map of the municipality’s urban area was created (Figure 1), outlining its three characteristic climatic regions: north = C(w₂) temperate subhumid; center = A(C)

Introducción

En los últimos años, los árboles en las ciudades han cobrado relevancia debido a los múltiples beneficios que proporcionan a la población (Houlden et al., 2021; Nesbitt et al., 2017). Por ello, la conservación y mantenimiento de las áreas verdes se ha vuelto un objetivo en planes de desarrollo urbano sostenible (Organización de las Naciones Unidas [ONU], 2023). El entorno urbano suele aumentar el estrés sobre los árboles y reducir su periodo de vida; por tanto, el monitoreo y la evaluación periódica del arbolado contribuyen en la toma de decisiones para el desarrollo de un buen plan de manejo que mantenga el buen estado de salud arbóreo, de tal modo que proporcione mayores beneficios a la población (Fang et al., 2023; Mullaney et al., 2015).

Para evaluar la condición de los árboles se han propuesto diversos métodos, tales como: “La guía para la valoración de las plantas” (Council of Tree and Landscape Appraisers [CTLA], 2018), el programa i-Tree ECO (USDA Forest Service, 2013), el “Análisis de Inventario Forestal” (USDA Forest Service, 2016) y el método de “Salud del arbolado urbano” (Bond, 2021). En México, la salud forestal ha sido tema de estudio principalmente desde 2012, año en que el Inventario Nacional Forestal y de Suelo (INFYS) y la Gerencia de Sanidad de la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) acordaron iniciar la medición de dos indicadores de salud forestal denominados ‘condición de copa’ y ‘daños al arbolado’ (Alvarado-Rosales et al., 2021). Estos han permitido determinar el estado de salud de los árboles a través de evaluaciones rápidas, prácticas, económicas y confiables en zonas urbanas (Saavedra-Romero et al., 2016; Zaragoza Hernández et al., 2015).

En México, el género *Ficus* es uno de los más utilizados como árboles de alineación en parques, jardines y áreas públicas (Alanís-Rodríguez et al., 2023; Martínez-Trinidad et al., 2021). En Cuernavaca, Morelos, aproximadamente 89 % de los árboles son de origen exótico y *Ficus microcarpa* L. f. se encuentra entre las cuatro especies que componen 76 % del arbolado (Ramírez-Rodríguez et al., 2020). Debido a la abundancia de *F. microcarpa* en la ciudad de Cuernavaca, el objetivo del presente estudio fue evaluar el estado de salud de los árboles de dicha especie en la zona urbana, utilizando los indicadores ‘condición de copa’ y ‘daños al arbolado’.

Materiales y métodos

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo de julio del 2022 a febrero del 2023 en el municipio de Cuernavaca, en el noroeste del estado de Morelos (19° 01' 29" LN y 99° 20' 31" LO).

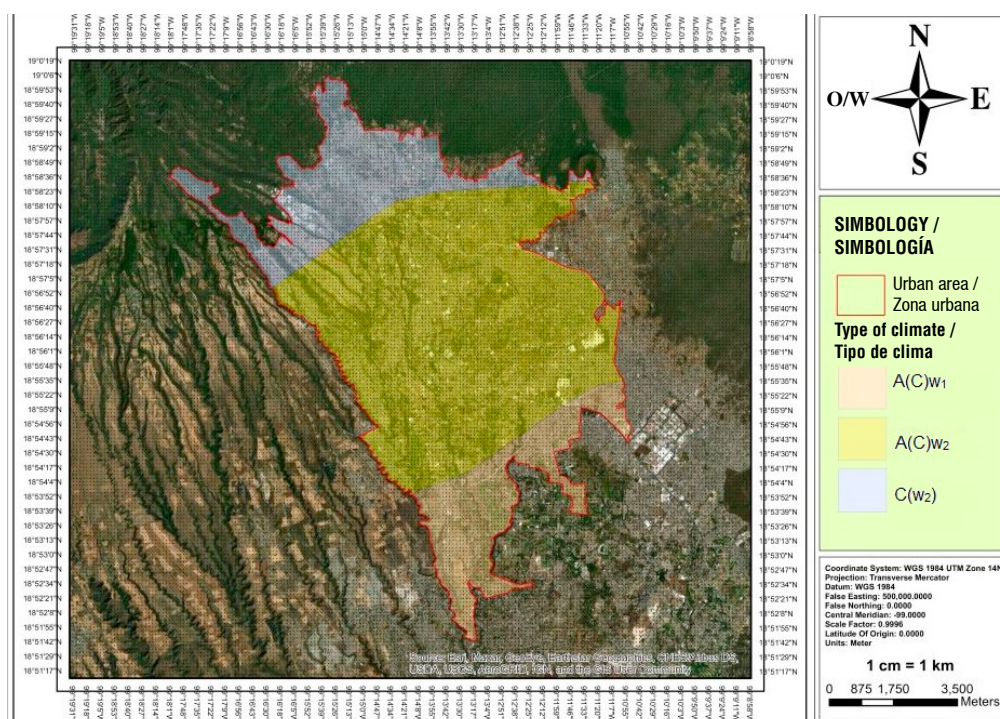


Figure 1. Map of the study area in the urban zone of Cuernavaca, Morelos, with divisions according to the type of climate. The area marked in yellow, corresponding to the A(C)w₂ climate, was selected for the health assessment of *Ficus macrocarpa*.

Figura 1. Mapa de localización del área de estudio en la zona urbana de Cuernavaca, Morelos, con divisiones por tipo de clima. La zona señalada con amarillo, correspondiente al clima A(C)w₂, fue seleccionada para la evaluación de salud de *Ficus macrocarpa*.

w₂ warm subhumid (Group C); and south = A(C)w₁ warm subhumid (Group C). The central region was selected as the study area because it had the highest number of *F. microcarpa* individuals. The map was divided into 1-ha square plots, and a survey was conducted using the Google Earth® georeferencing system to select plots containing at least one individual of the target species. A total of 3 436 plots were identified, of which 98 were evaluated, representing a sampling intensity of 2.85 %.

Tree measurement variables

Total tree height (m) and crown length (m) in the vertical direction were measured using a clinometer (Suunto PM-5). Diameter at breast height (DBH) of trees with DBH ≥ 7.5 cm (measured at 130 cm above ground level) was recorded using a diameter tape (Forestry Suppliers Model 283d). Crown condition and health categories (Table 1) were evaluated following the sampling procedures of Randolph and Bechtold (2018), Bechtold et al. (1992), and Schomaker et al. (2007).

The measured variables were as follows: live crown ratio (LCR), crown density, foliage transparency, and dieback. LCR was measured as a percentage and determined as

Se hizo un mapa correspondiente a la zona urbana del municipio (Figura 1), delimitando las tres regiones climáticas características: norte = C(w₂) templado subhúmedo; centro = A(C)w₂ semicálido subhúmedo del grupo C y sur = A(C)w₁ semicálido subhúmedo del grupo C. La zona centro se seleccionó como área de trabajo, debido a que presentó mayor número de individuos de *F. microcarpa*. El mapa se dividió en parcelas cuadradas de 1 ha y con ayuda del sistema de georreferenciación Google Earth® se hizo un recorrido para la selección de parcelas en las que hubiera al menos un individuo de la especie de interés. Se obtuvieron 3 436 parcelas y se evaluaron 98 que corresponde a una intensidad de muestreo de 2.85 %.

Variables dasométricas

Con un clinómetro (Suunto PM-5) se midió la altura total (m) y longitud de copa (m) en sentido vertical. El diámetro normal (Dn) de los árboles con Dn ≥ 7.5 cm (a 130 cm sobre el nivel del suelo) se midió con ayuda de una cinta diamétrica (Forestry Suppliers Modelo 283d). El indicador condición de copa y las categorías de salud (Cuadro 1) se evaluaron de acuerdo con los procedimientos de muestreo de Randolph y Bechtold (2018), Bechtold et al. (1992) y Schomaker et al. (2007).

Table 1. Variables and health categories of the crown condition indicator (Bechtold et al., 1992; Randolph & Bechtold, 2018) for natural forests in the southern United States.

Cuadro 1. Variables y categorías de salud del indicador condición de copa (Bechtold et al., 1992; Randolph & Bechtold, 2018) para bosques naturales del sur de Estados Unidos de América.

Variable	Health categories / Categoría de salud
Live Crown ratio / Proporción de copa viva	>50 % good; 31-50 % moderate; <30 % poor / >50 % buena; 31-50 % moderado; <30 % pobre
Crown density / Densidad de copa	0-20 % poor; 21-50 % average and 51-100 % good / 0-20 % pobre; 21-50 % promedio y 51-100 % buena
Foliage transparency / Transparencia de follaje	0-30 % standard; 31-50 % moderate and 51-100 % severe / 0-30 % normal; 31-50 % moderado y 51-100 % severo
Dieback / Muerte regresiva	0-5 % none; 6-20 % light; 21-50 % moderate; 51-100 % severe / 0-5 % ninguno; 6-20 % ligero; 21-50 % moderado; 51-100 % severo

the coefficient between live crown length (measured vertically) to the total tree height. Crown density was assessed in 5 % intervals by estimating the quantity of branches, foliage, and reproductive structures that block light passing through the crown. Foliage transparency was measured based on the amount of light passing through the foliated living rate of the crown. Dieback was estimated in 5 % intervals, considering the recent mortality of branches, represented by fine twigs, starting at the terminal part of the tree towards the inner part of the tree. For the assessment of crown density and foliage transparency, the evaluation card proposed by Schomaker et al. (2007) was used (Figure 2).

Tree damage

Trees from 98 randomly selected plots were evaluated by observing the main damages, taking as a guide the manual of the of the INFYS (CONAFOR, 2017); the record was adjusted to the most frequently observed damages. All those factors that negatively affect tree development in the short or long term were considered.

Data analysis

The data from 387 trees were recorded in a Microsoft Excel™ database, and the analysis was conducted using descriptive statistics. Due to the type of data, Kolmogorov-Smirnov and Lilliefors tests were performed at a significance level of 0.05 to determine whether the data followed a normal distribution. Based on the results of these tests, histograms were generated using Sturges' rule. These analyses were carried out using R Studio (R Core Team, 2020).

Results and Discussion

A total of 32 dead trees (8.26 %) were recorded out of 387 *F. microcarpa* trees. The significance values of all variables were lower than the established threshold

Las variables medidas fueron las siguientes: proporción de copa viva (PCV), densidad de copa, transparencia de follaje y muerte regresiva. La PCV se midió en porcentaje y se determinó como el cociente entre la longitud de la copa viva (medida de forma vertical) y la longitud total del árbol. La densidad de copa se evaluó en intervalos de 5 % mediante la estimación de la cantidad de ramas de la copa, follaje y estructuras reproductivas que bloquean la luz que atraviesa la copa. La transparencia del follaje se midió a través de la cantidad de luz que pasa a través de la porción viva y foliada de la copa. La muerte regresiva se estimó en intervalos del 5 %; para ello, se consideró la mortalidad reciente de ramas, representada por ramillas finas, comenzando en la parte terminal del árbol hacia la parte interna. Para la evaluación de densidad de copa y transparencia del follaje se utilizó la tarjeta propuesta por Schomaker et al. (2007) (Figura 2).

Daños al arbolado

Los árboles de 98 parcelas seleccionadas de manera aleatoria se evaluaron mediante la observación de los principales daños, tomando como guía el manual del INFYS (CONAFOR, 2017); el registro se ajustó a los daños observados con mayor frecuencia. Se consideraron todos aquellos factores que afectan negativamente el desarrollo del árbol a corto o largo plazo.

Análisis de datos

Con la información de las variables medidas en 387 árboles se creó una base de datos en Microsoft Excel™ y se realizó el análisis a través de estadísticos descriptivos. Debido al tipo de datos, se hicieron pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Lilliefors, a un nivel de significancia de 0.05, para conocer si estos se ajustaban o no a una distribución normal. En función del resultado de estas pruebas, se realizaron histogramas mediante la regla de Sturges. Estos análisis se realizaron con el programa R studio (R Core Team, 2020).

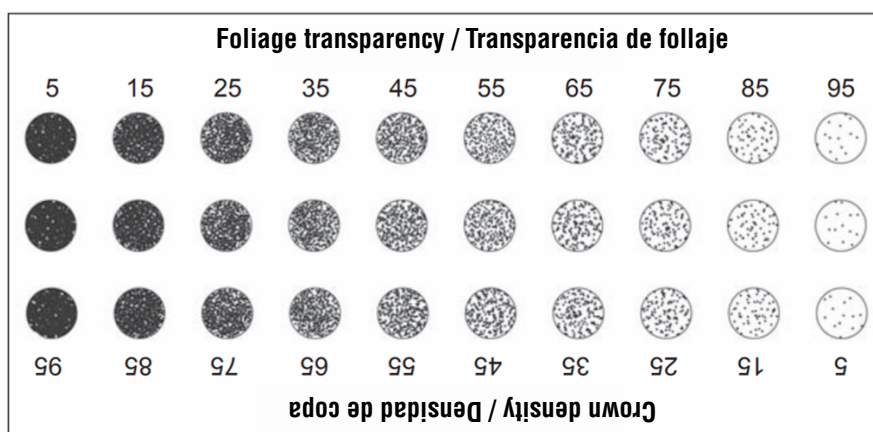


Figure 2. Card proposed by Schomaker et al. (2007) for the calculation of crown density and crown transparency.

Figura 2. Tarjeta propuesta por Schomaker et al. (2007) para el cálculo de la densidad de copa y transparencia de follaje.

($\alpha = 0.05$), indicating that the data were not normally distributed. Figure 3 shows the frequencies of tree measurement variables. The heights were distributed into 11 classes; the most frequent class, comprising 27 % of the trees, was between 3 and 5 m, while the least frequent class (1.12 %) corresponded to trees between 18 and 22 m. On the other hand, the diameters were divided into 10 classes; trees with diameters between 20.2 and 40.4 cm were the most frequent (39 %), while those with diameters greater than 60 cm exceeded 27 %. The classes 8 (141 to 162 cm) and 10 (182 to 202 cm) had the fewest individuals. Regarding crown length, 10 classes were obtained, with the first and second classes being the most frequent, with crown lengths of 1.8 m (14.7 %) and 3.63 m (37.8 %), respectively.

Tree heights in the city of Cuernavaca are similar to those recorded for trees in other urban areas of Mexico (Román-Guillén et al., 2019), where most trees have a height of around 5 m, due to pruning conducted to prevent interference with electrical wiring/overhead cables (Amer et al., 2023). It has also been reported that the average diameter of *F. microcarpa* trees in urban streets is 32.7 ± 15.6 cm, and the crown length is 4.59 ± 1.7 m (Amer et al., 2023), which matches the measurements of the trees in Cuernavaca. Height and diameter data mostly correspond to young to mature trees. Tree diameter is associated with age; smaller diameters correspond to younger trees (McPherson, 2016) and functional trees that provide more benefits to the population.

The strength and vitality of a tree are directly correlated with its stem and structure, so healthy trees are better able to withstand external damage and stress (Román-Guillén, 2019). The relationships between tree measurement variables such as total height, diameter, and crown length can help determine growth patterns and improve urban landscape planning and management practices (Chinchilla et al., 2021).

Resultados y discusión

Se registraron 32 árboles muertos (8.26 %) de un total de 387 árboles de *F. microcarpa*. Los valores de significancia de todas las variables fueron menores que el valor establecido ($\alpha = 0.05$), por lo que los datos no presentaron distribución normal. La Figura 3 muestra las frecuencias de las variables dasométricas del arbolado. Las alturas encontradas se distribuyeron en 11 clases; la más frecuente con 27 % de los árboles se encontró entre los 3 y 5 m, y la de menor frecuencia (1.12 %) correspondió a árboles de entre 18 y 22 m. Por otra parte, los diámetros se dividieron en 10 clases; los árboles con diámetro entre 20.2 y 40.4 cm fueron los de mayor frecuencia (39 %), los de diámetro superior a 60 cm rebasaron el 27 %, mientras que las clases 8 (141 a 162 cm) y 10 (182 a 202 cm) tuvieron el menor número de individuos. En cuanto a la longitud de copa se obtuvieron 10 clases, de las cuales la primera y segunda clase fueron las de mayor frecuencia con copas entre 1.8 m (14.7 %) y 3.63 m (37.8 %) de longitud..

Las alturas de los árboles de la ciudad de Cuernavaca son similares a las registradas en árboles de otras zonas urbanas de México (Román-Guillén et al., 2019), donde la mayoría tiene una altura de alrededor de 5 m, debido a las podas realizadas para evitar interferencia con el cableado eléctrico (Amer et al., 2023). También se ha reportado que el diámetro promedio de *F. microcarpa* en las calles suele ser de 32.7 ± 15.6 cm y la longitud de la copa de 4.59 ± 1.7 m (Amer et al., 2023), las cuales coinciden con las medidas de los árboles de Cuernavaca. Los datos de altura y diámetro corresponden, en su mayoría, a árboles jóvenes-maduros. El diámetro de los árboles está asociado con la edad; diámetros menores corresponden a árboles jóvenes (McPherson, 2016) y funcionales que aportan más beneficios a la población.

La fuerza y vitalidad de un árbol tiene correlación directa con el tronco y su estructura, por lo que los árboles

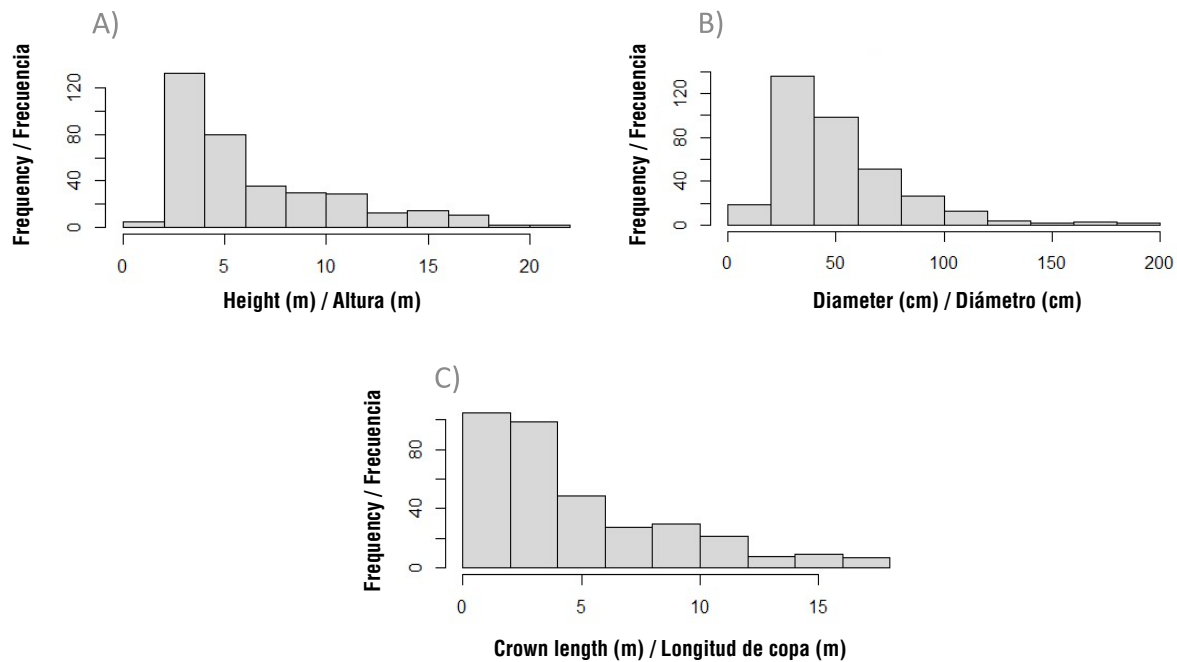


Figure 3. Tree measurement variables of *Ficus microcarpa* evaluated in the city of Cuernavaca, Morelos, for the years 2022-2023.
 Figura 3. Variables dasométricas de árboles de *Ficus microcarpa* evaluados en la ciudad de Cuernavaca, Morelos durante los años 2022-2023.

Crown conditions

Regarding the crown condition variables, Figure 4 shows that the trees were distributed into 10 classes. The most frequent category was class 9, with a live crown ratio ranging from 76.76 % to 86.35 %, classifying the trees as being in good health (Table 1; Bechtold et al., 1992; Randolph & Bechtold, 2018). Regarding crown density, 88 individuals fell into class 7, which includes values between 57.57 % and 67.16 %; these values indicate that the crowns are in good health (Table 1; Bechtold et al., 1992; Randolph & Bechtold, 2018). Concerning foliage transparency, most trees were in the range of 29.69 % to 39.5 %, with a total of 82 individuals, which classifies them as having moderate health (Table 1), according to Randolph and Bechtold (2018). Finally, dieback was considered incipient, as 195 trees fell within the 0 % to 9.8 % range (Table 1; Randolph & Bechtold 2018; Bechtold, 1992).

Foliage loss is one of the early indicators of tree stress (Schomaker et al., 2007). Crown condition indicators (such as foliage transparency, LCR, crown density, and dieback) are valuable tools for assessing tree health, primarily based on the degree of stress, which can be expressed in several ways and will depend on the stress factor and the response of the plant (Pontius & Hallett, 2014). In general, the crowns of *F. microcarpa* in Cuernavaca appear to be healthy; however, foliage transparency suggests that they are experiencing early stress. Moreover, the recorded mortality rate of 8.26 %

sanos podrán enfrentar las agresiones y daños externos, así como el estrés (Román-Guillén, 2019). Las relaciones entre variables dasométricas como altura total, diámetro y longitud de copa pueden ayudar a determinar patrones de crecimiento y a mejorar las prácticas de planificación y gestión de los paisajes urbanos (Chinchilla et al., 2021).

Condición de copa

En cuanto a las variables de condición de copa, la Figura 4 muestra que los árboles se distribuyeron en 10 clases. La proporción de copa viva de 76.76 % a 86.35 % (clase 9) fue la de mayor frecuencia, la cual clasifica a los árboles en la categoría de salud buena (Cuadro 1; Bechtold et al., 1992; Randolph & Bechtold, 2018). En cuanto a la densidad de copa, 88 individuos se encontraron en la clase 7 que incluye valores entre 57.57 % y 67.16 %; estos indican que la copa cuenta con buena salud (Cuadro 1; Bechtold et al., 1992; Randolph & Bechtold, 2018). Con respecto a la transparencia de follaje, la mayoría del arbolado se encontró en el rango de 29.69 % a 39.5 % con un total de 82 individuos, valores que lo clasifican en la categoría de salud moderada (Cuadro 1), de acuerdo con Randolph y Bechtold (2018). Finalmente, la variable muerte regresiva se considera incipiente, ya que tuvo un total de 195 árboles en un rango de 0 a 9.8 % (Cuadro 1; Randolph & Bechtold 2018; Bechtold, 1992).

La pérdida de follaje suele ser una de las formas en las que los árboles manifiestan el estrés temprano (Schomaker et al., 2007). Los indicadores de condición de copa

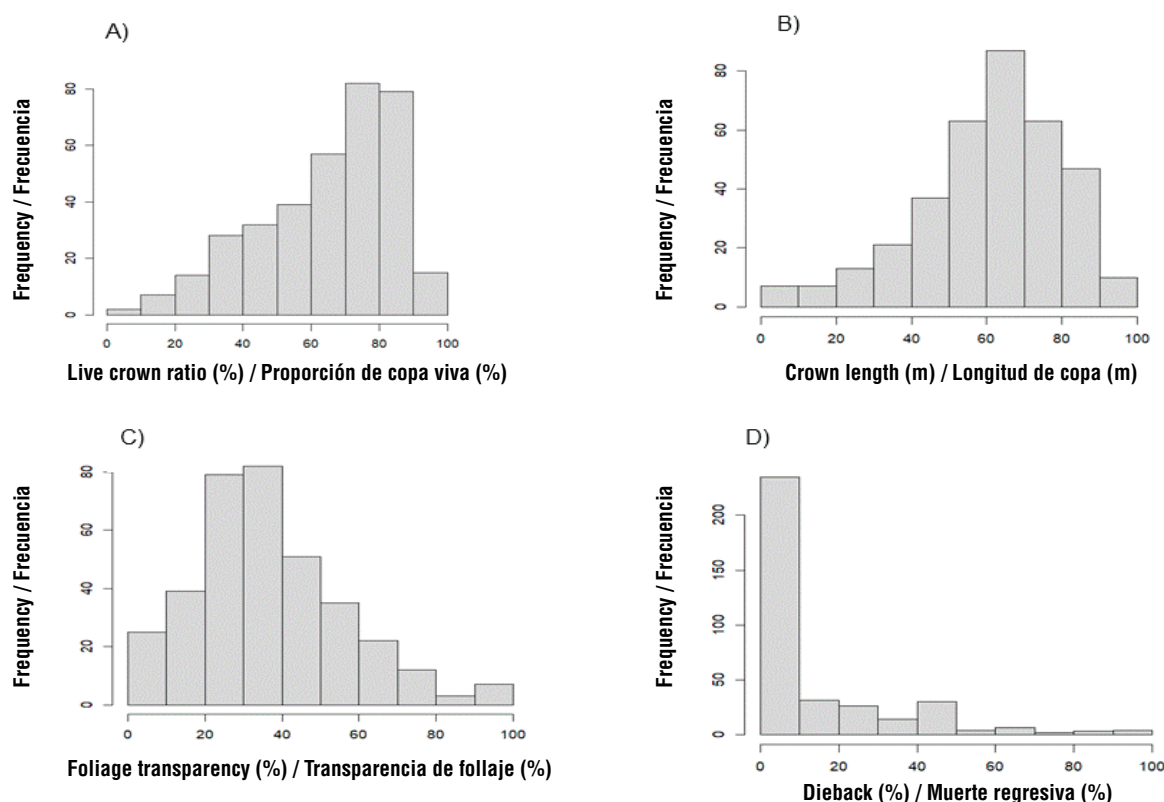


Figure 4. Crown condition variables of *Ficus microcarpa* in Cuernavaca, Morelos, for the period 2022–2023.

Figura 4. Variables de condición de copa de *Ficus microcarpa* en la ciudad de Cuernavaca, Morelos, durante el periodo 2022-2023.

indicates that while the trees seem healthy, they may be at risk of sudden death due to persistent and prolonged stress. Specifically, the continuous stress experienced by urban trees – mainly due to poor planting locations, limited growth space, and inadequate management (Tan & Shibata, 2022) – can increase their susceptibility to pests and diseases (Brace et al., 2020; Percival, 2023; Webb et al., 2023). It is important to note that certain insects are attracted to volatile compounds emitted by stressed plants (Atkinson, 2017). Likewise, some endophytic fungi can become pathogenic when trees are under stress (Hietala et al., 2018). Therefore, crown condition indicators are essential tools for detecting stress, which, as demonstrated, can significantly impact tree health in multiple ways.

Tree damage

Table 2 shows the ten damage agents affecting *F. microcarpa*. The most common issue was reduced growing space, affecting 55.21 % of trees. This category includes trees with limited root growth areas or those surrounded by pavement. The second most frequent damage was topiary, impacting 18 % of individuals. In third place, insect damage caused by species from the suborder Sternorrhyncha affected 15.7 % of trees. Only 1.1 % of the trees were considered free of damage.

(transparencia del follaje, PCV, densidad de copa y muerte regresiva) son herramientas que ayudan en la identificación del estado de salud de los árboles con base principalmente en el grado de estrés, mismo que se puede manifestar de varias maneras y dependerá del factor que lo detona y de la respuesta de la planta (Pontius & Hallett, 2014). De manera general, las copas de *F. microcarpa* en Cuernavaca se encuentran saludables; sin embargo, la transparencia de follaje indica que se encuentran bajo estrés temprano. Aunado a lo anterior, el valor de mortalidad del 8.26 % indica que los árboles se encuentran aparentemente sanos, pero pueden sufrir muerte repentina y súbita, ocasionada por estrés persistente y prolongado. Específicamente, el estrés constante al que los árboles de las ciudades son sometidos, principalmente por la mala ubicación, espacio limitado para el crecimiento y mal manejo (Tan & Shibata, 2022), pueden incrementar la susceptibilidad de los árboles a plagas y enfermedades (Brace et al., 2020; Percival, 2023; Webb et al., 2023). Cabe indicar que algunos insectos son atraídos por compuestos volátiles que las plantas emiten cuando están estresadas (Atkinson, 2017). Asimismo, algunos hongos endófitos pueden comportarse como patógenos si los árboles se encuentran bajo estrés (Hietala et al., 2018). Por lo anterior, las variables del indicador de condición de copa son una herramienta para detectar el estrés que, como se puede apreciar, repercute de varias maneras en la salud de los árboles.

Table 2. Tree damage in *Ficus microcarpa* in the municipality of Cuernavaca, Morelos.
Cuadro 2. Daños del arbolado de *Ficus microcarpa* en el municipio de Cuernavaca, Morelos.

Damage agent / Agente de daño	Trees with damage (%) / Arbolado con daño (%)
Healthy / Sano	1.1
Sternorrhyncha	15.7
<i>Ganoderma</i>	0
Parasitic plants / Plantas parásitas	2.5
Topping / Desmoche	1.9
Topiary / Poda topiaria	18.0
Reduced living space / Espacio vital reducido	55.2
Exposed root / Raíz expuesta	1.4
Spiders / Arañas	2.8
Cankers / Cancros	1.9

The damages contrast with the 37 types reported by Saavedra-Romero et al. (2016) in the San Juan Aragón urban park and the 26 damages recorded by Zaragoza Hernández et al. (2015) in different parks across Mexico City. In both studies, root growth space was not considered a damage factor, whereas in this research, it was the most frequent issue. According to Cibrián et al. (2007), urban trees are primarily affected by abiotic damage, which aligns with the findings of this study.

It has been reported that limited root growth space and water scarcity impact stem diameter, as well as crown diameter and volume, particularly in *F. microcarpa* trees (Amer et al., 2023). Trees surrounded by pavement face significant constraints, including reduced water infiltration (Suárez-Islas & Mateo-Sánchez, 2023) and restricted root growth (Orman-Ligeza et al., 2018). Studies have shown that in the absence of water, abscisic acid is released, suppressing root growth (Mehra et al., 2022). Pavement also increases site temperature, affecting photosynthesis, transpiration, and respiration (Carrillo-Niquete et al., 2022; Chaves-Barrantes & Gutiérrez-Soto, 2016). Another critical factor influencing tree development is soil compaction, which leads to poor aeration, restricting growth and potentially causing hypoxia (Habibi et al., 2023). Additionally, it can promote the formation of shallow, lateral, and thick roots (Hernández-Castro et al., 2021), which may damage urban infrastructure.

Topiary ranked as the second most frequent type of damage, which agrees with the findings of Pino et al. (2022) for trees in Venezuela. This practice disrupts the natural architecture of trees, reduces their environmental services, and diminishes their ability to recover from adverse effects (Zaragoza Hernández et al., 2015). Additionally, it alters the source-demand relationship in carbohydrate translocation (Martínez-

Daños al arbolado

El Cuadro 2 informa los 10 agentes de daño que afectan a *F. microcarpa*. El más frecuente fue el espacio vital reducido con 55.21 %, en el cual se consideraron aquellos árboles en los que el espacio de crecimiento para las raíces es limitado o se encuentra rodeado por pavimento. El segundo daño con mayor presencia fue la poda topiaria con 18 % de individuos afectados. En tercer lugar, el daño por insectos del suborden Sternorrhyncha con 15.7 % de árboles. Únicamente 1.1 % de los árboles se consideraron libres de daños.

Los daños contrastan con los 37 identificados por Saavedra-Romero et al. (2016) en el parque urbano de San Juan Aragón y por Zaragoza Hernández et al. (2015) con 26 daños identificados en diversos parques de la Ciudad de México; en ambos estudios, el espacio de crecimiento de las raíces no fue considerado, siendo que en esta investigación fue el daño más frecuente. De acuerdo con Cibrián et al. (2007), los árboles de las ciudades se ven afectados en su mayoría por daños de origen abiótico, tal como sucede en la presente investigación.

Se ha reportado que el espacio limitado para el desarrollo de raíces, así como la falta de agua, tiene repercusiones en el diámetro del tronco y en el diámetro y volumen de la copa, especialmente en árboles de *F. microcarpa* (Amer et al., 2023). Los árboles rodeados por pavimento enfrentan limitaciones, ya que hay reducción de la infiltración de agua (Suárez-Islas & Mateo-Sánchez, 2023) y restricción del crecimiento de las raíces (Orman-Ligeza et al., 2018); se ha demostrado que, en ausencia de agua, se libera ácido abscísico que suprimen el crecimiento de estas (Mehra et al., 2022). El pavimento también incrementa la temperatura del sitio, afectando la fotosíntesis, transpiración y respiración (Carrillo-Niquete et al., 2022; Chaves-Barrantes & Gutiérrez-Soto,

Trinidad et al., 2013) and affects other physiological processes. Furthermore, the wounds caused by frequent pruning delay the compartmentalization process (Kolařík et al., 2021), leaving trees vulnerable to harmful agents.

Conclusions

In the city of Cuernavaca, *Ficus microcarpa* trees predominantly range between 3 and 5 m in height and have diameters between 20 and 40 cm, classifying them as young-mature trees. Crown condition and tree damage indicators are used to evaluate the health condition of *F. microcarpa*. The crown condition variables suggest that the trees are generally in good health, except for foliage transparency, which indicates a moderate health condition. Foliage transparency is an early stress indicator, likely attributed to the identified damage agents, most of which are abiotic or anthropogenic in origin. It is essential to assess the set of factors that directly influence urban tree development, as city conditions often impose significant limitations on proper tree growth.

Acknowledgments

We thank the Colegio de Postgraduados, the Phytosanitary-Phytopathology program and CONAHCYT for the scholarship granted.

Conflict 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.

End of English version

References / Referencias

- Alanís-Rodríguez, E., Mora-Olivo, A., Molina-Guerra, V. M., Patiño-Flores, A. M., Sigala-Rodríguez, J. Á., Zamudio-Castillo, E., & Rubio-Camacho, E. (2023). Cambios en la composición y diversidad del arbolado urbano de Linares, Nuevo León. *Gayana Botánica*, 80(1), 64–74. <https://doi.org/10.4067/s0717-66432023000100064>
- Alvarado-Rosales, D., Saavedra-Romero, L. L., Franco-Islas, Y., Villa-Castillo, J., & Quiroz-Reygadas, D. A. (2021). Condición de copa de bosques y selvas de México: Análisis 2014. *Madera y Bosques*, 27(1). <https://doi.org/10.21829/myb.2021.2712114>
- Amer, A., Franceschi, E., Hjazin, A., Shoqeir, J. H., Moser-Reischl, A., Rahman, M. A., Tadros, M., Pauleit, S., Pretzsch, H., & Rötzer, T. (2023). Structure and ecosystem services of three common urban tree species in an arid climate city. *Forests*, 14(4), 671. <https://doi.org/10.3390/f14040671>

2016). Otro factor que afecta el desarrollo de los árboles es la compactación del suelo, ya que se presenta baja aireación que afecta el crecimiento del árbol e incluso provoca hipoxia (Habibi et al., 2023) o bien, promueve la generación de raíces superficiales, laterales y gruesas (Hernández-Castro et al., 2021) que pueden afectar la infraestructura de la ciudad.

La poda topiaria ocupó el segundo lugar de frecuencia, coincidiendo con lo reportado por Pino et al. (2022) en árboles de Venezuela. La poda topiaria altera la arquitectura natural de los árboles, reduce sus servicios ambientales y la capacidad de recuperarse de efectos adversos (Zaragoza Hernández et al., 2015); además, provoca alteración en la relación fuente-demanda en la translocación de carbohidratos (Martínez-Trinidad et al., 2013) y otros procesos fisiológicos. Aunado a ello, las heridas ocasionadas por la poda frecuente retrasan el proceso de compartimentación (Kolařík et al., 2021), dejando a los árboles expuestos ante agentes adversos.

Conclusiones

En la ciudad de Cuernavaca predominan árboles de *Ficus microcarpa* con alturas de 3 a 5 m y diámetro entre los 20 y 40 cm, catalogados como árboles jóvenes-maduros. Los indicadores de condición de copa y daños al arbolado contribuyeron a determinar la salud de *F. microcarpa*. Las variables de condición de copa sugieren que los árboles se encuentran con buena salud, con reserva de la variable transparencia de follaje que señala un estado de salud moderado. La transparencia del follaje es un indicador de estrés temprano que puede atribuirse a los agentes de daño localizados, en su mayoría, de origen abiótico y antropogénico. Es importante evaluar el conjunto de factores que intervienen directamente en el desarrollo del arbolado urbano, debido a que las condiciones de las ciudades son frecuentemente limitadas para el crecimiento apropiado de los árboles.

Agradecimientos

Se agradece a Colegio de Postgraduados al programa de Fitosanidad-Fitopatología y al CONAHCYT por la beca otorgada.

Conflicto de intereses

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.

Fin de la versión en español

- Atkinson, T. H. (2017). Familia Curculionidae: Scolytinae. In D. Cibrián-Tovar (Ed.), *Fundamentos de entomología forestal* (1.^a ed., pp. 269–276). Universidad Autónoma Chapingo. https://www.researchgate.net/profile/Dulce-Zetina/publication/337447577_Fundamentos_de_Entomologia_Forestal_Conacyt/links/5e5fdb42a6fdccbeba1c6b44/Fundamentos-de-Entomologia-Forestal-Conacyt.pdf
- Bechtold, W. A., Hoffard, W. H., & Anderson, R. L. (1992). *Summary report: Forest health monitoring in the South, 1991. Forest Service General Technical Reports SE-81*. https://www.srs.fs.usda.gov/pubs/gtr/gtr_se81.pdf
- Bond, J. (2021). Urban tree health what, why, and how. *Arborist News*, 30(1), 46–51. https://urbanforestanalytics.nyc3.digitaloceanspaces.com/Bond_AN-feb20_Health.pdf
- Brace, L. C., Gange, A. C., & Clover, G. R. G. (2020). What are the predominant pests and diseases afflicting gardens in the UK? *Urban Forestry & Urban Greening*, 52, 126706. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2020.126706>
- Carrillo-Niquete, G. A., Casanoca-Domínguez A., & Santamaría, R. (2022). Cuando los árboles se estresan, ayudan menos. *Desde el herbario CICY*, 14, 64–70. http://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/
- Chaves-Barrantes, N. F., & Gutiérrez-Soto, M. V. (2016). Respuestas al estrés por calor en los cultivos. I. Aspectos moleculares, bioquímicos y fisiológicos. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 237. <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.21903>
- Chinchilla, J., Carbonnel, A., & Galleguillos, M. (2021). Effect of urban tree diversity and condition on surface temperature at the city block scale. *Urban Forestry & Urban Greening*, 60, 127069. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2021.127069>
- Cibrián, T. D., Alvarado, R. D., & García, S. E. D. (2007). *Enfermedades forestales de México*. Universidad Autónoma Chapingo.
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). (2017). *Inventario nacional forestal y de suelos. Procedimientos de muestreo*. https://www.conafor.gob.mx/apoyos/docs/externos/2022/DocumentosMetodologicos/2019/ANEXO_Procedimientos_de_muestreo_2019.pdf
- Council of Tree and Landscape Appraisers (CTLA). (2018). *Guide for plant appraisal*. International Society of Arboriculture.
- Fang, F., Greenlee, A. J., He, Y., & Eutsler, E. (2023). Evaluating the quality of street trees in Washington, D.C.: Implications for environmental justice. *Urban Forestry & Urban Greening*, 85, 127947. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2023.127947>
- Habibi, F., Liu, T., Shahid, M. A., Schaffer, B., & Sarkhosh, A. (2023). Physiological, biochemical, and molecular responses of fruit trees to root zone hypoxia. *Environmental and Experimental Botany*, 206, 105179. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.105179>
- Hernández-Castro, W., Badilla-Valverde, Y., Esquivel-Segura, E., & Murillo-Gamboa, O. (2021). Comportamiento de clones de *Gmelina arborea* Roxb. en condiciones de suelo ácidos. *Revista de Ciencias Ambientales*, 55(2), 229–249. <https://doi.org/10.15359/rca.55-2.11>
- Hietala, A. M., Børja, I., Cross, H., Nagy, N. E., Solheim, H., Timmermann, V., & Vivian-Smith, A. (2018). Dieback of European ash: what can we learn from the microbial community and species-specific traits of endophytic fungi associated with ash? In A. Pirttilä, & A. Frank (Eds.), *Endophytes of forest trees. Forestry Sciences*, 86, 229–258. https://doi.org/10.1007/978-3-319-89833-9_11
- Houlden, V., Jani, A., & Hong, A. (2021). Is biodiversity of greenspace important for human health and wellbeing? A bibliometric analysis and systematic literature review. *Urban Forestry & Urban Greening*, 66, 127385. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2021.127385>
- Kolařík, J., Oikawa-Radscheit, J., Dujesiefken, D., Joye, T., Witkos-Gnach, K., Pachnowska, B., Cristini, V., Pietrobon, P., Scherpenzeel, H., Passola, G., Strele, D., Davenis, A., Frano, T., & Huljenic, G. (2021). *Poda de árboles. Estándar europeo de poda de árboles*. Asociación Española de Arboricultura. https://www.aytocoladomediano.es/images/noticias/2023/noviembre/NUEVO-ESTANDAR-EUROPEO-PODA7903-5_compressed.pdf
- Martínez-Trinidad, T., Hernández López, P., López-López, S. F., & Mohedano Caballero, L. (2021). Diversidad, estructura y servicios ecosistémicos del arbolado en cuatro parques de Texcoco mediante i-Tree Eco. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 12(67). <https://doi.org/10.29298/rmcf.v12i67.880>
- Martínez-Trinidad, T., Plascencia-Escalante, F. O., & Islas-Rodríguez, L. (2013). La relación entre los carbohidratos y la vitalidad en árboles urbanos. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 19(3), 459–468. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2012.03.016>
- McPherson, E. G., van Doorn, N. S., & Peper, P. J. (2016). *Urban tree database and allometric equations*. U. S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Southwest Research Station. <http://doi.org/10.2737/PSW-GTR-253>
- Mullaney, J., Lucke, T., & Trueman, S. J. (2015). A review of benefits and challenges in growing street trees in paved urban environments. *Landscape and Urban Planning*, 134, 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2014.10.013>
- Nesbitt, L., Hotte, N., Barron, S., Cowan, J., & Sheppard, S. R. J. (2017). The social and economic value of cultural ecosystem services provided by urban forests in North America: a review and suggestions for future research. *Urban Forestry & Urban Greening*, 25, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2017.05.005>
- Organización de las Naciones Unidas (ONU). (2023). *Informe de los objetivos de desarrollo sostenible. Edición especial. Por un plan de rescate para las personas y el planeta*. https://unstats.un.org/sdgs/report/2023/The-Sustainable-Development-Goals-Report-2023_Spanish.pdf
- Orman-Ligeza, B., Morris, E. C., Parizot, B., Lavigne, T., Babé, A., Ligeza, A., Klein, S., Sturrock, C., Xuan, W., Novák, O., Ljung, K., Fernandez, M. A., Rodriguez, P. L., Dodd, I. C., De Smet, I., Chaumont, F., Batoko, H., Périlleux, C., Lynch, J. P., ... Draye, X. (2018). The xerobranching response represses lateral root formation when roots are not in contact with water. *Current Biology*, 28(19), 3165–3173.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.074>
- Percival, G. C. (2023). Heat tolerance of urban trees A review. *Urban Forestry & Urban Greening*, 86, 128021. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2023.128021>
- Pino, M. Y., Rangel, R., Quintana, L. M., & Gómez, A. (2022). Caracterización florística y condición actual del arbolado

- urbano, El Vigía, Mérida – Venezuela. *Recursos Rurais*, 18, 17–30. <https://doi.org/10.15304/rr.id8568>
- Pontius, J., & Hallett, R. (2014). Comprehensive methods for earlier detection and monitoring of forest decline. *Forest Science*, 60(6), 1156–1163. <https://doi.org/10.5849/forsci.13-121>
- Ramírez-Rodríguez, R., Ocampo-Bautista, F., Rojas-Flores, B. M., Flores-Franco, G., Tovar-Sánchez, E., & Sánchez-Popoca, A.D. (2020). Flora arbórea no nativa, un potencial riesgo para la biodiversidad. In CONABIO (Ed.), *La biodiversidad en Morelos. Estudio de estado* (vol. 2, pp. 234–240). https://appsds.morelos.gob.mx/storage/app/public/pdf/La%20biodiversidad%20en%20Morelos_Vol_III.pdf
- Randolph, K., & Bechtold, W. (2018). *FIA Crown Analysis Guide Version 2.0*. <https://www.fs.usda.gov/srsfia/crowns/Crown%20Analysis%20Guide%20v2.pdf>
- Román-Guillén, L. M., Orantes-García, C., Del Carpio-Penagos, C. U., Sánchez-Cortés, M. S., Ballinas-Aquino, M. L., & Farrera-Sarmiento, Ó. (2019). Diagnóstico del arbolado de alineación de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. *Madera y Bosques*, 25(1). <https://doi.org/10.21829/myb.2019.2511559>
- Saavedra-Romero, L. L., Alvarado-Rosales, D., Hernández-de la Rosa, P., Martínez-Trinidad, T., Mora-Aguilera, G., & Villa-Castillo, J. (2016). Condición de copa, indicador de salud en árboles urbanos del Bosque San Juan de Aragón, Ciudad de México. *Madera y Bosques*, 22(2), 15–27. <https://doi.org/10.21829/myb.2016.2221321>
- Schomaker, M. E., Zarnoch, S. J., Bechtold, W. A., Latelle, D. J., Burkman, W. G., & Cox, S. M. (2007). *Crown-condition classification: a guide to data collection and analysis*. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Research Station. <https://doi.org/10.2737/SRS-GTR-102>
- Suárez-Islas, A., & Mateo-Sánchez, J. J. (2023). El arbolado urbano en la gestión del agua pluvial. In A. Ortiz-Lazcano, & J. Medina-Marín (Eds.), *Agua para la vida* (1.ª ed., pp. 37–52). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Tan, X., & Shibata, S. (2022). Factors influencing street tree health in constrained planting spaces: Evidence from Kyoto City, Japan. *Urban Forestry & Urban Greening*, 67, 127416. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2021.127416>
- USDA Forest Service. (2013). *I-Tree Eco User's Manual V 5.0*. www.itreetools.org
- USDA Forest Service. (2016). *Forest inventory and analysis strategic plan*. <https://research.fs.usda.gov/understory/forest-inventory-and-analysis-strategic-plan>
- Webb, C. R., Avramidis, E., Castle, M. D., Stutt, R.O.H., & Gilligan, C. A. (2023). Modelling the spread of tree pests and pathogens in urban forests. *Urban Forestry & Urban Greening*, 86, 128036. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2023.128036>
- Zaragoza Hernández, A. Y., Cetina Alcalá, V. M., López López, M. Á., Chacalo Hilú, A., Isla de Bauer, M. L., Alvarado Rosales, D., & González Rosas, H. (2015). Identificación de daños en el arbolado de tres parques del Distrito Federal. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 5(25), 34–51. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322015000600063&lng=es&tln=es

Storage alternatives for *Quercus durifolia* Seemen acorns

Alternativas de almacenamiento de bellotas de *Quercus durifolia* Seemen

Rosa E. Madrid-Aispuro¹; José Á. Prieto-Ruíz^{2*}; Arnulfo Aldrete¹;
Silvia Salcido-Ruíz²; José Á. Sigala-Rodríguez³

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Posgrado en Ciencias Forestales. Carretera México-Texcoco km 36.5. C. P. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

²Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Río Papaloapan y bulevar Durango s/n, col. Valle del Sur. C. P. 34120. Durango, Durango, México.

³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle del Guadiana. Carretera Durango-Mezquital km 4.5. C. P. 34170. Durango, Durango, México.

*Corresponding author: jprieto@ujed.mx; tel.: +52 618 136 1952.

Abstract

Introduction. Understanding the optimal conditions for acorn storage is essential for their subsequent use in nursery plant production.

Objectives. To evaluate the effect of storage media on germination of *Quercus durifolia* acorns.

Materials and Methods. The following storage media were evaluated for acorns: 1) fresh pine sawdust, 2) perlite, 3) peat moss, 4) vermiculite, and 5) control (without substrate). Transparent 250 mL plastic containers were used as storage containers. The acorns were placed in containers mixed with the storage medium and stored at 5 °C for six months. The variables analyzed were cumulative germination percentage and germination speed index.

Results and discussion. From the first month, the fresh sawdust treatment had the lowest percentage of rotten seeds (30 %) and the highest germination rate (76 %), which decreased to 58 % by the end of the storage period. In contrast, acorns stored in perlite, vermiculite, and without substrate showed no germination after six months. For peat moss, germination values ranged from 31 to 20.3 %; seeds stored in this medium, along with those in the control showed a drastic reduction in the germination speed index (8.6 and 13.0, respectively).

Conclusions. Acorns stored in fresh sawdust at 5 °C had the highest germination rate. This study provides a cost-effective alternative to prolong acorn viability for nursery plant production, reforestation, and restoration with this species.

Keywords: sawdust; oak; germination; peat moss; viability.

Resumen

Introducción. El conocimiento de las condiciones óptimas de conservación de bellotas es necesario para su uso posterior en la producción de planta en vivero.

Objetivos. Evaluar el efecto de medios de almacenamiento sobre la germinación de bellotas de *Quercus durifolia*.

Materiales y métodos. Se evaluaron los siguientes medios de almacenamiento de las bellotas: 1) aserrín fresco de pino, 2) perlita, 3) turba de musgo, 4) vermiculita y 5) testigo (sin sustrato). Como recipientes se usaron frascos de plástico transparente de 250 mL. Las bellotas se colocaron en los depósitos mezcladas con el medio y se almacenaron durante seis meses a 5 °C. Las variables evaluadas fueron porcentaje de germinación acumulada e índice de velocidad de germinación.

Resultados y discusión. Desde el primer mes, el tratamiento con aserrín fresco mostró el menor porcentaje de semillas podridas (30 %) y el valor máximo de germinación (76 %), el cual disminuyó a 58 % al final del periodo. Por el contrario, las bellotas conservadas en perlita, vermiculita y sin sustrato no manifestaron germinación al sexto mes. En el caso de la turba se registraron valores de 31 a 20.3 %; las semillas de este sustrato, junto con las del testigo, presentaron reducción drástica en el índice de velocidad de germinación (8.6 y 13.0, respectivamente).

Conclusiones. Las bellotas almacenadas en aserrín fresco a 5 °C tuvieron la mayor tasa de germinación. Este estudio proporciona una alternativa económica para prolongar la viabilidad de las bellotas con fines de producción de plantas en vivero, reforestación y restauración con la especie.

Palabras clave: aserrín; encino; germinación; turba; viabilidad.

Introduction

The *Quercus* genus is highly significant because of its great diversity as well as its ecological and economic importance (Rodríguez-Trejo & García-Pascual, 2021). Mexico is home to about 170 species of *Quercus* (De Jesús Albino et al., 2021), with 109 of them being endemic (Ramírez-Roacho et al., 2021). These species inhabit the country's temperate and semi-humid ecosystems, as well as some tropical and subtropical regions (Rodríguez-Trejo & García-Pascual, 2021). Unfortunately, abundance and distribution of oak populations have declined due to land use changes, expansion of agriculture, livestock farming, and urbanization (Rodríguez-Acosta & Coombes, 2020), coupled with the effects of climate change such as temperature increase and precipitation reduction.

In some cases, the natural regeneration rate of oaks is low due to various factors. On one hand, the seeds are recalcitrant, sensitive to dehydration and causing them to lose viability quickly after dispersal. To maintain viability, the seeds must germinate under conditions with moisture levels above 30 %; however, this condition usually is not consistent with seed dispersal events, leading to dehydration and eventual loss of viability in less than three months (González-Salvatierra et al., 2013). Furthermore, dehydration is accelerated when acorns fall onto bare soil without leaf litter, exposing them to adverse environmental conditions such as direct sunlight and wind, which rapidly reduces their viability (Zavala-Chávez, 2004). Moreover, acorns are subject to predation, as they are an important food source for wildlife during the fall and winter (Aguilar-Peralta et al., 2016); they are also damaged in the pre-dispersal stage by pests such as weevils, moths, and borers (Díaz-Guzmán & Bonfil, 2020), which affect their germination capacity (Clark-Tapia et al., 2018). As a result of these adverse factors, percentage of acorns available and viable for regeneration is low, sometimes as little as 1 % (Barragán-Zúñiga et al., 2020).

Extending the viability of acorns represents a significant challenge in the management of oak germplasm for reproduction in nurseries. In Mexico, studies on acorn storage are limited; some of these include those conducted by Zavala-Chávez (2008) on *Quercus rugosa* Née and *Quercus glabrescens* Benth., Díaz-Pontones and Reyes-Jaramillo (2009) on *Quercus hintonii* Warburg, and González-Salvatierra et al. (2013) on *Quercus polymorpha* (Schltdl. & Cham.).

In Mexico, reforestation programs that use oaks rely on plants produced in nurseries from acorns collected in the field, ensuring their reproduction (González-Salvatierra et al., 2013). However, the conservation of acorns with viability for more than

Introducción

El género *Quercus* es de gran interés debido a su alta diversidad e importancia ecológica y económica (Rodríguez-Trejo & García-Pascual, 2021). Tan solo en México se reportan alrededor de 170 especies (De Jesús Albino et al., 2021), de las cuales 109 son endémicas (Ramírez-Roacho et al., 2021). Estas habitan en ecosistemas templados y semihúmedos del país, así como en algunas regiones tropicales y subtropicales (Rodríguez-Trejo & García-Pascual, 2021). Desafortunadamente, la abundancia y distribución de las poblaciones de encino han disminuido, debido a los cambios en el uso del suelo, la expansión de la agricultura y ganadería, así como la urbanización (Rodríguez-Acosta & Coombes, 2020), aunados a los efectos del cambio climático como el aumento de temperatura y la reducción de precipitación.

En algunos casos, la tasa de regeneración natural de los encinos es baja debido a diversas causas. Por un lado, las semillas son recalcitrantes, lo que las hace sensibles a la deshidratación y que pierdan viabilidad rápidamente después de su diseminación. Para que la viabilidad se mantenga, se requiere que las semillas germinen en condiciones de humedad superior al 30 %; sin embargo, dicha condición, usualmente, no coincide con los eventos de dispersión de las semillas, lo que provoca la deshidratación y, eventualmente, la pérdida de viabilidad en lapsos menores de tres meses (González-Salvatierra et al., 2013). Además, la deshidratación se acelera cuando las bellotas caen en suelos desnudos y sin hojarasca, pues quedan expuestas a condiciones ambientales adversas como la luz solar directa y el viento, lo que reduce la viabilidad rápidamente (Zavala-Chávez, 2004). Por otra parte, las bellotas son objeto de depredación, ya que son una fuente importante de alimento para la fauna silvestre durante el otoño e invierno (Aguilar-Peralta et al., 2016); asimismo, son dañadas en la etapa de predispersión por plagas como gorgojos, palomillas y barrenadores (Díaz-Guzmán & Bonfil, 2020) que afectan su capacidad de germinación (Clark-Tapia et al., 2018). Como resultado de estos factores adversos, el porcentaje de bellotas disponibles y viables para la regeneración es bajo, a veces solo del 1 % (Barragán-Zúñiga et al., 2020).

La prolongación de la viabilidad de las bellotas representa un desafío significativo en el manejo del germoplasma de encinos para su reproducción en viveros. En México, los estudios sobre el almacenamiento de bellotas son escasos; algunos de ellos son los realizados por Zavala-Chávez (2008) en *Quercus rugosa* Née y *Quercus glabrescens* Benth., Díaz-Pontones y Reyes-Jaramillo (2009) en *Quercus hintonii* Warburg, y el de González-Salvatierra et al. (2013) en *Quercus polymorpha* (Schltdl. & Cham.).

three months requires moisture levels of 30 to 50 % of the seed's fresh weight and the control of essential factors such as relative humidity, temperature, and aeration (Rodríguez-Trejo & García-Pascual, 2021). Low temperatures (1 to 7 °C) and control of gas exchange promote viability (Bonner, 2003); however, when temperatures are too low or the absence of gas exchange is total, it can lead to embryo death (Rodríguez-Trejo & García-Pascual, 2021). To promote aeration, the use of open containers or those with openings that allow air circulation is recommended (Aguilera-Rodríguez et al., 2023). Based on this, the medium in which acorns are stored is crucial, because it fulfills two functions: 1) maintaining a constant high moisture content in the seed, and 2) allowing enough oxygen diffusion to the moist seeds (Hong & Ellis, 2010).

Quercus durifolia Seemen is important in the pine-oak forests of the Sierra Madre Occidental, as the species is found in areas that are part of the transition between grasslands and pine-oak forests (González-Elizondo et al., 2012). Moreover, the wood is highly recommended for the manufacture of furniture and visible parts (moldings) of high-quality upholstered furniture, as well as to produce charcoal (García Molina, 2008). Oaks have been widely studied in relation to their ecology, conservation, and use, but little is known about acorn storage, reproduction, and reforestation aspects (Rosaliano-Evaristo et al., 2024).

In this context, information on the conservation of oak acorns remains limited; therefore, it is necessary to understand the optimal environmental conditions for storage to maintain viable seeds and produce vigorous plants with good morphological quality, in accordance with nursery quality indicators and establishment in the field for reforestation and restoration purposes. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of storage media, including fresh pine sawdust, perlite, peat moss, and vermiculite, on the germination capacity of *Q. durifolia* acorns.

Materials and Methods

Seed collection

Seeds were collected from a natural stand with predominant pine-oak vegetation, located in the ejidos of Estación Otinapa and San Carlos, Durango municipality, Durango, Mexico, at coordinates 24° 03' 27" N and 105° 00' 54" W, at an altitude of 2 397 m. The collection took place between October 25 and 30, 2022, from three mature trees with an average height of 12 to 15 m, spaced 150 m apart. This distance was maintained because species of the *Quercus* genus are prone to hybridization due to their high genetic diversity, allowing them to cross with nearby species with similar genetic traits (González-Rodríguez et al., 2004).

En México, los programas de reforestación que utilizan encinos dependen de las plantas producidas en vivero, a partir de bellotas recolectadas en campo, lo que garantiza su reproducción (González-Salvatierra et al., 2013). No obstante, la conservación de bellotas por períodos mayores de tres meses, con viabilidad, requiere humedad del 30 a 50 % del peso húmedo de la semilla y el control de factores esenciales de humedad relativa, temperatura y aireación (Rodríguez-Trejo & García-Pascual, 2021). Las temperaturas bajas (1 a 7 °C) y el control del intercambio gaseoso favorecen la viabilidad (Bonner, 2003); sin embargo, cuando son demasiado bajas o la ausencia de intercambio gaseoso es total pueden provocar la muerte del embrión (Rodríguez-Trejo & García-Pascual, 2021). Para favorecer la aireación se recomienda el uso de recipientes abiertos o con aperturas que permitan la circulación del aire (Aguilera-Rodríguez et al., 2023). Con base en lo anterior, el medio donde se guardan las bellotas es importante, ya que cumple dos funciones: 1) mantener constante el contenido alto de humedad de la semilla y 2) permitir la difusión de oxígeno suficiente a las semillas húmedas (Hong & Ellis, 2010).

Quercus durifolia Seemen es importante en los bosques de pino-encino de la Sierra Madre Occidental, ya que la especie se encuentra en zonas que forman parte de la transición entre el zacatal y el bosque de pino-encino (González-Elizondo et al., 2012); además, la madera es altamente recomendable para la fabricación de muebles y partes visibles (molduras) de muebles tapizados de alta calidad, así como para la elaboración de carbón vegetal (García Molina, 2008). Los encinos han sido más estudiados con relación a su ecología, conservación y uso, pero poco se conoce sobre los aspectos de almacenamiento de bellotas, reproducción y reforestación (Rosaliano-Evaristo et al., 2024).

En tal contexto, la información sobre la conservación de bellotas de encinos es todavía insuficiente; por tanto, se requiere conocer las condiciones medioambientales óptimas de almacenamiento, para mantener semillas viables y obtener plantas vigorosas de buena calidad morfológica, acorde con los indicadores de calidad en vivero y su establecimiento en campo con fines de reforestación y restauración. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de medios de almacenamiento a base de aserrín fresco de pino, perlita, turba de musgo y vermiculita sobre la capacidad germinativa de bellotas de *Q. durifolia*.

Materiales y métodos

Recolección de la semilla

La semilla se recolectó en un rodal natural con vegetación predominante de pino-encino, ubicado en el ejido Estación Otinapa y San Carlos, municipio de Durango, Durango, México, en las coordenadas 24° 03'

Collected acorns (sample of 40 acorns) had an average polar and equatorial diameter of 1.26 ± 0.2 cm and 0.81 ± 0.1 cm, respectively, measured with a Truper® digital caliper. A total of 1 492 acorns·kg⁻¹ were obtained, corresponding to 0.670 kg per 1 000 seeds. Moisture content (MC) on a dry weight basis was 31.2 %, calculated using the equation proposed by Liegel and Venator (1987): $MC \% = [(FSW - DM)/FSW] * 100$; where, FSW and DM are the fresh weight and dry weight (g) of the sample, respectively. The acorns were dried in four 10 g seed samples in an oven (Ecoshel® model 9024A) at 103 °C for 17 hours; averages were estimated using the obtained values.

Treatments evaluated and storage process

This study was carried out in the multipurpose laboratory of the Faculty of Forest and Environmental Sciences at the Universidad Juárez del Estado de Durango (24° 00' 47" N, 104° 40' 57" W, at an altitude of 1809 m). The following storage media for acorns were evaluated: 1) fresh pine sawdust, 2) expanded perlite (Multiperl®, Grupo Perlita, Mexico), 3) peat moss (Premier®, Premier Horticulture Inc., Canada), 4) vermiculite (Hydro Environment®, Mexico), and 5) control (no substrate). The seeds collected were subjected to a flotation test in water, with those that floated being discarded (Bonner, 2003), and it was visually confirmed that they were healthy, without insect damage (such as small perforations in the pericarp).

Before storage, the seed coats and plastic containers (250 mL) were disinfected with a 10 % commercial sodium hypochlorite solution and purified water to prevent fungal damage. The seeds were immersed in the solution for 10 minutes, then rinsed with drinking water to remove any chlorine residue. Fresh pine sawdust was disinfected using the same solution, then placed in a drying oven (Ecoshel® model 9024A) at 60 °C for 24 hours. Prior to placing the seeds in the storage media, the materials were humidified with purified water, to which 1 g·L⁻¹ of the fungicide Thiabendazole (Tecto 60®, Syngenta, Mexico) was added to prevent fungal damage. The water was applied using a 1 L sprayer. Additionally, the amount of water retained in each substrate was measured (sawdust: 65.0 mL, perlite: 101.2 mL, peat moss: 114.4 mL, and vermiculite: 68.0 mL). Moisture was considered adequate when the particles of each material were moist but not compacted.

The storage media were placed in plastic containers; a layer of substrate was first added, followed by a layer of seeds, and so on (Figure 1). In each treatment, 600 seeds were placed, distributed in four containers (replicates) with 150 seeds each. Subsequently,

27° N y 105° 00' 54" O, a una altitud de 2 397 m. La recolección se hizo entre el 25 y 30 de octubre de 2022 de tres árboles superiores con altura de 12 a 15 m en promedio y separados a 150 m de distancia, ya que las especies del género *Quercus* llegan a hibridar debido a que tienen alta diversidad genética, lo que les permite cruzarse con especies cercanas de características genéticas afines (González-Rodríguez et al., 2004).

Las bellotas recolectadas (muestra de 40 bellotas) tuvieron en promedio 1.26 ± 0.2 y 0.81 ± 0.1 cm de diámetro polar y ecuatorial, respectivamente, medido con un vernier digital Truper®. Se obtuvieron 1 492 bellotas·kg⁻¹, lo que corresponde a 0.670 kg por cada 1 000 semillas. El contenido de humedad (CH) base anhidra fue 31.2 %, obtenido con la ecuación propuesta por Liegel y Venator (1987): $CH \% = [(PHM - PSM)/PHM] * 100$; donde, PHM y PSM son el peso húmedo y peso seco (g) de la muestra, respectivamente. El secado de las bellotas se hizo en cuatro muestras de 10 g de semilla en un horno (marca Ecoshel® modelo 9024A) a 103 °C durante 17 horas; con los valores obtenidos se estimaron los promedios.

Tratamientos evaluados y proceso de almacenamiento

El estudio se desarrolló en el laboratorio de usos múltiples de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad Juárez del Estado de Durango (24° 00' 47" N, 104° 40' 57" O y 1 809 m de altitud). Se evaluaron los siguientes medios de almacenamiento de las bellotas: 1) aserrín fresco de pino, 2) perlita mineral expandida (Multiperl®, Grupo Perlita, México), 3) turba de musgo *Peat moss* (Premier®, Premier Horticulture Inc., Canadá), 4) vermiculita (Hydro Environment®, México) y 5) testigo (sin sustrato). Las semillas recolectadas se sometieron a una prueba de flotación en agua, se descartaron las que flataron (Bonner, 2003) y se verificó visualmente que estuvieran sanas, sin daño por insectos (perforación pequeña en el pericarpio).

Previo al almacenamiento, la testa de la semilla y recipientes de plástico (250 mL) se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 10 % y agua purificada para prevenir daños causados por hongos; las semillas se sumergieron en la solución durante 10 minutos y luego se enjuagaron con agua potable para eliminar los residuos de cloro. El aserrín fresco de pino se desinfectó con la misma solución, posteriormente se puso en un horno de secado (marca Ecoshel® modelo 9024A) a 60 °C durante 24 h. Antes de colocar las semillas en los medios de almacenamiento, estos se humedecieron con agua purificada, a la cual se añadió 1 g·L⁻¹ de fungicida Tiabendazol (Tecto 60®, Syngenta, México) para evitar daños por hongos. El agua se aplicó con un recipiente rociador de 1 L;

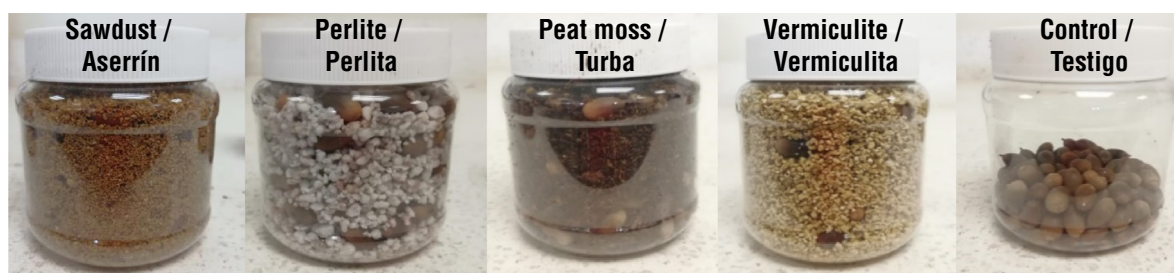


Figure 1. Media evaluated for the storage of *Quercus durifolia* acorns at 5 °C

Figura 1. Medios evaluados para el almacenamiento de bellotas de *Quercus durifolia* a 5 °C.

following the methodology proposed by Díaz-Pontones and Reyes-Jaramillo (2009), the sealed containers were stored at 5 °C.

Germination test

To assess the effectiveness of the treatments, germination tests were conducted monthly over six months. In each test, 25 seeds were randomly selected from each replicate of the treatments (100 seeds per treatment). These seeds were placed on a sheet of absorbent paper and then placed in plastic bags inside a controlled environment chamber (ECOSHEL® cultivation oven, Model 9052) at 28 °C (Figure 2), following the International Rules for Seed Testing (International Seed Testing Association [ISTA], 2016). To prevent fungal attack, a fungicide solution composed of N-tricloromethylthio-4-cyclohexene-1,2-dicarboximide (Captan 50®, ADAMA, Israel) at a rate of g·L⁻¹ of water was applied using a 1 L sprayer. During the test, humidity was kept constant by spraying this solution.

From the start, germination was recorded every two days for a period of 14 days, subsequently, there was no more seedling emergence. A seed was considered germinated when the radicle reached a length of at least 1 cm (ISTA, 2016), and an acorn was considered rotten when the pericarp turned black and, when split in half, the cotyledons also showed a dark brown to black color.

Response variables

The cumulative germination percentage (CGP), average of the six evaluations, was calculated using the following equation: $CGP = (\text{Number of germinated seeds} / \text{Total number of seeds}) * 100$. Germination speed index (GSI) was determined using the following equation: $GSI = \sum(n_i/t_i)$; where, n_i is the number of seeds that germinated from the first to the last day, and t_i is the time in days (from the day the seeds were placed to germinate until the last evaluation day) (Maguire, 1962). Moreover, the cumulative percentage of rotten seeds was recorded over the six-month evaluation period.

asimismo, se midió la cantidad de agua retenida en cada sustrato (aserrín: 65.0 mL, perlita: 101.2 mL, turba: 114.4 mL y vermiculita: 68.0 mL). La humedad se consideró adecuada cuando las partículas de cada material estuvieron húmedas, pero sin compactarse.

Los medios de almacenamiento se pusieron en los recipientes de plástico; primero se puso una capa del sustrato, enseguida una de semillas, y así sucesivamente (Figura 1). En cada tratamiento se colocaron 600 semillas, distribuidas en cuatro frascos (repeticiones) con 150 semillas. Posteriormente, con base en la metodología propuesta por Díaz-Pontones y Reyes-Jaramillo (2009), los recipientes cerrados herméticamente se almacenaron a 5 °C.

Pruebas de germinación

Para evaluar la efectividad de los tratamientos, se hicieron pruebas de germinación mensualmente durante seis meses. En cada prueba se extrajeron aleatoriamente 25 semillas de cada repetición de los tratamientos (100 semillas por tratamiento). Estas se colocaron sobre un pliego de papel absorbente y se introdujeron en bolsas de plástico dentro de una cámara de ambiente controlado (estufa de cultivo ECOSHEL®, Modelo 9052) a 28 °C (Figura 2), conforme a las Reglas Internacionales para el Análisis de Semillas (International Seed Testing Association [ISTA], 2016). Para prevenir ataque por hongos se aplicó una solución fungicida compuesta por N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida (Captán 50®, ADAMA, Israel) a razón de 1 g·L⁻¹ de agua con un recipiente rociador de 1 L. Durante la prueba se mantuvo la humedad constante mediante pulverizaciones con esta solución.

A partir de su inicio, la germinación se registró cada dos días durante un periodo de 14 días; posteriormente, ya no hubo emergencia de plántulas. Se consideró una semilla germinada cuando la radícula de la semilla alcanzó longitud de al menos 1 cm (ISTA, 2016) y se asumió que una bellota estaba podrida cuando la testa se puso de color negro y, al ser dividida por la mitad, los cotiledones tenían también un color pardo oscuro a negro.

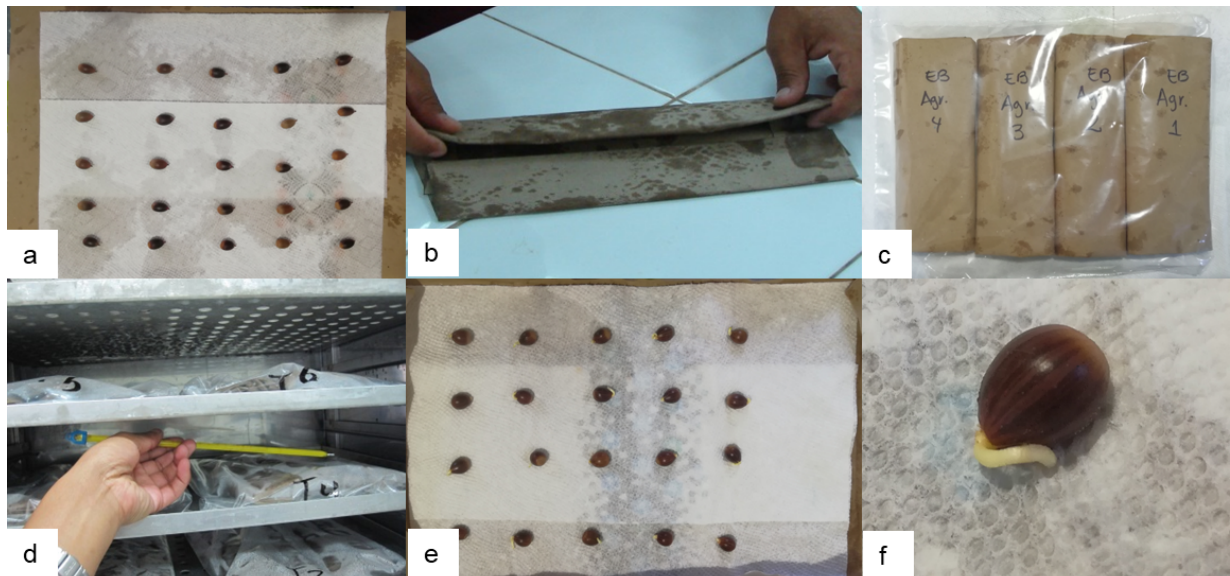


Figure 2. Germination process of *Quercus durifolia* acorns. a) Placing seeds on absorbent paper, b) preparing paper wrappings with moistened seeds, c) arranging wrapped seeds in plastic bags to retain moisture, d) positioning a thermometer to monitor the temperature in the germination chamber, e) counting germinated seeds, f) germinated acorn.

Figura 2. Proceso de germinación de bellotas de *Quercus durifolia*. a) Colocación de semillas en papel absorbente, b) preparación de envoltorios del papel con las semillas humedecidas, c) acomodo de las semillas enrolladas en bolsas de plástico para que conserven la humedad, d) colocación de termómetro para registrar la temperatura en la cámara de germinación, e) conteo de semillas germinadas, f) bellota germinada.

Experimental design and statistical analysis

The experimental design was completely randomized with four replications (150 seeds) per treatment (600 seeds in total). Results were subjected to a non-parametric analysis of variance (Kruskal-Wallis test) due to the violation of normality and homogeneity of variance assumptions ($p \leq 0.05$) assessed using the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. For variables showing statistical differences, Dunn's median comparison test was performed, which follows a chi-square (X^2) distribution. The analyses were conducted using the InfoStat software (InfoStat, 2020).

Results and Discussion

Temporal variation in germination

Germination of *Q. durifolia* acorns was statistically different ($p \leq 0.05$; $gl = 4$; $X^2 = 10.3$) among treatments during the monthly evaluations (Table 1). From the first month, the treatment with fresh sawdust had the highest germination rate (69 %), which decreased by only 10 % after six months of storage. In contrast, acorns stored in perlite, vermiculite, and without a substrate showed no signs of seedling emergence after sixth months. For the peat treatment, germination values ranged from 31 to 20.3 % at the end of the evaluation period.

Variables respuesta

El porcentaje de germinación acumulada (PG), promedio de las seis evaluaciones, se calculó mediante la ecuación siguiente: $PG = (\text{Número de semillas germinadas} / \text{Número total de semillas}) * 100$. El índice de velocidad de germinación (IVG) se determinó con la ecuación siguiente: $IVG = \sum(n_i/t_i)$; donde, n_i es el número de semillas germinadas desde el primer al último día y t_i es el tiempo en días (desde el día que fueron puestas a germinar hasta el último día de evaluación) (Maguire, 1962). Además, se obtuvo el porcentaje acumulado de semillas podridas, durante los seis meses de evaluación.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones (150 semillas) por tratamiento (600 semillas). Los resultados se sometieron a un análisis de varianza no paramétrico (prueba de Kruskal-Wallis) por el incumplimiento de los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas ($p \leq 0.05$) mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. En las variables con diferencias estadísticas se hizo una prueba de comparación de medianas de Dunn, la cual sigue una distribución de tipo X^2 . Los análisis se realizaron con el programa InfoStat (InfoStat, 2020).

Table 1. Germination of *Quercus durifolia* acorns (%) in five storage media evaluated during six months.**Cuadro 1. Germinación de bellotas de *Quercus durifolia* (%) en cinco medios de almacenamiento durante seis meses de evaluación.**

Treatment/ Tratamiento	Months of storage/ Meses de almacenamiento					
	1	2	3	4	5	6
Control/ Testigo	32.0 ± 12.5 ab	26.0 ± 15.1 b	25.0 ± 13.7 b	20.0 ± 11.2 c	4.0 ± 2.3 b	0.0 ± 0.0 c
Sawdust/ Aserrín	69.0 ± 2.5 a	76.0 ± 4.3 a	69.0 ± 4.4 a	72.0 ± 7.7 a	72.0 ± 6.5 a	58.0 ± 3.5 a
Perlite/ Perlita	37.0 ± 8.1 ab	42.0 ± 6.2 ab	48.0 ± 14.0 ab	55.0 ± 11.4 abc	43.0 ± 16.0 ab	0.0 ± 0.0 c
Peat moss/ Turba	27.0 ± 5.0 b	31.0 ± 9.7 ab	25.0 ± 1.0 b	29.0 ± 3.4 bc	26.0 ± 7.4 ab	20.3 ± 7.0 b
Vermiculite/ Vermiculita	55.0 ± 10.5 ab	36.0 ± 15.6 ab	45.0 ± 10.0 ab	63.0 ± 11.7 ab	38.3 ± 18.2 ab	0.0 ± 0.0 c
P value/ Valor p	0.0175	0.0456	0.0375	0.0067	0.0140	0.0001

Means (± standard error) with different letters indicate statistically significant differences among treatments according to Dunn's median test ($p \leq 0.05$).

Medias (± error estándar) con letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos según la prueba de medianas de Dunn ($p \leq 0.05$).

Reduction in acorn germination capacity can be attributed to their recalcitrant nature, which, during storage, leads to a depletion of reserve tissues to the point where essential processes for germination decrease or cease (Jaganathan et al., 2024). For this reason, achieving high germination rates beyond one year of storage is challenging. Zavala-Chávez (2004) reported that *Q. rugosa* acorns maintained over 80 % viability for up to four months when stored at 5 to 7 °C in sealed plastic bags, but this rate dropped to around 30 % after just under one year of storage. Similarly, Pasquini et al. (2011) stored *Quercus ilex* L. acorns in peat moss for one year and observed low vigor and germination rates, as well as high electrolyte leakage and moisture content. These results are consistent with those of the present study, likely because peat moss retains high moisture content (Landis et al., 2022), which caused the acorns to deteriorate due to oxidative damage during their metabolism.

In this regard, a key aspect to consider when storing acorns is moisture control, which is influenced by the type of material used. In the case of peat moss, a higher amount of water was added (114.4 mL), and since particles are very fine, they adhered to the acorns, potentially causing oxidation and resulting in low seedling emergence after sixth months. Conversely, 101.2 mL of water was added to the perlite, but germination was null by the end of the evaluation, possibly because water tends to adhere to the surface of the particles, absorbing little moisture (Landis et al., 2022). This suggests that acorns likely lost their physiological germination capacity due to water loss and embryo dehydration (Kang et al., 2023). On the other hand, although vermiculite retains large amounts of water (Monsalve Camacho et al., 2021), a smaller amount was added (68 mL), which resulted

Resultados y discusión

Variación temporal de la germinación

La germinación de los frutos de *Q. durifolia* fue estadísticamente diferente ($p \leq 0.05$; $gl = 4$; $X^2 = 10.3$) entre tratamientos durante las evaluaciones mensuales (Cuadro 1). Desde el primer mes, el tratamiento con aserrín fresco mostró el valor máximo de germinación (69 %), el cual disminuyó solo 10 % después de seis meses de almacenamiento. Por el contrario, las bellotas puestas en perlita, vermiculita y sin sustrato no manifestaron indicios de generación de plántulas al sexto mes. En el caso de la turba, se registraron valores de 31 a 20.3 % al final del período de evaluación.

La reducción de la capacidad germinativa de las bellotas se puede entender por su característica recalcitrante que, en almacenamiento, propicia la reducción de los tejidos de reserva hasta el punto en que los procesos esenciales para la germinación disminuyen o dejan de ocurrir (Jaganathan et al., 2024). Por esta razón, es difícil conseguir porcentajes altos de germinación más allá de un año de almacenamiento. Por ejemplo, Zavala-Chávez (2004) señala que las bellotas de *Q. rugosa* pueden durar cuatro meses con más de 80 % de viabilidad a temperaturas de 5 a 7 °C en bolsas de plástico selladas, pero se reduce a cerca de 30 % en poco menos de un año de almacenamiento. Asimismo, Pasquini et al. (2011) almacenaron bellotas de *Quercus ilex* L. en turba durante un año y determinaron que las semillas tuvieron vigor y porcentaje germinativo bajos, así como fuga de electrolitos y humedad altos. Estos resultados son similares a los de la presente investigación, probablemente porque la turba tiene retención de humedad alta (Landis et al., 2022) que provocó que las bellotas se deterioren por daño oxidativo durante su metabolismo.

in a significant decrease in germination percentage between the fifth and the sixth month. In contrast, fresh sawdust maintained acorn viability above 50 % for at least six months, despite receiving the lowest amount of water (65.0 mL).

Cumulative germination

Cumulative germination of *Quercus durifolia* acorns after six months of storage showed statistically significant differences among treatments ($p \leq 0.05$; $gl = 4$; $X^2 = 17.0$) in all six evaluations (Figure 3). Germination began after two days, except for the control, which started after four days, and the maximum cumulative emergence occurred after 14 days. In seeds stored in vermiculite and perlite, cumulative germination was similar between them from the beginning of the test until day 14. Seeds stored in fresh sawdust showed over 50 % germination after six days and reached the highest cumulative percentage at 72.5 %, while this value was 29 % in both the control and peat moss treatments.

Few studies have examined seed storage in substrates. One of these studies is that of Pasquini et al. (2012), who stored *Q. ilex* acorns in containers mixed with peat moss and in polyethylene bags without substrate. Storing the seeds in polyethylene bags preserved optimal quality by limiting gas exchange and maintaining low metabolic activity in acorns. In contrast, acorns stored in peat moss showed lower germination rates and higher proportion of damaged seeds. Pasquini et al. (2012) concluded that excessive moisture likely

En este sentido, un aspecto clave para considerar cuando se guardan bellotas es el control de la humedad, determinado por el tipo de material utilizado. En el caso de la turba, se agregó una mayor cantidad de agua (114.4 mL) y al tener las partículas muy finas estas se adherían a las bellotas, lo que pudo provocar que se oxidaran y resultara en una emergencia baja de plántulas al sexto mes. En cambio, a la perlita se incorporaron 101.2 mL de agua, pero la germinación fue nula al final de la evaluación, posiblemente porque el agua tiende a adherirse a la superficie de las partículas, absorbiendo poca humedad (Landis et al., 2022). Esto sugiere que las bellotas probablemente perdieron su capacidad fisiológica de germinación, debido a la pérdida de agua y a la deshidratación del embrión (Kang et al., 2023). Por otro lado, aunque la vermiculita retiene cantidades grandes de agua (Monsalve Camacho et al., 2021), se añadió una menor cantidad (68 mL), lo que se reflejó en la disminución significativa del porcentaje de germinación entre el quinto y sexto mes. En contraste, el aserrín fresco mantuvo la viabilidad de las bellotas por encima del 50 % durante al menos seis meses, a pesar de que se agregó la menor cantidad de agua al sustrato (65.0 mL).

Germinación acumulada

La germinación acumulada de los frutos de *Q. durifolia*, después de seis meses de almacenamiento, mostró diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$; $gl = 4$; $X^2 = 17.0$) en las seis evaluaciones (Figura 3). La germinación comenzó a los dos días, excepto el testigo que inició a los cuatro días,

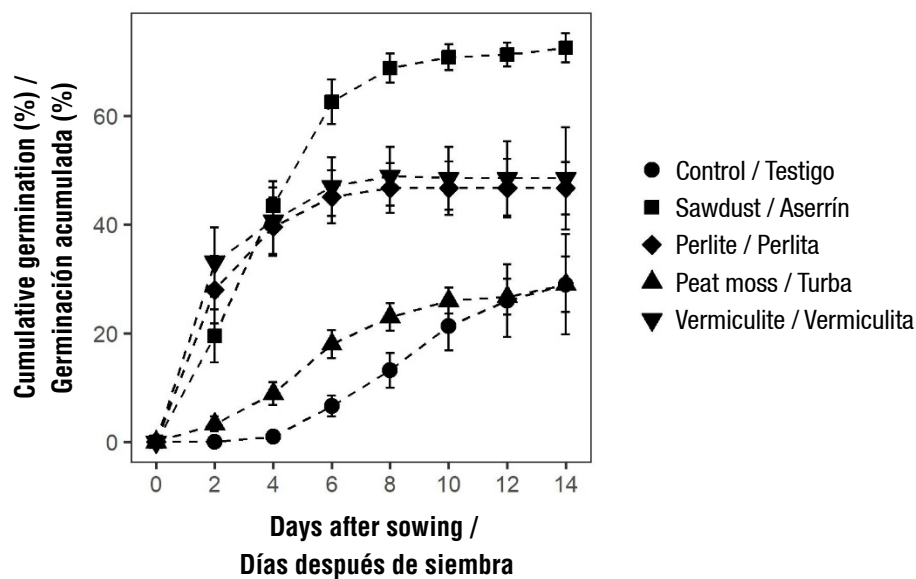


Figure 3. Cumulative germination of *Quercus durifolia* acorns after six months of storage using four different substrates. The points represent mean values $\pm$ standard error from monthly evaluations.

Figura 3. Germinación acumulada de bellotas de *Quercus durifolia* durante seis meses de almacenamiento en cuatro tipos de sustratos. Los puntos son valores promedio $\pm$ error estándar de las evaluaciones mensuales.

had a negative impact on seed viability. Similarly, Berjak and Pammenter (2010) highlight that one of the main factors contributing to the loss of viability in recalcitrant seeds is an imbalance in metabolism, which occurs both during dehydration and when seeds are stored under hydrated conditions. Doria (2010) further indicates that seeds stored with excessive moisture are susceptible to fungal attacks and reduced oxygen availability for the embryo.

This study also recorded acorn rot with the different substrates ($p = 0.0004$; $gl = 4$; $X^2 = 20.6$) and consistent with the germination levels, seeds stored in fresh sawdust had the lowest percentage of rotten seeds (30 %). In contrast, 50 % of the seeds stored in vermiculite and perlite were rotten, while the highest percentages were recorded in the control and peat moss treatments (81.5 and 73 %, respectively). In most substrates, acorn rot was caused by fungal activity (Figure 4a). González-Salvatierra et al. (2013) found that after storing *Q. polymorpha* seeds for one year, 70 % of the acorns were damaged by parasitic insects, 20 % were affected by fungal damage and physiological loss of viability, and only 10 % remained viable. In the present study, larvae were observed in some seeds during germination, although the percentage was minimal in each treatment (0.5 %) (Figure 4b). It is important to note that no signs of infestation were detected before acorn storage. According to González-Salvatierra et al. (2013), acorns may be infested by parasitic insect larvae at the time of collection without visible signs of damage, as the damage caused by the infestation is not visually apparent.

In this study, seed germination occurred within the containers in the storage media with perlite (2 %) and vermiculite (7 %) (Figure 4c). This is consistent with the findings of Pasquini et al. (2012), who reported that *Q. ilex* acorns stored in peat moss began germinating inside the container and experienced faster deterioration due to seed rot. Germination occurs

y la emergencia máxima acumulada ocurrió a los 14 días. En las semillas guardadas en vermiculita y perlita, la germinación acumulada fue similar entre ellas desde el inicio de la prueba hasta los 14 días. Las semillas conservadas en aserrín fresco presentaron más del 50 % de germinación a los seis días y tuvo el porcentaje máximo acumulado con 72.5 %, mientras que en el testigo y la turba dicho valor fue 29 %.

Son pocos los trabajos realizados en almacenamiento de semillas en sustratos, uno de ellos es el de Pasquini et al. (2012), quienes pusieron bellotas de *Q. ilex* en un recipiente mezcladas con turba y en bolsas de polietileno sin sustrato. La conservación de semillas en bolsas de polietileno mantuvo parámetros óptimos de calidad, al limitar el intercambio de gases y mantener la actividad metabólica de las bellotas en niveles bajos; por otro lado, las bellotas en turba tuvieron menor porcentaje de germinación y mayor cantidad de semillas dañadas. Pasquini et al. (2012) concluyeron que el exceso de humedad pudo influir en forma adversa en la viabilidad de la semilla. Asimismo, Berjak y Pammenter (2010) señalan que uno de los principales factores que contribuyen a la pérdida de viabilidad de semillas recalcitrantes es el metabolismo desbalanceado que se produce durante la deshidratación y también cuando se guardan en condiciones hidratadas. Doria (2010) menciona que las semillas almacenadas con exceso de humedad son vulnerables al ataque por hongos y a deficiencias en la disponibilidad de oxígeno para el embrión.

En este estudio también se registró la pudrición de las bellotas en los medios ($p = 0.0004$; $gl = 4$; $X^2 = 20.6$) y, en coherencia con los niveles de germinación, las semillas puestas en aserrín fresco también registraron menor porcentaje de semillas podridas (30 %). En los sustratos vermiculita y perlita se registró 50 % de semillas podridas para ambos casos; mientras que en el testigo y la turba se registraron los mayores porcentajes de semillas podridas (81.5 y 73 %, respectivamente). En



Figure 4. Conditions observed in *Quercus durifolia* acorns during storage: a) rotten seed, b) seed with larvae, and c) germinated seed.
Figura 4. Condiciones encontradas de las bellotas de *Quercus durifolia* durante su almacenamiento: a) semilla podrida, b) semilla con larva y c) semilla germinada.

under these conditions due to a combination of factors such as moisture, temperature, and oxygen availability in the storage medium (Adetunji et al., 2021).

Another important factor affecting seed viability during storage is temperature, which should be kept low to moderate (1 to 7 °C) (Rodríguez-Trejo & García-Pascual, 2021). In this regard, Szuba et al. (2022) evaluated two temperatures for *Quercus robur* L. acorns (-3 °C and -7 °C) and demonstrated that those stored at -7 °C for six months showed deterioration and 80 % reduction in germination capacity. Similarly, Zavala Chávez (2008) stored *Q. glabrescens* and *Q. rugosa* acorns in plastic bags at temperatures between 5 and 7 °C for 15 months and achieved germination rates of 69 and 54 %, respectively. In the present study, seeds stored in plastic containers with fresh sawdust at 5 °C showed higher germination rates, but only for six months, while seed rot was similar to that observed in the aforementioned study (30 %). The advantage of using low temperatures for acorn storage is the reduction of metabolic activity and respiration rates, making the seeds less susceptible to deterioration (Magnitskiy & Plaza, 2007).

Germination speed

According to Figure 5, the germination speed index varied significantly ($p \leq 0.05$; $df = 4$; $X^2 = 75.7$) between the control and the evaluated substrates. Seeds from the control and those stored in peat moss showed a drastic reduction in germination speed (8.6 and 13.0, respectively), while those stored in fresh sawdust, perlite, and vermiculite were statistically similar ($p > 0.05$). When no storage medium was used, the germination speed index of the seeds decreased by more than 50 %, as acorns had lost more moisture in a shorter period, thereby reducing their viability.

The germination value indicates the seed's vigor during the initial days of germination. In this case, seeds stored in fresh sawdust showed an increased germination speed during the first days, contributing to the overall germination percentage. Díaz-Pontones and Reyes-Jaramillo (2009) reported that maintaining acorns of *Q. hintonii* at 7 °C is essential for preserving a high germination rate (94 %) for over 48 days in a chamber with 33 % relative humidity. In the present study, acorns were stored at 5 °C, and the highest germination capacity was achieved with fresh sawdust after two months (76 %).

The storage conditions of the containers, as described in the methods, may have affected the viability of acorns. Since recalcitrant seeds require constant gas exchange, they are usually placed in unsealed containers to avoid oxygen deprivation and carbon dioxide accumulation (Luna & Wilkinson, 2014). Therefore, it is recommended that the containers be

la mayor parte de los sustratos existió pudrición de las bellotas debido a los hongos (Figura 4a). González-Salvatierra et al. (2013), después de almacenar semilla de *Q. polymorpha* durante un año, encontraron que 70 % de las bellotas fueron dañadas por insectos parásitos y 20 % tuvieron daño por hongos y pérdida fisiológica de viabilidad; al final solo 10 % de las bellotas eran viables. En el presente estudio, durante la germinación se observaron larvas en algunas semillas, aunque el porcentaje fue mínimo en cada tratamiento (0.5 %) (Figura 4b). Es importante señalar que, previo al almacenamiento de las bellotas, no había indicios de infestación. Según González-Salvatierra et al. (2013), las bellotas pueden estar infestadas por larvas de insectos parásitos al momento de su recolección sin percibir el daño, ya que no es detectable visualmente.

En este estudio existió germinación de semillas dentro de los recipientes en los medios de almacenamiento con perlita (2 %) y vermiculita (7 %) (Figura 4c). Esto coincide con el ensayo de Pasquini et al. (2012), quienes reportaron que las bellotas de *Q. ilex* con turba comenzaron a germinar dentro del recipiente y tuvieron un deterioro más rápido causado por pudrición de las semillas. Estas germinan debido a la combinación de factores como la humedad, temperatura y disponibilidad de oxígeno en el medio de almacenamiento (Adetunji et al., 2021).

Otro factor importante que influye en la viabilidad de las semillas durante su almacenamiento es la temperatura, la cual debe ser baja a moderada (1 a 7 °C) (Rodríguez-Trejo & García-Pascual, 2021). Al respecto, Szuba et al. (2022) evaluaron dos temperaturas en bellotas de *Quercus robur* L. (-3 °C y -7 °C) y demostraron que las almacenadas a -7 °C durante seis meses presentaron deterioro y reducción de la capacidad germinativa en 80 %. También, Zavala Chávez (2008) guardó bellotas de *Q. glabrescens* y *Q. rugosa* durante 15 meses en bolsas de plástico bajo temperaturas de 5 a 7 °C y obtuvo germinación de 69 y 54 %, respectivamente. En el presente estudio, las semillas colocadas en recipientes de plástico con aserrín fresco a 5 °C mostraron tasas mayores de germinación, pero solo por seis meses, mientras que la pudrición de las semillas fue similar a dicho estudio (30 %). La ventaja del uso de temperaturas bajas en el almacenamiento de las bellotas es la reducción del metabolismo y de la tasa de respiración, haciéndolas menos susceptibles al deterioro (Magnitskiy & Plaza, 2007).

Velocidad de germinación

De acuerdo con la Figura 5, el índice de velocidad de germinación varió significativamente ($p \leq 0.05$; $gl = 4$; $X^2 = 75.7$) entre el testigo y los sustratos evaluados. Las semillas del testigo y las almacenadas en turba presentaron reducción drástica en la velocidad de

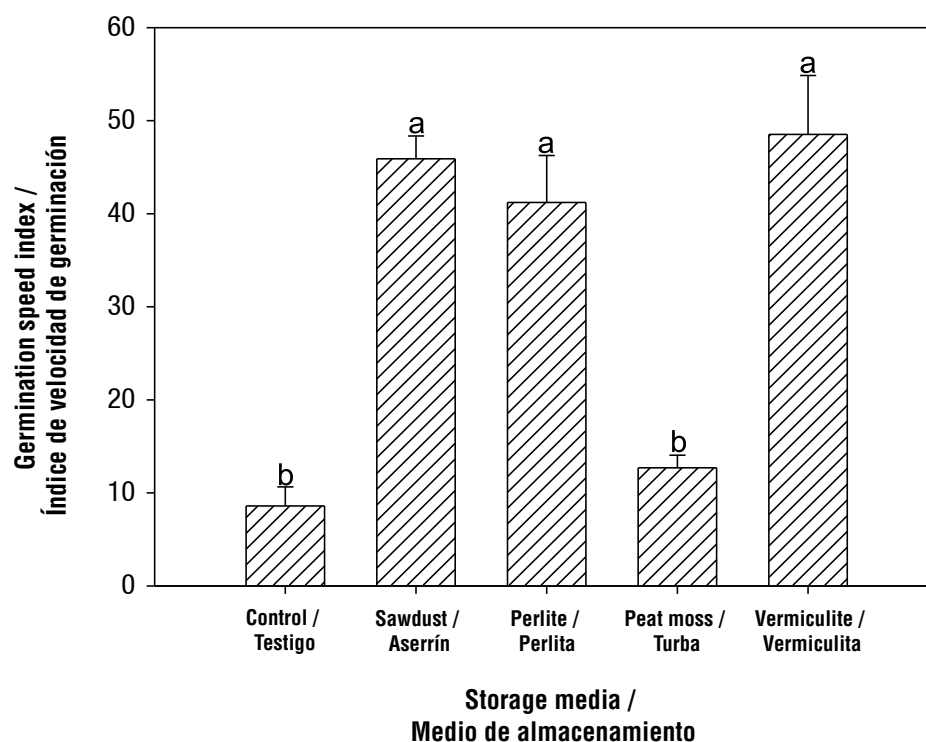


Figure 5. Germination speed index of *Quercus durifolia* acorns according to the type of substrate used for storage. Bars represent means $\pm$ standard error; different letters indicate statistically significant differences among treatments according to Dunn's median test ($p \leq 0.05$).

Figura 5. Índice de velocidad de germinación en bellotas de *Quercus durifolia* según el tipo de sustrato utilizado para su almacenamiento. Las barras representan medias $\pm$ error estándar; letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, según la prueba de medianas de Dunn ($p \leq 0.05$).

left open or have openings that promote aeration. Humidity present in the containers was another factor that could have influenced the results, as moisture was only added at the start of the storage process. Each substrate retained different amounts of water due to the inherent characteristics of the particles and their size. For example, sawdust is a lightweight material with fine particles and has a low to medium water retention capacity, but its aeration capacity is adequate (Pineda-Pineda et al., 2012). In contrast, peat moss contains very fine particles that adhere to the seeds, which may have caused a higher percentage of rotten seeds at the end of the test due to constant moisture on the seed coating. Perlite and vermiculite, on the other hand, have a high moisture retention capacity due to the size of their particles (1-3.5 mm and 0.6-4.7 mm, respectively). These characteristics may have influenced the results of this study, which confirm that the storage medium is critical for maintaining the viability of acorns, including temperature, moisture, and ventilation, to prevent damage from excess moisture and microorganisms (Díaz-Pontones & Reyes-Jaramillo, 2009). Based on the above, it is recommended to continue evaluating acorn storage in fresh sawdust for longer periods and under different moisture and temperature conditions.

germinación (8.6 y 13.0, respectivamente), mientras que en aserrín fresco, perlita y vermiculita fueron estadísticamente similares ($p > 0.05$). Cuando no se utilizó medio de almacenamiento, el índice de velocidad germinativa de las semillas disminuyó en más del 50 %, debido a que las bellotas habían perdido mayor humedad en un periodo más corto y, con ello, su viabilidad.

El valor germinativo indica el vigor que tiene la semilla durante los primeros días de la germinación. En este caso, las semillas almacenadas en aserrín fresco aumentaron la velocidad de germinación en los primeros días, lo que contribuyó al porcentaje de germinación total. Díaz-Pontones y Reyes-Jaramillo (2009) mencionan que la temperatura de almacenamiento de bellotas de *Q. hintonii* a 7 °C es fundamental para mantener un índice alto de germinación (94 %) por un periodo mayor a 48 días en una cámara con humedad relativa del 33 %. En el presente estudio, las bellotas se guardaron a 5 °C y la máxima capacidad germinativa se alcanzó con aserrín fresco a los dos meses (76 %).

Las condiciones de almacenamiento de los recipientes, como se describe en los métodos, pudieron haber afectado la viabilidad de las bellotas. Dado que las semillas recalcitrantes requieren intercambio constante

Conclusions

Quercus durifolia acorns stored in fresh sawdust at 5 °C had the highest germination rate and the least reduction in viability after six months of storage. They also had the lowest proportion of rotten seeds. Acorns stored in peat moss and those without a substrate showed greater reduction in germination capacity and higher percentage of rotten seeds. This study provides an economic alternative for prolonging the viability of acorns for nursery plant production, reforestation, and restoration efforts with the species. However, further long-term studies are needed to evaluate the effects of storage in relation to temperature levels and humidity levels of storage media in acorns from Mexican oaks.

Acknowledgments

We would like to thank the Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación for the scholarship granted to the first author, awarded through the "Postdoctoral Fellowships for Mexico 2022 (3)" program.

Conflicts of Interest

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

End of English version

References / Referencias

- Adetunji, A. E., Adetunji, T. L., Varghese, B., Serphen, & Pammenter, N. W. (2021). Oxidative stress, ageing and methods of seed invigoration: An overview and perspectives. *Agronomy*, 11(12), 2369. <https://doi.org/10.3390/agronomy11122369>
- Aguilar-Peralta, J. S., González-Rodríguez, A., González-Esquivel, J. G., & Cuevas-Reyes, P. (2016). Patrones de depredación de bellotas en especies del género *Quercus* (Fagaceae) a lo largo de un gradiente altitudinal en el Volcán de Tequila, Jalisco. *Biológicas*, 18(1), 1–9. <https://www.biologicas.umich.mx/index.php?journal=biologicas&page=article&op=view&path%5B%5D=244>
- Aguilera-Rodríguez, M., Aldrete, A., Sánchez-Velázquez, J. R., & Prieto-Ruiz, J. A. (2023). Instalaciones e insumos para la producción. En A. Aldrete, J. R. Sánchez-Velázquez, M. Aguilera Rodríguez, D. Cibrián-Tovar, & S. E. García-Díaz (Eds.), *Manual de buenas prácticas para el manejo de la salud de planta en viveros forestales* (pp. 41–90). Universidad Autónoma Chapingo. <https://dicifo.chapingo.mx/publicaciones/>
- Barragán-Zúñiga, J., Rocha-Guzmán, N. E., Montoya-Ayón, J. B., Gallegos-Infante, J. A., Moreno-Jiménez, M. R., Sigala-

de gases, estas se ponen generalmente en contenedores no sellados para evitar la falta de oxígeno y la acumulación, de dióxido de carbono (Luna & Wilkinson, 2014); por ello, se sugiere que los recipientes se dejen abiertos o tengan aperturas que favorezcan la aireación. También, la humedad presente en los recipientes fue otro factor que pudo haber influido, la cual solo se agregó al inicio del proceso de almacenamiento; cada sustrato retuvo diferente cantidad de agua por las características propias de las partículas y su tamaño. Por ejemplo, el aserrín es un material ligero con partículas finas y tiene una capacidad de retención de agua de baja a media, pero su capacidad de aireación es adecuada (Pineda-Pineda et al., 2012). En cambio, la turba tiene partículas muy finas que se adhieren a las semillas, lo que pudo haber provocado que, debido a la humedad permanente en la cubierta de la semilla, el porcentaje de semillas podridas al final de la prueba fuera mayor. También, la perlita y la vermiculita tienen capacidad alta de retención de humedad, debido al tamaño de sus partículas (1-3.5 mm y 0.6-4.7 mm, respectivamente). Estas características pudieron haber influido en los resultados de este estudio, los que confirman que el medio de almacenamiento es crítico para mantener la viabilidad de las bellotas, incluidas la temperatura, humedad y ventilación, para prevenir daños causados por el exceso de humedad y microorganismos (Díaz-Pontones & Reyes-Jaramillo, 2009). Derivado de lo anterior, se recomienda seguir evaluando el almacenaje de bellotas en aserrín fresco, durante más tiempo y en diferentes condiciones de humedad y temperatura.

Conclusiones

Las bellotas de *Quercus durifolia* almacenadas en aserrín fresco a 5 °C tuvieron la mayor tasa de germinación y menor reducción de su viabilidad durante seis meses de almacenamiento; asimismo, tuvieron la menor proporción de semillas podridas. Las bellotas guardadas en turba y aquellas sin sustrato tuvieron mayor reducción de la capacidad germinativa, así como mayor porcentaje de semillas podridas. Este estudio proporciona una alternativa económica para prolongar la viabilidad de las bellotas con fines de producción de plantas en vivero, reforestación y restauración con la especie. Aún se requieren más estudios a largo plazo para evaluar los efectos del almacenamiento en relación con niveles de temperatura y niveles de humedad de los medios de almacenamiento en bellotas de encinos mexicanos.

Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación por la beca otorgada al primer autor, derivada de la convocatoria "Estancias Posdoctorales por México 2022 (3)".

- Rodríguez, J. A., Pulido-Díaz, C., Chávez-Simental, J. A., & González-Laredo, R. F. (2020). *In vitro* propagation of *Quercus sideroxylla* form mature acorns. *Agrociencia*, 54(1), 129–145. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7258171>
- Berjak, P., & Pammenter, N. W. (2010). Semillas ortodoxas y recalcitrantes. In J. A. Vozzo (Ed.), *Manual de semillas de árboles tropicales* (pp. 143–155). Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. https://rngr.net/publications/manual-de-semillas-de-arboles-tropicales/parte-i-semillas-ortodoxas-y-recalcitrantes/at_download/file
- Bonner, F. T. (2003). *Collection and care of acorns: A practical guide for seed collectors and nursery managers*. <https://es.scribd.com/document/64752250/Collection-and-Care-of-Acorns>
- Clark-Tapia, R., Mendoza-Ochoa, A., Aguirre-Hidalgo, V., Antúnez, P., Campos-Contreras, J. E., Valencia, A. S., Luna-Krauletz, M. D., & Alfonso-Corradó, C. (2018). Reproducción sexual de *Quercus macdougalii* un encino endémico de la Sierra Juárez, Oaxaca. *Madera y Bosques*, 24(2), 1–12. <https://doi.org/10.21829/myb.2018.2421617>
- De Jesús Albino, F., Ignacio Hernández, R., Rodríguez Trejo, D. A., & Mohedano Caballero, L. (2021). Calidad de planta de *Quercus rugosa* Née en vivero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 12(67), 147–167. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v12i67.967>
- Díaz-Guzmán, H., & Bonfil, C. (2020). Depredación predispersión en tres especies de *Quercus* del pie de monte del Ajusco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 91, e913242. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2020.91.3242>
- Díaz-Pontones, D., & Reyes-Jaramillo, I. (2009). Producción y almacenamiento de bellotas de *Quercus hintonii* Warburg (Fagaceae) de la Depresión del Balsas, México. *Polibotánica*, 27, 131–143. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5652535>
- Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31(1), 74–85. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000100011
- García Molina, J. G. (2008). Carbón de encino: Fuente de calor y energía. CONABIO. *Biodiversitas*, 77, 7–9. https://www.ccms.org.mx/wp-content/uploads/Carbon_de_encino_fuente_de_calor_y_energia.pdf
- González-Elizondo, M. S., González-Elizondo, M., Tena-Flores, J. A., Ruacho-González, L., & López-Enríquez, I. L. (2012). Vegetación de la sierra madre occidental, México: Una síntesis. *Acta Botánica Mexicana*, 100(1), 351–404. <https://doi.org/10.21829/abm100.2012.40>
- González-Rodríguez, A., Arias, M., Valencia, S., & Oyama, K. (2004). Morphological and RAPD analysis of hybridization between *Quercus affinis* and *Quercus laurina* (Fagaceae), two Mexican red oaks. *American Journal of Botany*, 91(3), 401409. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.3.401>
- González-Salvatierra, C., Badano, E. I., Flores, J., & Podas, J. P. (2013). Germinación, infestación y viabilidad en bellotas de *Quercus polymorpha* (Schltdl. & Cham.) tras un año de almacenamiento. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 19(3), 351–362. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2012.07.044>
- Hong, T. D., & Ellis, R. H. (2010). Almacenamiento. In J. A. Vozzo (Ed.), *Manual de semillas de árboles tropicales* (pp. 129–142). USDA.

Conflictos de intereses

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.

Fin de la versión en español

- <https://rngr.net/publications/manual-de-semillas-de-arboles-tropicales>
- InfoStat (2020). *InfoStat versión 2020*. Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
- International Seed Testing Association (ISTA). (2016). *Reglas Internacionales para el análisis de las semillas*. https://vri.umayor.cl/images/ISTA_Rules_2016_Spanish.pdf
- Jaganathan, G. K., Canelo, T., Phartyal, S. S., Li, J., Kang, H., Chmielarz, P., Wawrzyniak, M. K., Tewari, A., Shah, S., Liu, B., Sánchez, J. A., & Berry, K. (2024). The reproductive biology of Fagaceae acorns in the current and future climate. *Flora*, 315, 152504. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2024.152504>
- Kang, H., Jaganathan, G. K., Han, Y., Li, J., & Liu, B. (2023). Revisiting the pericarp as a barrier restricting water entry/loss from cotyledons and embryonic axis of temperate desiccation-sensitive *Quercus* acorns. *Planta*, 257(2), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-04061-4>
- Landis, T. D., Jacobs, D. F., Wilkinson, K. M., & Luna, T. (2022). Sustratos. In K. M. Wilkinson, T. D. Landis, D. L. Haase, B. F. Daley, & R. K. Dumroese (Eds.), *Manual de viveros tropicales. Una guía para iniciar y operar un vivero para plantas nativas tradicionales* (pp. 101–121). United States Department of Agriculture. <https://rngr.net/publications/manual-de-viveros-tropicales>
- Liegel, L. H., & Venator, Ch. R. (1987). *A technical guide for forest nursery management in the Caribbean and Latin America*. General Technical Report SO-67. USDA Forest Service. Southern Forest Experiment Station. https://www.srs.fs.usda.gov/pubs/gtr/gtr_so067.pdf
- Luna, T., & Wilkinson, K. M. (2014). Collecting, processing, and storing seeds. In K. M. Wilkinson, T. D. Landis, D. L. Haase, B. F. Daley, & R. K. Dumroese (Eds.), *Tropical nursery manual* (pp. 141–161). United States Department of Agriculture. <https://geographicconsulting.com/wp-content/uploads/2014/05/8.-Collecting-Processing-and-Storing-Seeds.pdf>
- Magnitskiy, S. V., & Plaza, G. A. (2007). Fisiología de semillas recalcitrantes de árboles tropicales. *Agronomía Colombiana*, 25(1), 96–103. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180316240011>
- Maguire, J. D. (1962). Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergences and vigor. *Crop Science*, 2(2), 176–177. <https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>
- Monsalve Camacho, O. I., Henao Toro, M. C., & Gutiérrez Díaz, J. S. (2021). Caracterización de materiales con uso potencial como sustratos en sistemas de cultivo sin suelo. *Ciencia y Tecnología*

- Agropecuaria*, 22(1), e1977. https://doi.org/10.21930/rcta.vol22_num1_art:1977
- Pasquini, S., Braidot, E., Petrusa, E., & Vianello, A. (2011). Effect of different storage conditions in recalcitrant seeds of holm oak (*Quercus ilex* L.) during germination. *Seed Science and Technology*, 39(1), 165–177. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-0996-9>
- Pasquini, S., Mizzau, M., Petrusa, E., Braidot, E., Patui, S., Gorian, F., Lambardi, M., & Vialleno, A. (2012). Seed storage in polyethylene bags of a recalcitrant species (*Quercus ilex*): analysis of some bio-energetic and oxidative parameters. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, 1963–1974. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-0996-9>
- Pineda-Pineda, J., Sánchez-Del Castillo, F., Ramírez-Arias, A., Castillo-González, A. M., Valdés-Aguilar, L. A., & Moreno-Pérez, E. C. (2012). Aserrín de pino como sustrato hidropónico. I: Variación en características físicas durante cinco ciclos de cultivo. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 18(1), 95–111. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2012000100007
- Ramírez-Roacho, R. F., Guerrero-Cervantes, M., Prieto-Ruiz, J. Á., Bocanegra-Salazar, M., Chávez-Simental, J. A., & Goche-Télles, J. R. (2021). Morphological, physical and chemical analysis of acorns from three oak species from Durango, Mexico. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 27(3), 481–495. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2020.10.064>
- Rodríguez-Acosta, M., & Coombes, A. J. (2020). *Manual de propagación de Quercus: Una guía fácil y rápida para cultivar encinos en México y América Central*. Jardín Botánico Universitario, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <https://www.bgci.org/wp/wp-content/uploads/2021/01/MANUAL-PARA-LA-PROPAGACION-DE-QUERCUS.pdf>
- Rodríguez-Trejo, D. A., & García-Pascual, E. (2021). *Quercus* L. (Fagaceae). En D. A. Rodríguez-Trejo (Ed.), *Semillas de especies forestales* (pp. 298–328). División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo. <https://dicifo.chapingo.mx/pdf/publicaciones/SemillasdeEspeciesForestales.pdf>
- Rosaliano-Evaristo, R., Ávila-Akerberg, V., Gómez-Demetrio, W., & Sotelo-Núñez, E. I. (2024). Research on Mexican oak forests subject to public policy instruments for conservation and use. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 30(2), 1–15. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2023.03.017>
- Szuba, A., Kalemba, E. M., Wawrzyniak, M. K., Suszka, J., & Chmielarz, P. (2022). Deterioration in the quality of recalcitrant *Quercus robur* seeds during six months of storage at subzero temperatures: Ineffective activation of prosurvival mechanisms and evidence of freezing stress from an untargeted metabolomic study. *Metabolites*, 12(8), 756. <https://doi.org/10.3390/metabo12080756>
- Zavala-Chávez, F. (2004). Desecación de bellotas y su relación con la viabilidad y germinación en nueve especies de encinos mexicanos. *Ciencia Ergo Sum*, 11(2), 177–185. <https://www.redalyc.org/pdf/104/10411207.pdf>
- Zavala Chávez, F. (2008). Efecto del almacenamiento sobre la viabilidad y la germinación de bellotas de *Quercus rugosa* y *Quercus glabrescens*. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 33(103), 15–25. <http://cienciasforestales.inifap.gob.mx/index.php/forestales/article/view/738>

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 Haultunchén-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

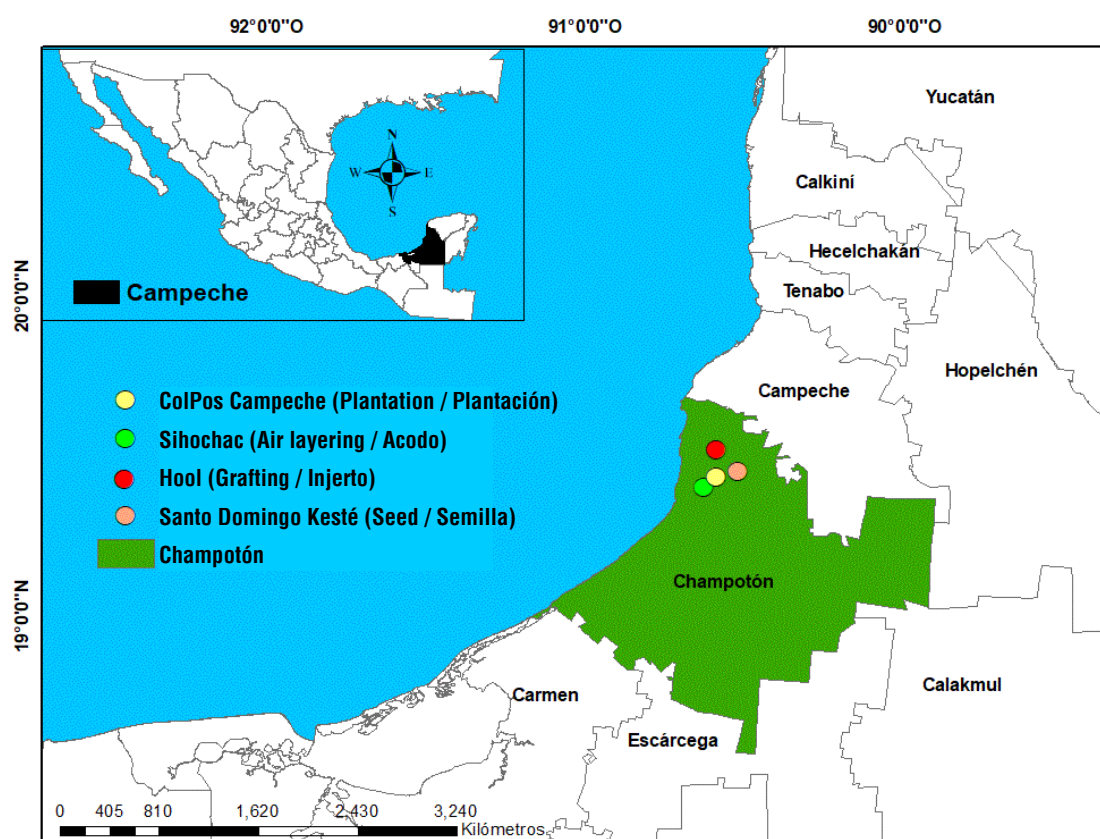


Figure 1. Spatial location of germplasm collection sources of *Brosimum alicastrum* in the state of Campeche

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

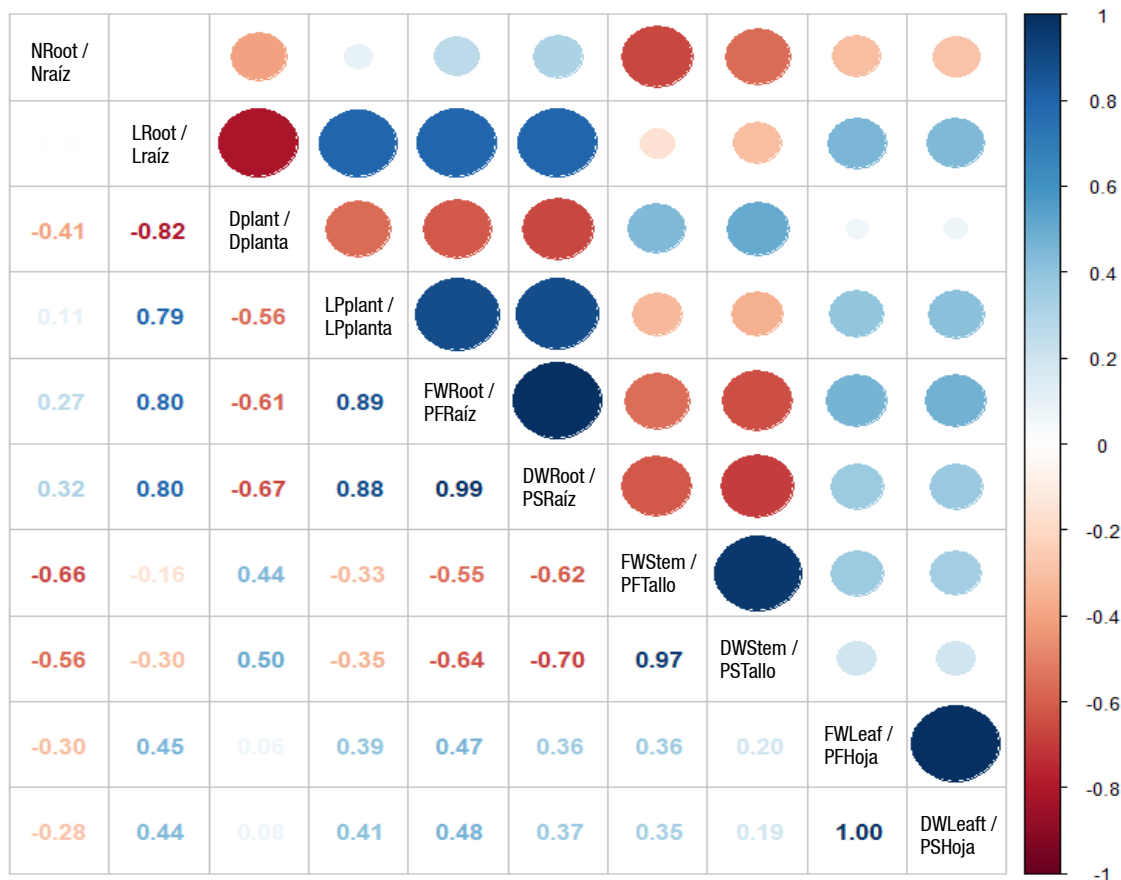


Figure 3. Pearson correlation matrix associates the shoot system variables of *Brosimum alicastrum* air layers with their root variables. L: length, NRoot: number of roots, FW: fresh weight, D: diameter, DW: dry weight.

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

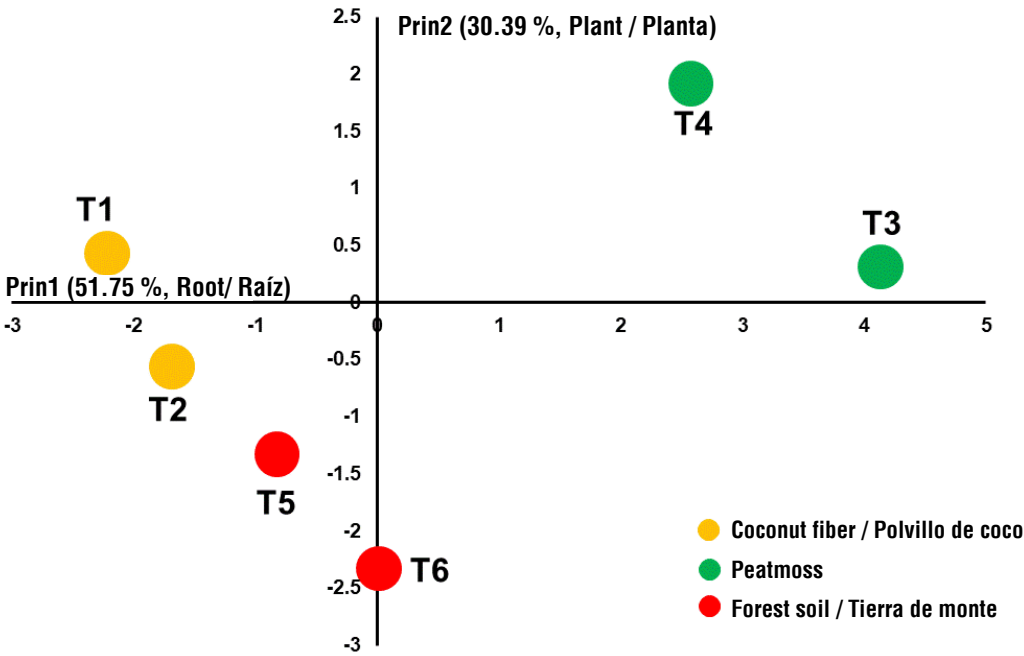


Figure 4. Classification of treatments based on their effect on *Brosimum alicastrum* air layer viability according to principal component analysis.

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).

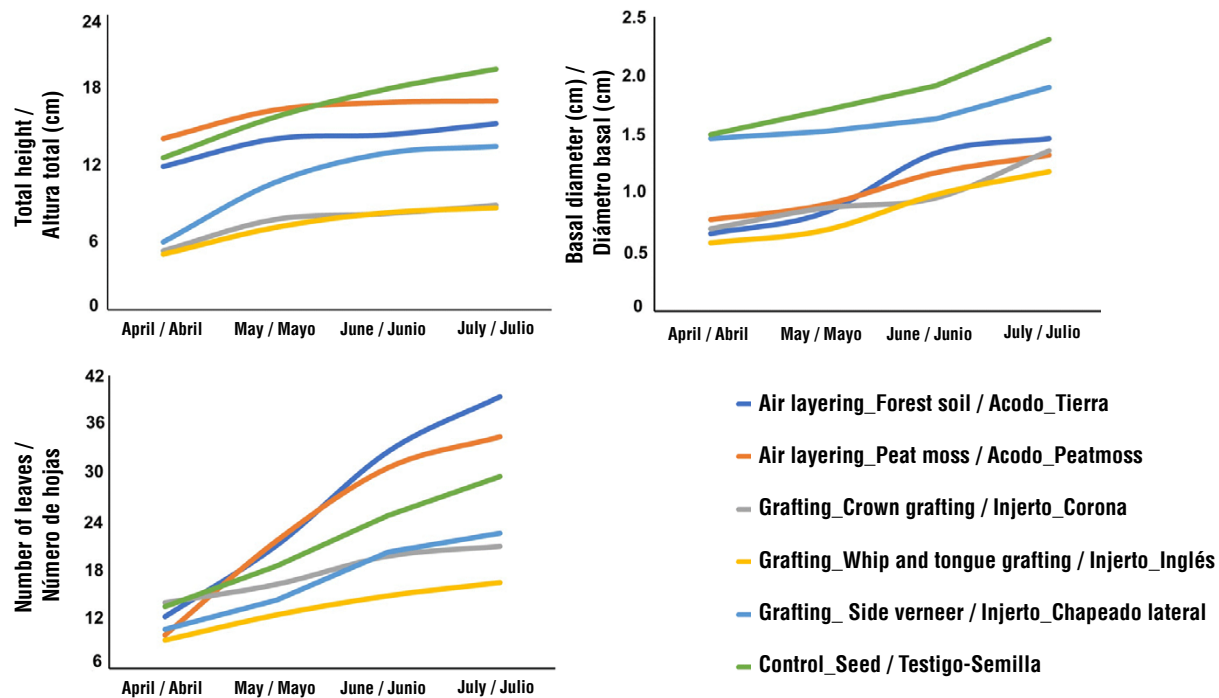


Figure 5. Temporal development of tree-measurement variables in *Brosimum alicastrum* propagated via asexual (air layering and grafting) and sexual (seed) techniques.

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 ($P = 0.05$).

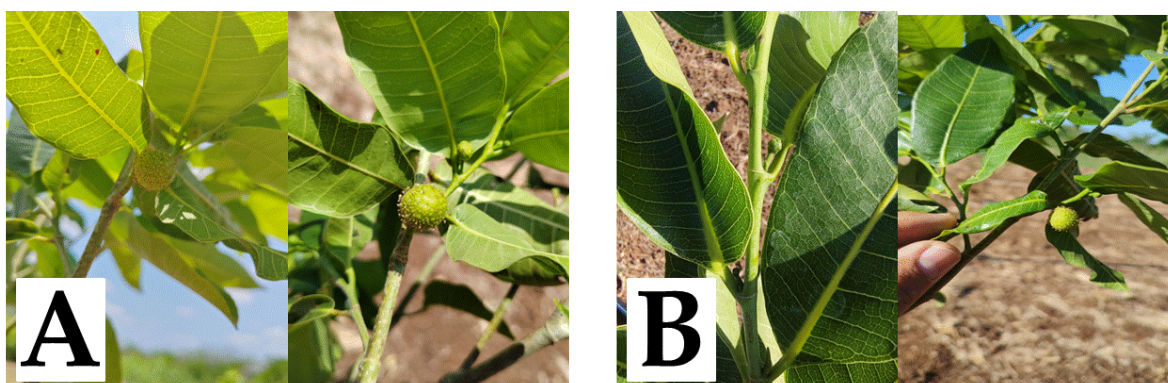


Figure 6. Visual differences in fruit size of *Brosimum alicastrum* propagated via air layering (A) and grafting (B).

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.

End of English version

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.

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 (*Macleanea 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>

Native isolates of *Metarhizium brunneum* Petch with biocontrol potential against the black stink bug (*Antiteuchus tripterus* Fabricius) in cacao

Aislamientos nativos de *Metarhizium brunneum* Petch con potencial de biocontrol sobre la chinche negra (*Antiteuchus tripterus* Fabricius) del cacao

Miguel A. Mayo-Hernández¹; Magdiel Torres-de-la-Cruz^{1*}; Manuel Pérez-de-la-Cruz¹; Ángel F. Huamán-Pilco²; Aracely de la Cruz-Pérez¹; Lenin Arias-Rodríguez¹

¹Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas. km 0.5 carretera Villahermosa-Cárdenas. C. P. 86150. Villahermosa, Tabasco, México.

²Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva. Calle Higos Urco, Chachapoyas. C. P. 01001. Amazonas, Perú.

*Corresponding author: biomag75@hotmail.com; tel.: +52 914 119 2428.

Abstract

Introduction. Cacao is a perennial crop of economic importance in southeastern Mexico, where the black stink bug (*Antiteuchus tripterus* Fabricius) has been reported as a pest. Control of this insect through entomopathogenic fungi represents a sustainable alternative.

Objective. To characterize and select native isolates of *Metarhizium brunneum* Petch with biocontrol potential against the black stink bug (*A. tripterus*) in Tabasco, Mexico.

Materials and methods. Five fungal strains were isolated and characterized based on morphological, molecular, physiological, and pathogenic traits. Phylogenetic analysis was conducted using IQ-TREE v2. Mycelial growth (MG), conidial germination (CG), and conidial production (CP) were evaluated at 25, 30, and 35 °C. These variables, along with pathogenicity, were analyzed using ANOVA and Tukey's HSD test ($P < 0.05$). The time required to reach 50 % (GT₅₀) and 90 % (GT₉₀) conidial germination was estimated using Probit analysis.

Results and discussion. All isolates were identified as *Metarhizium brunneum*. Significant differences ($P < 0.05$) were observed in MG, CP, and pathogenicity. The most favorable temperature range for the fungus was 25 to 30 °C. GT₅₀ ranged from 7.8 to 21.9 h, and GT₉₀ from 9.5 to 27.7 h. Pathogenic effectiveness ranged from 72 to 96 %. Isolates TCCH5 and TCCH8 showed the greatest potential as biological control agents against *A. tripterus*.

Conclusions. This study reports, for the first time, the pathogenicity of *M. brunneum* against *A. tripterus*. Field studies are necessary to evaluate the most promising isolates under natural conditions.

Keywords: phylogenetic analysis; biological control; entomopathogens; pest; *Theobroma cacao*.

Resumen

Introducción. El cacao es un cultivo perenne de importancia en el sureste de México, donde la chinche negra del cacao (*Antiteuchus tripterus* Fabricius) se ha reportado como plaga. El control del insecto mediante hongos entomopatógenos constituye una alternativa sustentable.

Objetivo. Caracterizar y seleccionar aislamientos nativos de *Metarhizium brunneum* Petch con potencial de biocontrol de la chinche negra del cacao (*A. tripterus*) en Tabasco, México.

Materiales y métodos. Se aislaron cinco cepas y se caracterizaron con base en variables morfológicas, moleculares, fisiológicas y patogénicas. El análisis filogenético se realizó con IQ-TREE v2. El crecimiento micelial (CM), la germinación (GdC) y la producción (PdC) de conidios se evaluaron a 25, 30 y 35 °C. Estas variables y la patogenicidad se analizaron con análisis de varianza y separación de medias de Tukey ($P < 0.05$). El tiempo en que ocurrió el 50 (TG₅₀) y 90 % de la germinación (TG₉₀) de conidios se estimó mediante análisis Probit.

Resultados y discusión. Los aislamientos se identificaron como *Metarhizium brunneum*. Existieron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el CM, PdC y patogenicidad. El rango de temperatura favorable para el hongo fue de 25 a 30 °C. El TG₅₀ varió de 7.8 a 21.9 h y el TG₉₀ de 9.5 a 27.7 h. La efectividad patogénica fue de 72 a 96 %. Los aislamientos TCCH5 y TCCH8 resultaron los más promisorios como agentes de control biológico en *A. tripterus*.

Conclusiones. Se reporta por primera ocasión la patogenicidad de *M. brunneum* sobre *A. tripterus*. Estudios en campo deberán realizarse para la evaluación de los aislamientos más promisorios.

Palabras clave: análisis filogenético; control biológico; entomopatógenos; plaga; *Theobroma cacao*.

Please cite this article as follows (APA 7): Mayo-Hernández, M. A., Torres-de-la-Cruz, M., Pérez-de-la-Cruz, M., Huamán-Pilco, A. F., de la Cruz-Pérez, A., & Arias-Rodríguez, L. (2025). Native isolates of *Metarhizium brunneum* Petch with biocontrol potential against the black stink bug (*Antiteuchus tripterus* Fabricius) in cacao. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 31, e24032. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2024.08.032>



Introduction

Cacao (*Theobroma cacao* L.) is a perennial crop of great importance in Mexico and across tropical regions worldwide. In Mexico, 52 449 ha are cultivated in the southeastern region, specifically in the states of Oaxaca, Chiapas, and Tabasco, the latter accounting for 61 % of national production (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2023).

In Tabasco, several insect pests have been reported affecting *T. cacao*. Among the most prominent are the hibiscus mealybug (*Maconellicoccus hirsutus* Green) (Torres de la Cruz et al., 2019), the spittlebug (*Clastoptera laenata* Fowler), the whitefly (*Lecanoides floccissimus* Martin), the cacao moth (*Hemeroblemma mexicana* Guenée), the red-banded thrips (*Selenothrips rubrocinctus* Giard), the black aphid (*Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombe), and the borer *Xyleborus vulvulus* Fabricius (Sánchez-Soto & Cortez-Madrigal, 2000). These pests reduce both the quality and yield of cacao production.

Recently, the black stink bug (*Antiteuchus tripterus* Fabricius, 1787) (Hemiptera: Pentatomidae) has been reported in cacao plantations in Tabasco. This insect is a significant pest of cacao in several Caribbean and South American countries, including Trinidad and Tobago, Brazil, Ecuador, and Peru (Castillo-Carrillo et al., 2020). Damage is caused by both nymphs and adults, which feed by sucking sap from the peduncles and the base of the fruits. During feeding, the black stink bug injects toxins that lead to wilting and death of fertilized flowers, known locally as *chilillos*. In developing fruits, the bug causes shallow lesions that can extend from the peduncle to the apex, potentially creating entry points for phytopathogenic fungi. Additionally, Castillo-Carrillo et al. (2020) reported that this insect acts as a mechanical vector of cacao frosty pod rot (*Moniliophthora roreri* [Cif. & Par.] Evans et al., 2003). Consequently, the development of effective and sustainable management strategies for this pest is urgently needed.

Chemical control of *A. tripterus* can significantly reduce insect populations; however, the use of synthetic insecticides may contribute to resistance development, leave harmful residues on the fruit, and negatively impact key cacao pollinators (Pu & Chung, 2024). In the search for environmentally friendly alternatives, biological control offers a sustainable option. In this regard, entomopathogenic fungi such as *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., and *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson have demonstrated effectiveness against *A. tripterus* in Colombia (Yepes-Rodríguez, 2019). Despite the presence of *A. tripterus* in Mexican cacao plantations, there are no reports of native entomopathogenic fungi with proven

Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo perenne de gran importancia en México y en todas las regiones tropicales del mundo. En México se cultivan 52 449 ha en la región sursureste, específicamente en Oaxaca, Chiapas y Tabasco; este último con 61 % de la producción (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2023).

En Tabasco se han reportado plagas insectiles que atacan a *T. cacao*. Entre ellas sobresalen la cochinilla rosada del hibisco (*Maconellicoccus hirsutus* Green) (Torres de la Cruz et al., 2019), el salivazo (*Clastoptera laenata* Fowler), la mosca blanca (*Lecanoides floccissimus* Martin), el gusano lagarta (*Hemeroblemma mexicana* Guenée), el trips de banda roja (*Selenothrips rubrocinctus* Giard), el pulgón negro (*Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombe) y el barrenador *Xyleborus vulvulus* Fabricius (Sánchez-Soto & Cortez-Madrigal, 2000), las cuales reducen la calidad y el rendimiento de la producción.

Recientemente, en plantaciones de cacao de Tabasco se ha reportado a la chinche negra (*Antiteuchus tripterus* Fabricius 1787) (Hemiptera: Pentatomidae). Esta es una plaga importante del cacao en países del Caribe y América del Sur, tales como Trinidad y Tobago, Brasil, Ecuador y Perú (Castillo-Carrillo et al., 2020). El daño lo provocan las ninfas y adultos que se alimentan succionando savia de los pedúnculos y de la base de los frutos. Durante la alimentación, la chinche negra inyecta toxinas que ocasionan la marchitez y muerte de las flores fecundadas o 'chilillos'. En frutos desarrollados, la chinche ocasiona lesiones poco profundas que pueden extenderse desde el pedúnculo hacia el ápice, las cuales pueden facilitar la entrada de hongos fitopatógenos. Por otro lado, Castillo-Carrillo et al. (2020) reportaron que este insecto actúa como un vector mecánico de la moniliasis del cacao (*Moniliophthora roreri* [Cif. y Par.] Evans et al., 2003). Por lo anterior, se requiere del desarrollo de estrategias eficaces y sustentables para el control de esta plaga.

El control químico de *A. tripterus* reduce significativamente las poblaciones del insecto; sin embargo, el uso de insecticidas sintéticos podría favorecer la resistencia, el efecto residual en los frutos y la disminución de poblaciones de los principales polinizadores del cacao (Pu & Chung, 2024). En la búsqueda de estrategias de control amigables con el ambiente, el control biológico constituye una alternativa sustentable. Al respecto, se ha reportado efectividad de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. y *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson sobre *A. tripterus* en Colombia (Yepes-Rodríguez, 2019). A pesar de la presencia de *A. tripterus* en plantaciones de cacao en México, no existen reportes de hongos entomopatógenos

biological efficacy for controlling this insect. Therefore, the objective of this study was to characterize and select native isolates of *Metarhizium* spp. for the biological control of the black stink bug (*A. tripterus*) in cacao plantations in Tabasco, Mexico. This research contributes to the understanding of entomopathogenic fungal diversity and proposes a biological control alternative for managing *A. tripterus* in cacao crops in Tabasco.

Materials and Methods

Collection site

Adults of *A. tripterus* infected with entomopathogenic fungi were obtained through targeted sampling in a cacao plantation located in the community of José María Morelos y Pavón (Las Delicias), Teapa, Tabasco. The collection site is located at coordinates 17° 38' 5.1" N, 92° 55' 48.2" W, an elevation of 10 meters. Mycosed cadavers were transferred into sterile vials, placed in thermal containers, and transported to the Entomopathogen Laboratory at the Academic Division of Biological Sciences, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Isolation of fungal strains

A. tripterus cadavers were sterilized in a 0.5 % sodium hypochlorite solution for 5 minutes, following the protocol described by Gerónimo-Torres et al. (2016). They were then rinsed with sterile distilled water (SDW) and individually placed in humid chambers at 25 °C for 8 days for sporulation. Sporulating cadavers were used to inoculate Sabouraud Dextrose Agar supplemented with 0.1 % yeast extract (SDA + YE). Monospore isolates were obtained from polysporic cultures using the method described by SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2016). The isolates were stored under refrigeration until specific characterization assays.

Morphological identification

The fungal isolates were identified to the species level based on their reproductive structures, following the criteria described by Barnett and Hunter (1998) and Bischoff et al. (2009). For morphological characterization, the isolates were grown on Petri dishes containing SDA + YE medium for 14 days. Colony characteristics such as size, morphology, and conidiation were recorded for each isolate. Additionally, a spore suspension was inoculated onto 0.5 cm SDA discs placed under sterile coverslips to observe the microscopic structures of each isolate. The inoculated discs were incubated in a humid chamber at 25 °C for 3 to 5 days. Microscopic characteristics of

de origen nativo con eficacia biológica para el control del citado insecto. Por ello, el objetivo de esta investigación fue caracterizar y seleccionar aislamientos nativos de *Metarhizium* sp. para el control biológico de la chinche negra del cacao (*A. tripterus*) en Tabasco, México. Esta investigación aporta al conocimiento de la diversidad de hongos entomopatógenos y propone una alternativa de control biológico contra *A. tripterus* en el cultivo de cacao en Tabasco.

Materiales y métodos

Sitio de recolecta

Adultos de la chinche *A. tripterus* micosados se obtuvieron mediante un muestreo dirigido en una plantación de cacao, ubicada en la ranchería José María Morelos y Pavón (Las Delicias), Teapa, Tabasco. El sitio de recolecta se ubica en las coordenadas 17° 38' 5.1" N, 92° 55' 48.2" O a una elevación de 10 m. Los cadáveres micosados se transfirieron a viales estériles, se colocaron en contenedores térmicos y se transportaron al Laboratorio de Entomopatógenos de la División Académica de Ciencias Biológicas en la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Obtención de los aislamientos

Los cadáveres de *A. tripterus* se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % durante 5 min, de acuerdo con Gerónimo-Torres et al. (2016). Posteriormente, se lavaron con agua destilada estéril (ADE) y se colocaron individualmente en cámaras húmedas a 25 °C durante 8 d, lo que permitió la esporulación para realizar la siembra en medio de cultivo Agar-Dextrosa Sabouraud + 0.1 de extracto de levadura (SDA + EL). De los cultivos poliespóricos se obtuvieron aislamientos monospóricos de acuerdo con el método propuesto por SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2016). Los aislamientos se conservaron en refrigeración hasta su empleo en las pruebas de caracterización específica.

Identificación morfológica

Los aislamientos se identificaron a nivel específico con base en las estructuras reproductivas, de acuerdo con Barnett y Hunter (1998) y Bischoff et al. (2009). Para la caracterización, los aislamientos crecieron en cajas de Petri con el medio SDA + EL, durante 14 d. En cada aislamiento se determinó la característica de la colonia: tamaño, morfología y conidiación. Además, una suspensión de esporas se inoculó sobre discos de SDA de 0.5 cm de diámetro, bajo cubreobjetos estériles, para obtener estructuras microscópicas de cada aislamiento. Los discos inoculados se incubaron durante 3 a 5 días a 25 °C en cámara húmeda. Las características

the conidiophores and conidia were observed using an Axio Scope A1 brightfield optical microscope (Carl Zeiss, Microscopy GmbH®, Göttingen, Germany), and images were captured with an AxioCam ERc5s digital camera (Carl Zeiss®). Morphometric data of the reproductive structures were obtained using the measurement tools of the Zen/2011 software (Carl Zeiss Microscopy GmbH®). The isolates were deposited in the entomopathogenic fungi collection of the Entomopathogen Laboratory at the Academic Division of Biological Sciences, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, Mexico.

Molecular identification

Genomic DNA was extracted from 7-day-old pure cultures using the CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) method, and DNA concentration was estimated with a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific®). For phylogenetic analysis, partial gene sequences from two regions were amplified by PCR: the nuclear rDNA ITS1–5.8S–ITS2 region and the β -tubulin gene. The ITS region was amplified using primers ITS5 (5'-gca agt aaa agt cgt aac aag g-3') and ITS4 (5'-tcc tcc gct tat tga tat gc-3'). Partial amplification of the β -tubulin gene was performed using primers Bt2a (5'-ggg aac caa atc ggt gct gct ttc-3') and Bt2b (5'-acc ctc agt gta gtg acc ctt ggc-3'). PCR reactions for both genes were carried out under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 2 min; 40 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 45 s, and 72 °C for 90 s; followed by a final extension at 72 °C for 4 min. Each 25 μ L PCR reaction contained 1X buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.4 μ M of each primer (Integrated DNA Technologies, Inc.), 1 U of Taq DNA polymerase (Promega), and 20 ng of genomic DNA. DNA quantification was performed using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®). Amplicons were submitted for sequencing to Psomagen Inc. (USA). The resulting sequences were compared with those available in GenBank using BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides) at the National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Phylogenetic analysis

A total of 24 taxa previously downloaded from NCBI were used, including the sequences obtained from the isolates. DNA sequences were aligned using MUSCLE, implemented in MEGA-X (Kumar et al., 2018), and concatenated with SeaView 4.7 (Gouy et al., 2010). The best-fit nucleotide substitution model was determined using jModelTest v2 (Darriba et al., 2012), based on the Akaike Information Criterion (AIC). Phylogenetic analysis was conducted using IQ-TREE v2 (Minh et al., 2020), which implements a maximum likelihood algorithm, through the CIPRES Science Gateway

microscópicas de conidióforos y conidios se observaron bajo el microscopio óptico de campo claro Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Microscopy GmbH®, Göttingen, Germany) y las imágenes se digitalizaron con la cámara AxioCam ERc5s (Carl Zeiss®). La morfometría de las estructuras reproductivas se obtuvo con las herramientas del programa Zen/2011 (Carl Zeiss Microscopy GmbH®). Los aislamientos se depositaron en la colección de hongos entomopatógenos del Laboratorio de Entomopatógenos de la División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México.

Identificación molecular

El ADN se extrajo de cultivos puros de 7 d por el método del CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) y la concentración se estimó con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®). Para el análisis filogenético, secuencias parciales de genes se obtuvieron de dos regiones y se amplificaron por PCR: la región ITS1-5.8S-ITS2 del DNA nuclear y β -tubulina. La región ITS se amplificó con los iniciadores ITS5 (5'-gca agt aaa agt cgt aac aag g-3') e ITS4 (5'-tcc tcc gct tat tga tat gc-3'). La amplificación parcial del gen β -tubulina se hizo con los iniciadores Bt2a (5'-ggg aac caa atc ggt gct gct ttc-3') y Bt2b (5'-acc ctc agt gta gtg acc ctt ggc-3'). Ambos genes se amplificaron bajo las siguientes condiciones de PCR: 94 °C por 2 min; 40 ciclos de 94 °C- 30 s, 55 °C- 45 s, 72 °C- 90 s; y extensión final de 72 °C por 4 min. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en volúmenes de 25 μ L que contenían amortiguador (1X), MgCl₂ (1.5 mM), dNTP (0.2 mM), iniciadores (0.4 μ M de cada uno [Integrated DNA Technologies, Inc.]), enzima Taq DNA polimerasa (1 unidad, Promega) y ADN (20 ng). El ADN se cuantificó en un NanoDrop 2000, Thermo Scientific®. Los amplicones se enviaron para su secuenciación a la compañía Psomagen (EUA). Las secuencias se compararon con las disponibles en el GenBank (mediante comparación nucleotídica en BLASTn) del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Análisis filogenético

Se usaron 24 taxones previamente descargados del NCBI, incluyendo las secuencias de los aislamientos. Las secuencias de ADN se alinearon con MUSCLE implementado en MEGA-X (Kumar et al., 2018) y se concatenaron con SeaView 4.7 (Gouy et al., 2010). Se utilizó jModelTest v2 (Darriba et al., 2012) para identificar el modelo de evolución de nucleótidos más apropiado según el criterio de información de Akaike. El análisis filogenético se realizó con IQ-TREE v2 (Minh et al., 2020) que implementa el algoritmo de máxima verosimilitud en el portal CIPRES Science Gateway v3.3 (<https://www.phylo.org/portal2/login!input.action>). El árbol filogenético se visualizó y editó con iTOL (Letunic et al., 2021).

v3.3 portal (<https://www.phylo.org/portal2/login!input.action>). The resulting phylogenetic tree was visualized and edited using iTOL (Letunic et al., 2021).

Physiological characterization

Mycelial growth

Five-day-old cultures of each isolate were used to transfer a 5 × 5 mm section from the edge of the colony onto a 90 mm Petri dish containing SDA + YE medium, using a sterile cork borer. The inoculated plates were incubated at 25, 30, and 35 ± 1 °C to evaluate the thermal tolerance of the fungus. Each treatment included five replicates per isolate and temperature. Mycelial growth (MG) was recorded every 2 days until one of the isolates fully covered the medium. The average radial growth (RG) on the final day was used for statistical analysis. The effect of temperature on RG was assessed by calculating the percentage of growth increase (INC) or inhibition (INH) using the following formulas: % (INH/INC) = [(RG at 30 °C × 100/RG at 25 °C) – 100], and % (INH/INC) = [(RG at 35 °C × 100/RG at 30 °C) – 100], according to Torres-de la Cruz et al. (2013).

Germination rate

Eighteen-day-old cultures of each isolate were used to prepare a conidial suspension at a concentration of 5 × 10⁶ conidia·mL⁻¹. From this suspension, 30 µL were deposited onto Petri dishes containing SDA + YE medium. Four replicates were established per treatment. The plates were incubated at three temperatures: 25, 30 and 35 °C ± 1 °C. Germination was monitored by examining 100 conidia per replicate at hourly intervals under a light microscope, continuing until one of the isolates reached 90 % germination. Conidia were considered germinated when the germ tube length was at least half the length of the conidium (Figure 1).

Conidial production on SDA medium

From each fungal isolate, 5 × 5 mm sections were taken from the actively growing edge of 8-day-old colonies using a sterile cork borer and transferred to Petri dishes containing SDA + YE medium. The plates were incubated at 25, 30, and 35 ± 1 °C for 16 days in the dark. Conidia were harvested by flooding the culture with sterile distilled water (SDW) containing 0.1 % Tween 80 and gently scraping the spores with a stainless steel micro-spatula. The resulting conidial suspension was homogenized for 1 min using a magnetic stirrer. To separate conidia from mycelial fragments, the suspension was filtered through sterile medical gauze (Protec®, 20 × 12 pads). Conidial production (CP) per isolate (five replicates) was estimated with a Neubauer

Caracterización fisiológica

Crecimiento micelial

Cultivos de cada aislamiento de 5 d de crecimiento se utilizaron para transferir, con un sacabocados, una fracción de 5 x 5 mm del extremo de la colonia a una caja Petri (90 mm) con medio SDA + EL. Las cajas con el inóculo se incubaron a 25, 30 y 35 ± 1 °C, para evaluar la tolerancia térmica del hongo, y se consideraron cinco repeticiones por aislamiento y temperatura. El crecimiento micelial (CM) se registró cada 2 d hasta que un aislamiento cubrió todo el medio. La media del crecimiento radial (CR) del último día se utilizó para el análisis estadístico. El efecto de la temperatura sobre el CR se evaluó midiendo el porcentaje de incremento (INC) o inhibición (INH) del CR con la fórmula: % (INH/INC) = [(CR a 30 °C × 100/CR a 25 °C) – 100], y % (INH/INC) = [(CR a 35 °C × 100/CR a 30 °C) – 100], de acuerdo con Torres-de la Cruz et al. (2013).

Velocidad de germinación

Cultivos de cada aislamiento de 18 d de crecimiento se utilizaron para obtener una suspensión de 5 x 10⁶ conidios·mL⁻¹. De esta suspensión se depositaron 30 µL en cajas Petri con medio SDA + EL. Se establecieron cuatro repeticiones. Las cajas Petri con las alícuotas de conidios se incubaron a tres temperaturas: 25, 30 y 35 °C ± 1 °C. El registro de germinación consistió en lecturas de 100 conidios cada hora, en un microscopio óptico, hasta el tiempo en que un aislamiento alcanzó 90 % de germinación; se determinó que estos habían germinado cuando el tubo germinativo alcanzó la mitad de la longitud del conidio (Figura 1).

Producción de conidios en medio SDA

De cada aislamiento fúngico con 8 d de crecimiento, se obtuvieron secciones de 5 x 5 mm del borde de colonias con ayuda de un sacabocado y se transfirieron a cajas de Petri con SDA + EL, las cuales se incubaron a 25, 30 y 35 °C ± 1 °C durante 16 d en oscuridad. Los conidios se cosecharon inundando el cultivo con ADE + tween 80 (0.1 %) y raspando las esporas con una microespátula de acero inoxidable. La suspensión de conidios se homogenizó durante 1 min con un agitador magnético. Para separar las esporas del micelio, la suspensión se filtró con gasa clínica estéril (Protec®, tejido 20 x 12). La producción de conidios (PdC) por aislamiento (cinco repeticiones) se estimó con una cámara de Neubauer. El número de conidios·mL⁻¹ se calculó a través de la fórmula: $C = (Cc) (4 \times 10^6) (Fd/80)$; donde, Cc = número promedio de conidios contados en cinco cuadrantes de la cámara de Neubauer y Fd = factor de dilución.

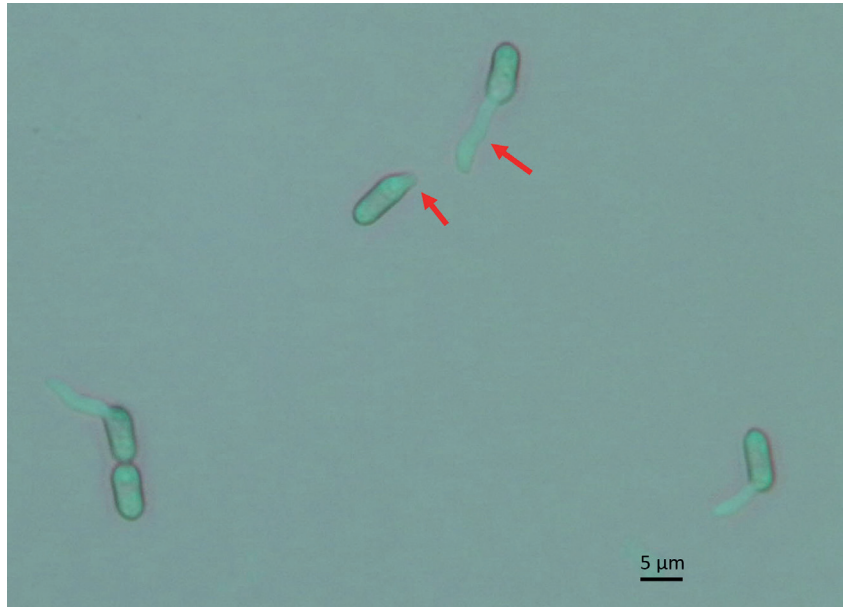


Figure 1. Conidia of *Metarhizium brunneum* showing germ tube formation.

Figura 1. Conidios de *Metarhizium brunneum* mostrando tubo germinativo.

chamber. The number of conidia·mL⁻¹ was calculated by the formula. $C = (Cc) (4 \times 10^6) (Fd/80)$; where, Cc = the average number of conidia counted in five quadrants of the Neubauer chamber, and Fd = dilution factor.

The effect of temperature on CP in SDA medium was evaluated by calculating the percentage of inhibition or increase in CP when shifting from 25 to 30 °C and from 25 to 35 °C, using the following formulas: % INH/INC = [(CP at 30 °C x 100/ CP at 25 °C) -100] and % INH/INC = [(CP at 35 °C x 100/ CP at 25 °C)-100] (Torres-de la Cruz et al., 2013).

Conidial production on rice

Thirty grams of rice were placed in a polypaper bag and moistened with 7 mL of distilled water. The bags were then sterilized at 121 °C for 20 minutes. After cooling, each bag was inoculated with 5 mL of a conidial suspension at a concentration of 1×10^7 conidia·mL⁻¹ and incubated for 16 days at 25 ± 1 °C under a 12:12 h light:dark photoperiod. Five replicates were established per isolate. At the end of the incubation period, the 30 g of rice were transferred to 150 mL of sterile distilled water containing 0.1% Tween 80. The mixture was agitated for 10 minutes and filtered through sterile medical gauze. The total number of conidia per isolate was estimated using a Neubauer hemocytometer. Conidial production per gram of rice was calculated using the same formula applied for conidial production on SDA medium (Torres-de la Cruz et al., 2013).

El efecto de la temperatura sobre la PdC en medio de cultivo SDA se evaluó a través del porcentaje de inhibición o incremento de la PdC al pasar de 25 a 30 °C y de 25 a 35 °C, los cuales se obtuvieron con la fórmula: % INH/INC = [(PdC a 30 °C x 100 / PdC a 25 °C) - 100] y % INH/INC = [(PdC a 35 °C x 100 / PdC a 25 °C) - 100] (Torres-de la Cruz et al., 2013).

Producción de conidios en arroz

Se utilizaron 30 g de arroz contenidos en bolsa de polipapel. El arroz se humedeció con 7 mL de agua destilada y las bolsas con el arroz se esterilizaron a 121 °C durante 20 min. Las bolsas con arroz se inocularon con 5 mL de una suspensión de 1×10^7 conidios·mL⁻¹ y se incubaron por 16 d a 25 ± 1 °C, con fotoperiodo 12:12. Cinco repeticiones por aislamiento se establecieron. Cumplido el tiempo, los 30 g de arroz se transfirieron a 150 mL de ADE + tween 80. Se agitó la suspensión durante 10 min y se filtró con gasa clínica estéril. El total de conidios por aislamiento se determinó con una cámara de Neubauer. La producción de conidios por gramo se estimó con la misma fórmula utilizada para estimar la producción de conidios en medio SDA (Torres-de la Cruz et al., 2013).

Caracterización patogénica

Adultos de *A. tripterus* se capturaron con redes pequeñas en la misma plantación de cacao donde se obtuvieron las chinches micosadas. Los ejemplares capturados se colocaron en envases de plástico con tapa de tela.

Pathogenic characterization

Adults of *A. tripterus* were collected using small sweep nets in the same cacao plantation where the mycosed insects had previously been found. Captured insects were placed in plastic containers covered with mesh lids. As a food source, an immature *T. cacao* fruit approximately 8 cm in length was placed inside each container. The insects were then transported to the Entomopathogen Laboratory at the Academic Division of Biological Sciences, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

In the laboratory, live insects were immersed for 1 minute in a conidial suspension of 1×10^7 conidia·mL⁻¹ + 0.1 % Tween 80. Five *Metarhizium* isolates and one control treatment were evaluated. For the control group, insects were submerged in sterile distilled water (SDW) containing 0.1 % Tween 80. Treated adults were placed in plastic containers with mesh lids. Ten *A. tripterus* adults constituted one experimental unit, with five replicates per fungal isolate. A juvenile cacao pod measuring 8 cm was placed inside each container as a food source. The treated specimens were maintained at 25 ± 1 °C, and humidity was regulated using ADE-moistened cotton wads. Mortality was recorded daily, and dead insects were transferred to a humid chamber to promote sporulation. The effectiveness (EF) of each fungal isolate was determined using mortality data and the formula: $\% EF = [(M_{test} - M_{trat}) / M_{test}] \times 100$; where M_{test} and M_{trat} represent mortality in the control and *Metarhizium* treatment, respectively. Mortality in the control treatment was factored into the formula.

Statistical analysis

Data on mycelial growth, conidial production on SDA medium and rice, and pathogenicity (effectiveness) were analyzed using a completely randomized design with five treatments (isolates). Prior to analysis, mortality data were transformed using the arcsine square root of the proportion. Mycelial growth and conidial production data (on SDA and rice) were log-transformed using the formula $\log(x + 1)$. Subsequently, treatments were compared through ANOVA ($P \leq 0.05$), followed by Tukey's multiple comparison test using SAS software, version 9.0 (SAS Institute Inc.). The time required to reach 50 and 90 % conidial germination (TG_{50} and TG_{90}) was estimated using Probit analysis (SAS Institute Inc.).

Results and Discussion

Morphological and molecular characterization

A total of five fungal isolates were obtained from *A. tripterus* adults naturally infected under field conditions: TCCH2, TCCH5, TCCH7, TCCH8, and

Como alimento, un fruto juvenil de *T. cacao* de 8 cm se colocó dentro del frasco. Las chinches se transportaron al Laboratorio de Entomopatógenos de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

En el laboratorio, los insectos vivos se sumergieron en una suspensión de 1×10^7 conidios·mL⁻¹ + tween 80 (0.1 %) por 1 min. Cinco aislamientos de *Metarhizium* más un tratamiento testigo se evaluaron. Las chinches del tratamiento testigo se sumergieron en ADE + tween 80 (0.1 %). Los adultos tratados se depositaron en envases de plástico con tapas de tela. Diez adultos de *A. tripterus* conformaron una unidad experimental con cinco repeticiones por cepa. Como alimento, un fruto juvenil de 8 cm de *T. cacao* se colocó dentro del frasco. Los especímenes tratados se mantuvieron a 25 ± 1 °C y la humedad se mantuvo con ADE en una torunda de algodón. La mortalidad se registró diariamente y los insectos muertos se colocaron en una cámara húmeda para obtener esporulación. La efectividad (EF) de cada aislamiento se determinó con los datos de mortalidad mediante la fórmula $\% EF = [(M_{test} - M_{trat}) / M_{test}] \times 100$; donde, M_{test} y M_{trat} son la mortalidad en el testigo y tratamiento con *Metarhizium*, respectivamente. La mortalidad en el tratamiento testigo fue integrada en la fórmula.

Análisis estadístico

Los datos de crecimiento micelial, producción de conidios en medio SDA y en arroz, y de patogenicidad (efectividad) se analizaron bajo un diseño completamente al azar con cinco tratamientos (aislamientos). Antes del análisis, los datos de mortalidad se transformaron al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción. Los datos del crecimiento micelial y producción de conidios en medio SDA y en arroz se transformaron a $\log(x + 1)$. Posteriormente, se realizó la comparación de tratamientos mediante análisis de varianza ($P \leq 0.05$) y una prueba de comparación de medias de Tukey con el programa SAS versión 9.0 (SAS Institute Inc.). El tiempo en que ocurrió el 50 y el 90 % de la germinación de conidios (TG_{50} y TG_{90}) se estimó mediante análisis Probit (SAS Institute Inc.).

Resultados y discusión

Caracterización morfológica y molecular

En total se obtuvieron cinco aislamientos fúngicos a partir de los adultos de *A. tripterus* micosados en condiciones de campo: TCCH2, TCCH5, TCCH7, TCCH8, TCCH9. La Figura 2 muestra algunas características morfológicas del hongo. Todos los aislamientos presentaron colonias circulares con superficie de aspecto plano de textura variable y de coloración blanca que se tornó de verde oliva hasta verde oscuro, debido a la maduración de los conidios (Figura 2 A-B). Los conidióforos se observaron hialinos y ramificados con fiálides solitarias, en pares o

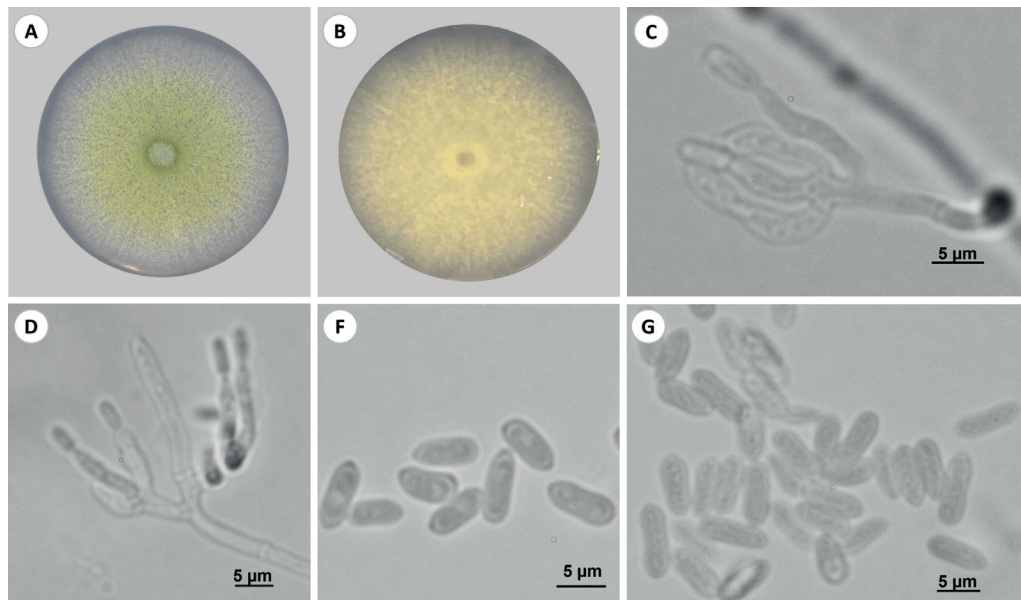


Figure 2. Morphology of *Metarhizium brunneum*. A) Colony on Sabouraud Dextrose Agar supplemented with 0.1 % yeast extract (SDA + YE) after 7 days of growth, B) reverse view, C and D) conidiophores, F and G) conidia.

Figura 2. Morfología de *Metarhizium brunneum*. A) Colonia en medio Agar-Dextrosa Sabouraud + 0.1 de extracto de levadura (SDA + EL) de 7 días de crecimiento, B) reverso, C y D) conidióforos, F y G) conidios.

TCCH9. Figure 2 shows some morphological features of the fungus. All isolates formed circular colonies with a flat surface, variable texture, and initially white coloration that turned olive green to dark green as the conidia matured (Figure 2A–B). The conidiophores were hyaline and branched, bearing phialides singly, in pairs, or in whorls (Figure 2C–D). Conidia were produced in basipetal chains, cylindrical in shape, hyaline or slightly pigmented, and aggregated in olive-green masses (Figure 2E–F). These characteristics are consistent with descriptions for the genus *Metarhizium* as reported by Barnett and Hunter (1998). The conidia measured $5\text{--}8.15 \times 2\text{--}3.08 \mu\text{m}$ (Table 2), which falls within the range described for *M. anisopliae* by Bischoff et al. (2009). However, these authors noted that five *Metarhizium* species – *M. anisopliae*, *M. brunneum* Petch, *M. lepidiotae* (Driver & Milner) J. F. Bisch., S. A. Rehner & Humber, *M. pingshaense* Q. T. Chen & H. L. Guo, and *M. robertsii* J. F. Bisch., S. A. Rehner & Humber – overlap in conidial size and morphology. Therefore, species-level identification cannot be reliably determined based on conidial morphology alone.

Isolates TCCH5, TCCH7, and TCCH8 were identified through sequencing of ITS and β -tubulin. The sequences for these isolates were deposited in GenBank: TCCH5 (accession number: PP948902), TCCH7 (accession numbers: PP938692 and PP948903), and TCCH8 (accession number: PP938693). The phylogenetic tree constructed with sequences from the three *Metarhizium* isolates and additional *Metarhizium* species sequences retrieved from GenBank is shown in

en verticilos (Figura 2 C-D). Los conidios se produjeron en cadenas basipétalas, cilíndricos, hialinos o ligeramente pigmentados, en masas de color verde olivo (Figura 2 E-F). Lo anterior coincidió con los señalamientos de Barnett y Hunter (1998) para el género *Metarhizium*. Los conidios midieron $5\text{--}8.15 \times 2\text{--}3.08 \mu\text{m}$ (Cuadro 2), lo cual coincidió con la especie *M. anisopliae* estudiada por Bischoff et al. (2009); sin embargo, estos autores encontraron que cinco especies de *Metarhizium* se superponen en tamaño y forma: *M. anisopliae*, *M. brunneum* Petch, *M. lepidiotae* (Driver & Milner) J. F. Bisch., S. A. Rehner & Humber, *M. pingshaense* Q. T. Chen & H. L. Guo y *M. robertsii* J. F. Bisch., S. A. Rehner & Humber. Por lo tanto, no es posible distinguir la identidad específica con base solo en la morfología de los conidios.

Los aislamientos TCCH5, TCCH7 y TCCH8 se identificaron mediante secuenciación de ITS y β -tubulina. Las secuencias de estos aislamientos se registraron en el GenBank: TCCH5 (número de acceso: PP948902), TCCH7 (número de acceso: PP938692 y PP948903) y TCCH8 (número de acceso: PP938693). El árbol filogenético con las secuencias de los tres aislamientos de *Metarhizium* y otras secuencias de especies de *Metarhizium* obtenidas del GenBank se muestran en la Figura 3. El análisis *bootstrap* mostró ramas principales que separaron significativamente las secuencias de las especies utilizadas. Con base en los valores significativos de *bootstrap*, las secuencias de tres aislamientos nativos de *Metarhizium*, del presente estudio, se agruparon en un solo clado con la especie tipo y especies de referencia de *M. brunneum*, con un soporte *bootstrap* del 88 %. La especie *M. brunneum* ha sido identificada también

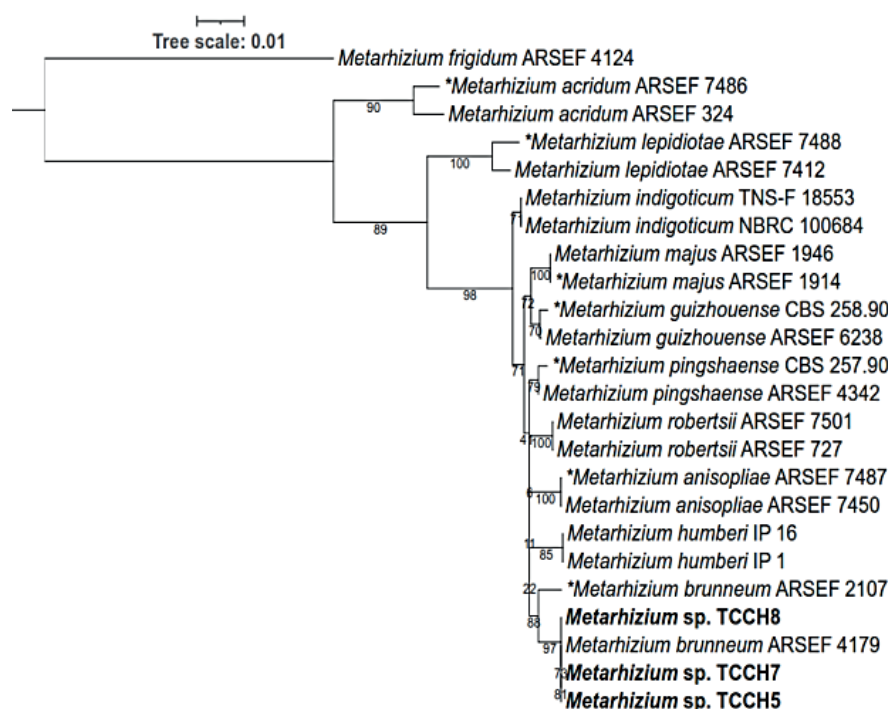


Figure 3. Maximum likelihood phylogenetic analysis of concatenated ITS and β -tubulin sequences from *Metarhizium* spp., based on the TIM2 + G model (Transition model with unequal base frequencies and discrete gamma distribution). Type strains of entomopathogenic fungi are marked with an asterisk. Isolates TCCH5, TCCH7, and TCCH8 clustered with *M. brunneum* reference sequences, supported by a high bootstrap value of 88 %.

Figura 3. Análisis filogenético de máxima verosimilitud de secuencias concatenadas (ITS y β -tubulina) de especies de *Metarhizium* spp., con base en el modelo (TIM2 + G: Transition model and unequal base freq + Discrete gamma model). Las especies tipo de hongos entomopatógenos están marcados con asterisco. Los aislados TCCH5, TCCH7 y TCCH8 se agrupan con especies de *M. brunneum* con un alto porcentaje de soporte de 88 %.

Figure 3. The bootstrap analysis revealed well-supported main branches that clearly separated the sequences of the species used. Based on significant bootstrap values, the sequences from the three native *Metarhizium* isolates in this study grouped into a single clade with the type and reference strains of *M. brunneum*, with a bootstrap support of 88 %. The species *M. brunneum* has also been reported in other countries and from insect hosts across various orders, including Coleoptera, Diptera, Isoptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Orthoptera, and Hemiptera (Bischoff et al., 2009). Within Hemiptera, *M. brunneum* has been reported on the stink bug *Euschistus heros* (Pentatomidae) (Resquín-Romero et al., 2020), the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) (Yousef et al., 2013), and the wireworm *Agriotes* spp. (Razinger et al., 2018). This is the first report of *M. brunneum* infecting *A. tripterus* (Pentatomidae).

Physiological characterization

Mycelial growth

Table 1 shows the results of mycelial growth for the fungal isolates at the three tested temperatures. At

en otros países y en insectos hospederos de varias órdenes: Coleoptera, Diptera, Isoptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Orthoptera y Hemiptera (Bischoff et al., 2009). En el orden Hemiptera, *M. brunneum* ha sido reportado sobre la chinche *Euschistus heros* (Pentatomidae) (Resquín-Romero et al., 2020), la mosca *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) (Yousef et al., 2013) y el escarabajo *Agriotes* spp. (Razinger et al., 2018). Este es el primer reporte de *M. brunneum* sobre *A. tripterus* (Pentatomidae).

Caracterización fisiológica

Crecimiento micelial

El Cuadro 1 muestra los resultados del crecimiento micelial de los aislamientos en las tres temperaturas de evaluación. A 25 °C se registraron diferencias significativas ($P < 0.0085$); los aislamientos con mayor crecimiento micelial fueron TCCH8 (17.27 mm) y TCCH9 (17.21 mm) y el aislamiento con menor crecimiento fue TCCH5 con 16.32 mm, sin diferencias con los aislamientos TCCH7 y TCCH2. A 30 °C, el rango de crecimiento fue de 5.17 a 5.81 mm. A esta temperatura, el crecimiento no mostró variación significativa entre

Table 1. Physiological characterization of native strains of *Metarhizium brunneum* isolated from adults of *Antiteuchus tripterus* in a cacao agroecosystem in Tabasco, Mexico.

Cuadro 1. Caracterización fisiológica de cepas nativas de *Metarhizium brunneum*, obtenidas de adultos de *Antiteuchus tripterus* en el agroecosistema de cacao en Tabasco, México.

Strains/ Cepas	Mycelial growth (mm)/ Crecimiento micelial (mm)			Inhibition (-) or increase (+) (%)/ Inhibición (-) o Incremento (+) (%)	
	25 °C	30 °C	35 °C	25-30 °C	25-35 °C
TCCH2	16.46 ± 0.24 ab	5.81 ± 0.77 a	0	-64.70	-100
TCCH5	16.32 ± 0.30 b	5.42 ± 0.44 a	0	-66.79	-100
TCCH7	16.75 ± 0.49 ab	5.17 ± 0.19 a	0	-69.13	-100
TCCH8	17.27 ± 0.69 a	5.33 ± 0.17 a	0	-69.14	-100
TCCH9	17.21 ± 0.35 a	5.80 ± 0.34 a	0	-66.30	-100

Means (± standard deviation) followed by different letters in a column are statistically different according to Tukey's test ($P < 0.05$)
Medias (± desviación estándar) con letra distinta en una columna son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

25 °C, significant differences were observed among isolates ($P < 0.0085$); the highest mycelial growth was recorded for isolates TCCH8 (17.27 mm) and TCCH9 (17.21 mm), while TCCH5 showed the lowest growth (16.32 mm), although it was not significantly different from TCCH7 and TCCH2. At 30 °C, growth ranged from 5.17 to 5.81 mm, and no significant differences were observed among isolates ($P < 0.1044$). However, all isolates showed a marked reduction in growth, with decreases ranging from 64.7 % to 69.1 % compared to their growth at 25 °C. These findings differ from those reported by Torres-de la Cruz et al. (2013), who found growth inhibition ranging from 0 to 27 % in native isolates of *M. anisopliae* under similar conditions. At 35 °C, mycelial growth was completely inhibited (100 %) for all isolates. In contrast, Torres-de la Cruz et al. (2013) reported inhibition levels between 74.1 % and 86.3 % for *M. anisopliae* at the same temperature. Based on these results, the optimal temperature range for mycelial growth of the native *M. brunneum* isolates was between 25 and 30 °C, consistent with previous reports for *M. anisopliae* (Torres-de la Cruz et al., 2013). Similarly, Ortiz-Catón et al. (2011) noted that the optimal development of entomopathogenic fungi typically occurs between 20 and 28 °C. The thermal performance of *M. brunneum* in this study may be attributed to the tropical origin of the isolates. Moreover, Gebremariam et al. (2021) emphasized the importance of mycelial growth as a key criterion in selecting promising isolates for biological control applications.

Germination rate

According to Table 2, variability was observed in the germination rate of *M. brunneum*, both among isolates and temperatures. At 25 °C, the isolates with the highest and lowest TG_{50} were TCCH2 (8.8 h) and TCCH9 (7.8 h), respectively. These results are similar to those reported by Torres-de la Cruz et al. (2013),

aislamientos ($P < 0.1044$); sin embargo, todas las cepas mostraron disminución que fluctuó de 64.7 % a 69.1 %, al pasar de 25 a 30 °C. Los resultados difieren con lo señalado por Torres-de la Cruz et al. (2013), quienes reportaron inhibición de 0 al 27 % en aislamientos nativos de *M. anisopliae*. Cuando los aislamientos se incubaron a 35 °C, la inhibición del crecimiento micelial fue 100 %; en el estudio de Torres-de la Cruz et al. (2013), la inhibición de *M. anisopliae* varió de 74.1 % hasta 86.3 %. Así, el rango de temperatura para el crecimiento de las cepas nativas de *M. brunneum* fue de 25 a 30 °C, en concordancia con lo reportado para *M. anisopliae* por Torres-de la Cruz et al. (2013). Al respecto, Ortiz-Catón et al. (2011) mencionan que el mejor desarrollo de los hongos entomopatógenos se obtiene de 20 a 28 °C; el desarrollo de *M. brunneum* en este estudio puede ser explicado por el origen tropical de estas cepas. Por otro lado, Gebremariam et al. (2021) resaltan la importancia del crecimiento micelial como una variable que permite la selección de aislamientos promisorios como agentes de biocontrol.

Velocidad de germinación

De acuerdo con el Cuadro 2, se observó variabilidad en la velocidad de germinación de *M. brunneum*, tanto entre aislamientos como entre temperaturas. A 25 °C, los aislamientos con el mayor y menor TG_{50} fue TCCH2 fueron (8.8 h) y TCCH9 (7.8 h). Estos resultados son similares a los de Torres-de la Cruz et al. (2013), quienes reportaron TG_{50} de 7.4 a 8.2 h para aislamientos nativos de *M. anisoplae*, incubados a 25 °C. Sin embargo, el TG_{50} reportado para *M. brunneum* en el presente estudio es menor que el reportado para aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* (12.6 a 15.9 h) por Gerónimo-Torres et al. (2016). A 30 °C, el mayor TG_{50} corresponde a la cepa TCCH5, con 9.5 h y la cepa con el menor TG_{50} fue TCCH2 con 7.8 h, la cual redujo su tiempo de germinación, respecto al TG_{50} obtenido a 25 °C. Cuando el TG_{50} se evaluó a 35 °C, todas las cepas incrementaron

Table 2. Germination time and range of variation (RV) of 50 % of the conidia (TG₅₀) of *Metarhizium brunneum* at 25, 30, and 35 °C.**Cuadro 2. Tiempo de germinación y rango de variación (RV) del 50 % de los conidios (TG₅₀) de *Metarhizium brunneum* a 25, 30 y 35 °C.**

Strains/ Cepas	25 °C		30 °C		35 °C	
	Average (h)/ Media (h)	RV	Average (h)/ Media (h)	RV	Average (h)/ Media (h)	RV
TCCH2	8.8	8.6-9.1	7.8	7.8-8.0	21.9	18.6-38.5
TCCH5	8.3	8.1-8.6	9.5	9.3-9.7	12.7	12.7-12.9
TCCH7	8.2	8.1-8.3	8.6	8.5-8.9	13.8	13.7-13.9
TCCH8	8.5	8.2-8.8	8.5	8.3-8.7	14.1	13.9-14.4
TCCH9	7.8	7.5-8.1	8.0	7.9-8.1	15.0	14.8-15.3

who documented TG₅₀ values ranging from 7.4 to 8.2 h for native isolates of *M. anisopliae* incubated at 25 °C. However, the TG₅₀ values reported for *M. brunneum* in the present study are lower than those reported for native isolates of *Beauveria bassiana* (12.6 to 15.9 h) by Gerónimo-Torres et al. (2016). At 30 °C, the highest TG₅₀ was observed in strain TCCH5, with 9.5 h, while the lowest TG₅₀ was recorded for strain TCCH2, with 7.8 h. Notably, TCCH2 showed a reduced germination time compared to TG₅₀ at 25 °C. When TG₅₀ was assessed at 35 °C, all strains showed an increase in germination time, similar to that reported by Torres-de la Cruz et al. (2013) for *M. anisopliae*. At this temperature, the strain with the highest TG₅₀ was TCCH2, with 21.9 h, while strains TCCH5, TCCH7, and TCCH8 had the lowest TG₅₀ values.

Regarding TG₉₀, at 25 °C, the strain with the longest germination time was TCCH8 (10.9 h), while the strain with the shortest time was TCCH9 (9.6 h) (Table 3). At 30 °C, the strains with the highest and lowest TG₉₀ were TCCH5 and TCCH2, with 12.3 h and 9.5 h, respectively. Similarly, at 35 °C, these two strains maintained the highest and lowest TG₉₀ values, with 27.7 h and 14.6 h, respectively. At this temperature, all strains showed an increased germination time compared to TG₉₀ at 30 °C; however, strains TCCH5, TCCH7, and TCCH8 showed the lowest TG₉₀ values. Although all *M. brunneum* isolates germinated at 25 and 35 °C, the optimal temperature range for conidial germination in these strains is between 25 and 30 °C (Tables 2 and 3). According to Faria et al. (2015), germination speed is also a relevant factor in the selection of efficient strains for use as biological control agents.

Conidial production on SDA + YE medium

According to Table 4, at 25 °C, no significant differences were observed ($P < 0.3340$) in conidial production on SDA + YE medium. However, the isolates with the highest production were TCCH2 and TCCH9, with 9.7×10^7 and 9.0×10^7 conidia·mL⁻¹, respectively. These levels of conidial production are similar to those reported by

su tiempo de germinación, similar a lo reportado por Torres-de la Cruz et al. (2013) para *M. anisopliae*. La cepa con el mayor TG₅₀ fue TCCH2 con 21.9 h y las cepas con menor TG₅₀ fueron TCCH5, TCCH7 y TCCH8.

Con respecto al TG₉₀, a 25 °C, la cepa con el mayor tiempo fue TCCH8 con 10.9 h y la cepa con menor tiempo fue TCCH9 con 9.6 h (Cuadro 3). A 30 °C, las cepas con mayor y menor TG₉₀ fueron TCCH5 y TCCH2 con 12.3 y 9.5 h, respectivamente. Asimismo, a 35°, estas dos cepas mantuvieron el mayor y menor TG₉₀, con 27.7 y 14.6 h, respectivamente. A esta temperatura todas incrementaron su tiempo de germinación respecto al TG₉₀ obtenido a 30 °C; no obstante, las cepas TCCH5, TCCH7 y TCCH8 mostraron los menores TG₉₀. Aunque todos los aislamientos de *M. brunneum* germinaron a 25 y 35 °C, el rango de temperatura óptimo para la germinación de conidios de estas cepas es de 25 a 30 °C (Cuadros 2 y 3). De acuerdo con Faria et al. (2015), la velocidad de germinación también es un factor relevante para la selección de cepas eficientes como agentes de control biológico.

Producción de conidios en medio SDA + EL

Acorde con el Cuadro 4, a 25 °C, no hubo diferencias significativas ($P < 0.3340$) en la producción de conidios en medio SDA + EL; sin embargo, los aislamientos con mayor producción fueron TCCH2 y TCCH9 con 9.7×10^7 y 9.0×10^7 conidios·mL⁻¹, respectivamente. Esta producción de conidios es similar a la reportada por Valle-Ramírez et al. (2022) para aislamientos de *Metarhizium* spp. A 30 °C se presentaron diferencias significativas entre aislamientos ($P < 0.0008$); las cepas con mayor producción de conidios fueron TCCH8 y TCCH9 con 1.5×10^7 y 7.5×10^6 conidios·mL⁻¹, respectivamente, y la de menor producción fue TCCH7 con 3.7×10^6 conidios·mL⁻¹ (Cuadro 4). A esta temperatura, la producción de conidios en medio SDA + EL disminuyó en el rango de 76.2 al 94.7 % con relación a la obtenida a 25 °C, donde la cepa menos afectada por la temperatura fue TCCH8. Los aislamientos que se sometieron a 35 °C no presentaron crecimiento micelial ni producción

Table 3. Germination time and range of variation (RV) for 90 % of conidial (TG₉₀) of *Metarhizium brunneum* at 25, 30, and 35 °C.
Cuadro 3. Tiempo de germinación y rango de variación (RV) del 90 % de los conidios (TG₉₀) de *Metarhizium brunneum* a 25, 30 y 35 °C.

Strains / Cepas	25 °C		30 °C		35 °C	
	Average (h) / Media (h)	RV	Average (h) / Media (h)	RV	Average (h) / Media (h)	RV
TCCH2	10.7	10.3-11.4	9.5	9.3-9.7	27.7	21.6-64.6
TCCH5	10.5	10.0-11.3	12.3	11.8-12.9	14.6	14.4-14.8
TCCH7	9.7	9.6-9.9	10.9	10.5-11.6	15.6	15.4-15.9
TCCH8	10.9	10.3-12.1	10.9	10.4-11.5	16.1	15.7-16.7
TCCH9	9.6	9.1-10.3	10.0	9.8-10.3	17.4	16.9-18.1

Table 4. Conidial production of *Metarhizium brunneum* isolates cultivated on rice and Sabouraud Dextrose Agar medium supplemented with 0.1 % yeast extract.
Cuadro 4. Producción de conidios de aislamientos de *Metarhizium brunneum* cultivados en arroz y medio Agar-Dextrosa Sabouraud + 0.1 de extracto de levadura.

Strains / Cepas	Rice (25 °C) (conidia·g ⁻¹) / Arroz (25 °C) (conidios·g ⁻¹)	SDA +YE (25 °C) (conidia·g ⁻¹) / SDA +EL (25 °C) (conidios·g ⁻¹)	SDA + YE 30 °C (conidia·g ⁻¹) / SDA + EL 30 °C (conidios·g ⁻¹)	Inhibition (-)/Increase (+) (%) / Inhibición (-)/Incremento (+) (%)	
				25-30 °C	25-35 °C
TCCH2	1.98 x 10 ⁸ ± 1.6 x 10 ³ b	9.7 x 10 ⁷ ± 2.0 x 10 ³ a	5.1 x 10 ⁶ ± 1.3 x 10 ³ bc	-94.7	-100
TCCH5	2.03 x 10 ⁸ ± 2.0 x 10 ³ a	8.5 x 10 ⁷ ± 2.3 x 10 ³ a	4.9 x 10 ⁶ ± 7.1 x 10 ³ bc	-94.2	-100
TCCH7	2.04 x 10 ⁸ ± 1.6 x 10 ³ a	8.4 x 10 ⁷ ± 3.0 x 10 ³ a	3.7 x 10 ⁶ ± 1.4 x 10 ³ c	-95.5	-100
TCCH8	2.01 x 10 ⁸ ± 1.3 x 10 ³ ab	6.4 x 10 ⁷ ± 1.4 x 10 ³ a	1.5 x 10 ⁷ ± 3.3 x 10 ³ a	-76.2	-100
TCCH9	1.96 x 10 ⁸ ± 5.6 x 10 ³ c	9.0 x 10 ⁷ ± 3.6 x 10 ³ a	7.5 x 10 ⁶ ± 1.2 x 10 ³ ab	-91.6	-100

Means (± standard deviation) followed by different letters in a column are statistically different according to Tukey's test (*P* < 0.05). SDA + YE = Sabouraud Dextrose Agar + 0.1 % yeast extract.
Medias (± desviación estándar) con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey (*P* < 0.05). SDA + EL = agar-dextrosa Sabouraud + 0.1 % de extracto de levadura.

Valle-Ramírez et al. (2022) for *Metarhizium* spp. isolates. At 30 °C, significant differences were observed among isolates (*P* < 0.0008); the strains with the highest conidial production were TCCH8 and TCCH9, with 1.5 × 10⁷ and 7.5 × 10⁶ conidia·mL⁻¹, respectively, while the lowest production was recorded for TCCH7, with 3.7 × 10⁶ conidia·mL⁻¹ (Table 4). At this temperature, conidial production on SDA + YE medium decreased by 76.2 % to 94.7 % compared to the levels observed at 25 °C, with strain TCCH8 being the least affected by temperature. Isolates incubated at 35 °C showed neither mycelial growth nor conidial production. Gerónimo-Torres et al. (2016) reported a reduction in conidial production in native isolates of *B. bassiana* when incubated from 25 to 30 °C, and also observed no mycelial growth or conidial production at 35 °C. Therefore, the effective temperature range for sporulation in native *M. brunneum* strains was 25 to 30 °C; however, the optimal temperature was 25 °C.

Conidial production on rice

Conidial production on rice varied significantly among isolates (*p* < 0.0004) (Table 4). The strains that showed the highest conidial production were TCCH5,

de conidios. Al respecto, Gerónimo-Torres et al. (2016) también registraron reducción en la producción de conidios en aislamientos nativos de *B. bassiana*, al pasar de 25 a 30 °C, y tampoco observaron crecimiento micelial ni producción de conidios a 35 °C. Por lo anterior, el rango de temperatura para la esporulación de cepas nativas de *M. brunneum* fue de 25 a 30 °C; sin embargo, la temperatura óptima fue 25 °C.

Producción de conidios en arroz

La producción de conidios en arroz varió significativamente (*p* < 0.0004) entre los aislamientos (Cuadro 4). Las cepas que mostraron mayor producción fueron TCCH5, TCCH7 y TCCH8 con 2.03 x 10⁸, 2.04 x 10⁸ y 2.01 x 10⁸ conidios·g⁻¹ de arroz, respectivamente. El aislamiento con menor producción fue TCCH9 con 1.96 x 10⁸ conidios·g⁻¹. De acuerdo con García-Ortiz et al. (2015), la producción de conidios es un factor relevante para el éxito del control biológico con hongos entomopatógenos. Por otro lado, las cepas que presentaron mayor producción de conidios en arroz no coincidieron con las de mayor producción en medio SDA + EL. De acuerdo con Cova et al. (2009), el arroz es

TCCH7, and TCCH8, with 2.03×10^8 , 2.04×10^8 , and 2.01×10^8 conidia·g⁻¹ of rice, respectively. The isolate with the lowest production was TCCH9, with 1.96×10^8 conidia·g⁻¹. According to García-Ortiz et al. (2015), conidial production is a critical factor for the success of biological control using entomopathogenic fungi. The strains that exhibited the highest conidial production on rice did not correspond with those that showed the highest production on SDA + YE medium. As noted by Cova et al. (2009), rice is the most commonly used substrate for the mass production of entomopathogenic fungi at the commercial level.

Phatogenic characterization

Figure 4 shows that all *M. brunneum* isolates exhibited pathogenicity toward *A. tripterus*, with significant differences ($P < 0.0053$) in effectiveness. The isolates that caused the highest mortality rates were TCCH5, TCCH7, and TCCH8, with no significant differences between them. However, the highest mortality rates were observed in TCCH5 and TCCH8, with values of 96.4 % and 89.7 %, respectively, at 8 days post-inoculation. The isolate that caused the lowest mortality was TCCH2, with 72.2 %. These results are consistent with those of Resquín-Romero et al. (2020), who evaluated *M. brunneum* isolates on the stink bug *Euschistus heros* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae);

el sustrato más empleado para la reproducción hongos entomopatógenos a nivel comercial.

Caracterización patogénica

La Figura 4 muestra que todos los aislamientos de *M. brunneum* mostraron patogenicidad sobre *A. tripterus* con diferencias significativas ($P < 0.0053$) en la efectividad. Los aislamientos que ocasionaron el mayor porcentaje de mortalidad fueron TCCH5, TCCH7 y TCCH8 sin diferencias significativas entre ellos; sin embargo, los valores más altos de mortalidad se obtuvieron con los aislamientos TCCH5 y TCCH8, con valores de 96.4 y 89.7 %, a los 8 d después de la inoculación. El aislamiento que causó la menor mortalidad fue TCCH2 con 72.2 %. Estos resultados concuerdan con Resquín-Romero et al. (2020), quienes evaluaron aislamientos de *M. brunneum* sobre la chinche *Euschistus heros* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae); estos autores reportaron mortalidad de 83.3 a 100 % sobre ninfas y adultos, a los 8 d después de la inoculación por inmersión. Otros aislamientos de *M. brunneum* también han causado mortalidad sobre especies de insectos como *Bactrocera oleae* Rossi (Diptera: Tephritidae) (60 % de mortalidad a los 9 d) y *Agriotes* spp. (44.2 % de mortalidad a los 45 d) (Razinger et al., 2018; Yousef et al., 2013). Por otro lado, aislamientos de *M. anisopliae* también han mostrado efectividad de 100 % sobre las

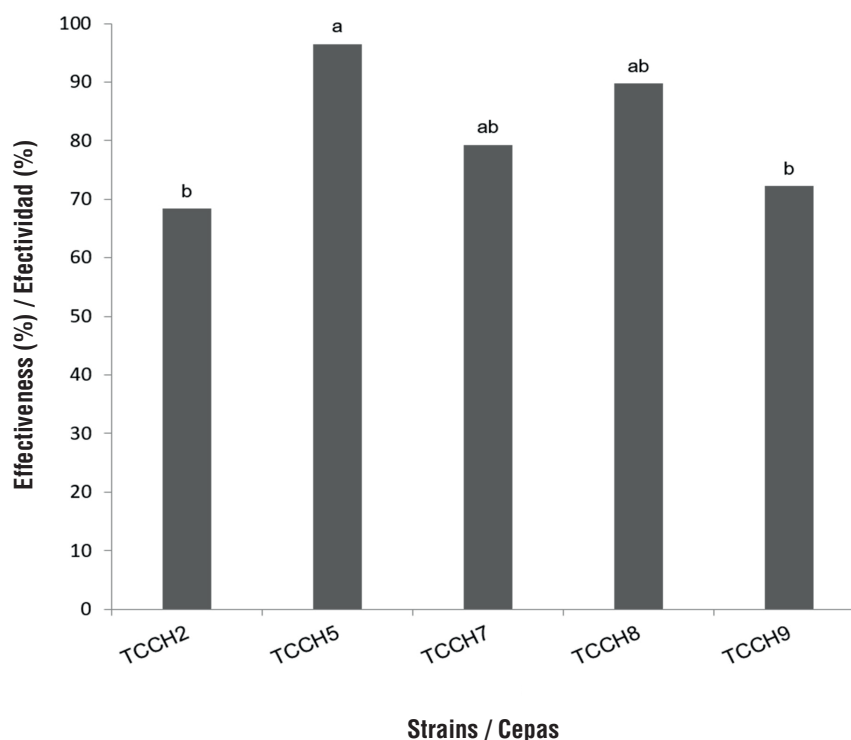


Figure 4. Effectiveness of native *Metarhizium brunneum* isolates against *Antiteuchus tripterus* adults. Bars followed by different letters in a column are statistically different according to Tukey's test ($P < 0.05$).

Figura 4. Efectividad de los aislamientos nativos de *Metarhizium brunneum* sobre adultos *Antiteuchus tripterus*. Barras con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

these authors reported mortality rates ranging from 83.3 to 100 % in nymphs and adults at 8 days post-inoculation by immersion. Other *M. brunneum* isolates have also caused mortality in insect species such as *Bactrocera oleae* Rossi (Diptera: Tephritidae) (60 % mortality at 9 days) and *Agriotes* spp. (44.2 % mortality at 45 days) (Razinger et al., 2018; Yousef et al., 2013). Additionally, *M. anisopliae* isolates have shown 100 % effectiveness on the stink bugs *Nezara viridula* L. in a period of 8 to 10 days (Abdel-Raheem et al., 2011) and *Dichelops melacanthus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae) (Groth et al., 2017).

According to Barrios et al. (2016), the selection of the most promising isolates is essential for obtaining entomopathogenic fungi suitable for development as biopesticides capable of exerting effective regulation of the target pest. To this end, various characteristics of the isolates have been considered, including virulence, inoculum production, growth, sporulation, and tolerance to adverse environmental conditions (García-Ortiz et al., 2015). Based on these criteria, the most promising isolates in this study were TCCH5 and TCCH8. Other studies have also demonstrated the effectiveness of native entomopathogenic fungal isolates against pest species (Clifton et al., 2019; Hernández-Trejo et al., 2019).

Conclusions

The species *Metarhizium brunneum* was identified as an agent associated with the mortality of the black stink bug *Antiteuchus tripterus* in cacao plantations in Tabasco, Mexico. The *M. brunneum* strains exhibited variability in mycelial growth, germination time, conidial production, and pathogenicity. All fungal isolates showed pathogenicity against *A. tripterus* under laboratory conditions, with effectiveness ranging from 72 to 96 %. The native isolates of *M. brunneum* showed a favorable temperature range of 25 to 30 °C. Based on the evaluated characteristics, isolates TCCH5 and TCCH8 are the most promising as biological control agents for *A. tripterus*. This study reports, for the first time, the pathogenicity of *M. brunneum* against *A. tripterus*, contributing to the understanding of entomopathogenic fungal diversity. Field studies are necessary to evaluate the performance of the selected isolates under natural conditions.

Declaration of 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.

chinchas *Nezara viridula* L. en un periodo de 8 a 10 d (Abdel-Raheem et al., 2011) y *Dichelops melacanthus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae) (Groth et al., 2017).

De acuerdo con Barrios et al. (2016), para la obtención de hongos entomopatógenos útiles como bioplaguicidas es necesaria la selección de las cepas más promisorias que puedan ejercer una regulación importante de la plaga de interés. Para ello, diversos atributos de los aislamientos han sido considerados, tales como la virulencia, la producción de inóculo, el crecimiento, la esporulación y la tolerancia a condiciones ambientales adversas (García-Ortiz et al., 2015). Con base en lo anterior, en esta investigación, los aislamientos más promisorios fueron TCCH5 y TCCH8. Otros estudios también han demostrado la eficiencia de aislados nativos de hongos entomopatógenos sobre plagas (Clifton et al., 2019; Hernández-Trejo et al., 2019).

Conclusiones

La especie *Metarhizium brunneum* se identificó como agente asociado a la muerte de la chinche negra *Antiteuchus tripterus* en plantaciones de cacao de Tabasco, México. Las cepas de *M. brunneum* presentaron variabilidad en el crecimiento micelial, tiempo de germinación, producción de conidios y patogenicidad. Todos los aislamientos fúngicos mostraron patogenicidad sobre *A. tripterus* en condiciones de laboratorio, con efectividad del 72 al 96 %. Los aislamientos nativos de *M. brunneum* presentaron un rango de temperatura favorable de 25 a 30 °C. Con base en las características evaluadas, los aislamientos TCCH5 y TCCH8 son los más promisorios como agentes de control biológico de *A. tripterus*. En esta investigación se reporta por primera vez la patogenicidad de *M. brunneum* sobre *A. tripterus* y se aporta al conocimiento de la diversidad de hongos entomopatógenos. Estudios bajo condiciones de campo deberán realizarse para la evaluación de los aislamientos seleccionados.

Declaración de conflictos de intereses

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

- Abdel-Raheem, M. A., Ragab, A., & Abdel-Rhman, I. E. (2011). Effect of entomopathogenic fungi on the green stink bug, *Nezara viridula* L. in sugar-beet in Egypt. *Bulletin of the National Research Council*, 36(2), 145 – 152. <https://acortar.link/bJMLLI>
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.
- Barrios, C. E., Bustillo, A. E., Ocampo, K. L., Angel Reina, M., & Lorena Alvarado, H. (2016). Eficacia de hongos entomopatógenos en el control de *Leptopharsa gibbicularina* (Hemiptera: Tingidae) en palma de aceite. *Revista Colombiana de Entomología*, 42(1), 22 – 27. <https://doi.org/10.25100/socolen.v42i1.6665>
- Bischoff, J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4), 512-530. <https://doi.org/10.3852/07-202>
- Castillo-Carrillo, P. S., Sernaqué-Cortez, A., & Purizaga-Preciado J. L. (2020). Registro del chinche del cacao *Antiteuchus tripterus* (Fabricius, 1877) (Hemiptera: Pentatomidae), en Tumbes, Perú. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural del Paraguay*, 24(1), 15-20. https://www.mades.gov.py/wp-content/uploads/2020/03/24115-20_2020325_Castillo_Antiteuchus.pdf
- Clifton, E. H., Cortell, J., Ye, L., Rachman, T., & Hajek, A. E. (2019). Impacts of *Metarhizium brunneum* F52 infection on the flight performance of Asian longhorned beetles, *Anoplophora glabripennis*. *PLoS ONE*, 14(9), e0221997. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221997>
- Cova, L. J., Scorza, J. V., García, D. E., Cañizález, L. M., Guedez, C. D. C., Maffey, M., & Medina, M. G. (2009). Patogenicidad *in vitro* de *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch en *Musca domestica* (L.) como posible estrategia de control biológico en áreas ganaderas. *Zootecnia Tropical*, 27(2), 113 – 120. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692009000200002
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing. *Nature Methods*, 9, 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Faria, M., Lopes, R. B., Souza, D. A., & Wraight, S. P. (2015). Conidial vigor vs. viability as predictors of virulence of entomopathogenic fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 125(1), 68 – 72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.012>
- García-Ortiz, N., Tlecuil-Beristain, S., Favela-Torres, E., & Loera, O. (2015). Production and quality of conidia by *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*: critical oxygen level and period of mycelium competence. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(1), 2783 – 2791. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6225-2>
- Gebremariam, A., Chekol, Y., & Assefa, F. (2021). Phenotypic, molecular, and virulence characterization of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) Vuillemin, and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin from soil samples of Ethiopia for the development of mycoinsecticide. *Heliyon*, 7(5), e07091. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07091>
- Gerónimo-Torres, J. D. C., Torres-de la Cruz, M., Pérez-de la Cruz, M., de la Cruz-Pérez, A., Ortiz-García, C. F., & Cappello-García, S. (2016). Caracterización de aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* y su patogenicidad hacia *Hypothenemus hampei*, en Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología*, 42(1), 28 – 35. <https://doi.org/10.25100/socolen.v42i1.6666>
- Gouy, M., Guindon, S., & Gascuel O. (2010). SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 221 – 224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Groth, M. Z., Bellé, C., Zimmer, G., Groth, M. Z., Edu-Kaspary, T., Pimentel, J. R., Zimmer, P. D. (2017). Control of wheat stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in southern Brazil using the fungus '*Metarhizium anisopliae*'. *Australian Journal of Crop Science*, 11, 360 – 366. <https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.03.pne219>
- Hernández-Trejo, A., Estrada-Drouaillet, B., López-Santillan, J. A., Rios-Velasco, C., Rodríguez-Herrera, R., & Osorio-Hernández, E. (2019). Effects of native entomopathogenic fungal strains and neem extract on *Spodoptera frugiperda* on maize. *Southwestern Entomologist*, 44(1), 117-124. <https://doi.org/10.3958/059.044.0113>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Letunic, I., Khedkar, S., & Bork, P. (2021). SMART: recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic Acids Research*, 49, 458 – 460. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa937>
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution*, 37, 1530 – 1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Ortiz-Catón, M., Alatorre-Rosas, R., Valdivia-Bernal, R., Ortiz-Catón, A., Medina-Torres, R., & Alejo-Santiago, G. (2011). Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre el desarrollo de los hongos entomopatógenos. *Revista Biociencias*, 1(2), 42 – 53. <https://doi.org/10.15741/revbio.01.02.05>
- Pu, J., & Chung, H. (2024). New and emerging mechanisms of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science*, 63, 101184. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2024.101184>
- Razinger, J., Schroers, H. J., & Urek, G. (2018). Virulence of *Metarhizium brunneum* to field collected *Agrotis* spp. wireworms. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 20(2), 309 – 320. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20183349173>
- Resquin-Romero, G., Cabral-Antunez, C., Sarubbi-Orue, H., Garrido-Jurado, I., Valverde-García, P., Schade, M., & Butt, T. M. (2020). Virulencia de las cepas *Metarhizium brunneum* (Ascomycota: Hypocreales) contra las chinches *Euschistus heros* y *Dichelops furcatus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Revista de Entomología Económica*, 113(5), 2540 – 2545. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa150>
- Sánchez-Soto, S., & Cortéz-Madrigal, H. (2000). Daños causados por *Hemeroblemma mexicana* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae) en el cultivo de cacao en Tabasco, México. *Agrotrópica*, 12(3), 143 – 146. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/ceplac/publicacoes/revista-agrotropica/revista-volumes/2000-a-2010/revista-agrotropica-vol-12-no-3-2000.pdf>
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). (2016). *Cultivos monospóricos de hongos*

- entomopatógenos. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172904/Ficha_CB_27_Cultivos_monosp_ricos_de_hongos_entomopat_genos.pdf
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2023). *Producción agrícola*. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>
- Torres-de la Cruz, M., Ortiz-García, C. F., Téliz-Ortiz, D., Mora-Aguilera, A., & Nava-Díaz, C. (2013). Efecto del azoxystrobin sobre *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(1), 65–69. https://rmf.smf.org.mx/DocumentosVolumenes/Escrito_31_1_7.pdf
- Torres-de la Cruz, M., de la Cruz-Pérez, A., Pérez-de la Cruz, M., & Ortiz-García, C. F. (2019). Registro y descripción del daño de la cochinilla rosada del hibisco, *Maconellicoccus hirsutus* Green (Hemiptera: Pseudococcidae), en *Theobroma cacao* L., en Tabasco, México. *Revista Chilena de Entomología*, 45(1), 158–163. <https://biotaxa.prod.amazon.auckland.ac.nz/rce/article/view/48709>
- Valle-Ramírez, S. B., Torres-Gutiérrez, R., Caicedo-Quinche, W. O., Abril-Saltos, R. V., & Sucoshañay-Villalba, D. J. (2022). Aislamiento y caracterización de *Metarhizium* spp. de cultivos de caña de azúcar y su patogenicidad contra *Mahanarva andigena* (Hemiptera: Cercopidae). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 23(1), e2361. https://doi.org/10.21930/rcta.vol23_num1_art:236
- Yepes-Rodríguez, F. C. (2019). Nuevo hospedero de la chinche negra, *Antiteuchus tripterus* Fabricius, 1787 (Hemiptera: Pentatomidae). *Revista Metroflor-Agro*, 91(1), 8–14. <https://www.metroflorcolombia.com/edicion-no-91/>
- Yousef, M., Lozano-Tovar, M. D., Garrido-Jurado, I., & Quesada-Moraga, E. (2013). Biocontrol of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) with *Metarhizium brunneum* and its extracts. *Journal of Economic Entomology*, 106(3), 1118–1125. <https://doi.org/10.1603/EC12489>

Dendrochronological research in Mexico: A bibliometric analysis

La investigación dendrocronológica en México: un análisis bibliométrico

Teodoro Carlón-Allende¹; Karla A. De La Peña-Guillén²;
José Villanueva-Díaz³; José L. Macías-Vázquez⁴

¹Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geofísica, Unidad Michoacán -SECIHTI. Antigua Carretera a Pátzcuaro núm. 8701, col. Exhacienda de San José de La Huerta. C. P. 58190. Morelia, Michoacán, México.

²University of Ostrava, Faculty of Science, Department of Physical Geography and Geocology. Chittussiho 10, 710 00 Ostrava, Czech Republic.

³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. km 6.5 margen derecha Canal de Sacramento. C. P. 35140. Gómez Palacio, Durango, México.

⁴Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geofísica, Unidad Michoacán. Antigua Carretera a Pátzcuaro núm. 8701, col. Exhacienda de San José de La Huerta. C. P. 58190. Morelia, Michoacán, México.

*Corresponding author: tcarlon@igeofisica.unam.mx; tel.: +52 443 322 2777 ext. 42681.

Abstract

Introduction. The study of tree-rings has achieved great relevance due to its increasing application to address sciences such as Climatology, Ecology, Geomorphology, among others.

Objective. To carry out a bibliometric analysis of the dendrochronological studies developed in Mexico, providing an overview of research trends and identifying areas of opportunity for future development of this science.

Materials and methods. Articles published between 2000 and 2023 were searched in Web of Science, Scopus, Redalyc, and Scielo. The data was analyzed using VOSviewer software.

Results and discussion. A total of 229 articles were found, involving 76 tree species in 25 states; Sinaloa, Tabasco, Campeche, Quintana Roo, Aguascalientes, Nayarit, and Guerrero lack dendrochronological research. *Pinus hartwegii*, *Pseudotsuga menziesii*, and *Abies religiosa* are the most explored species. Over the past 13 years, publications have increased exponentially ($R^2 = 0.837$); the majority focus on dendroclimatology (52%), while dendrovolcanology, dendroarchaeology, and dendrohydrology have been minimally explored. Mexican journals published only 26 % of the articles, and the main collaboration networks include the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, the Universidad Nacional Autónoma de México and the Universidad Juárez del Estado de Durango.

Conclusions. Few studies were identified on tropical and broadleaf species, despite their dendrochronological potential, and there are seven states where no research has been conducted on this topic. The information generated provides opportunities for developing studies on growth rate analysis, hydroclimatic reconstructions, and ecological research for species conservation.

Keywords: Tree-rings; chronology; dendroclimatology; dendrogeomorphology; dendroecology.

Resumen

Introducción. El estudio de los anillos de crecimiento de los árboles ha alcanzado gran relevancia, debido a su creciente aplicación para abordar ciencias como climatología, ecología, hidrología, vulcanología y geomorfología.

Objetivo. Realizar un análisis bibliométrico de los estudios sobre dendrocronología desarrollados en México, para proporcionar una visión general de las tendencias de investigación y áreas de oportunidad de esta ciencia.

Materiales y métodos. Se hizo una búsqueda de artículos en Web of Science, Scopus, Redalyc y Scielo, publicados durante el período 2000-2023. La información se analizó con el programa VOSviewer.

Resultados y discusión. Se encontraron 229 artículos que involucraron 76 especies arbóreas en 25 estados; Sinaloa, Tabasco, Campeche, Quintana Roo, Aguascalientes, Nayarit y Guerrero no cuentan con investigación dendrocronológica. Las especies más exploradas son *Pinus hartwegii*, *Pseudotsuga menziesii* y *Abies religiosa*. En los últimos 13 años, las publicaciones incrementaron exponencialmente ($R^2 = 0.837$); la mayoría tienen un enfoque dendroclimático (52 %), mientras que la dendrovolcanología, dendroarqueología y dendrohidrología han sido poco exploradas. Las revistas mexicanas publicaron solo 26 % de los artículos y las principales redes de colaboración están integradas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, la Universidad Nacional Autónoma de México y la Universidad Juárez del Estado de Durango.

Conclusiones. Se identificaron pocos estudios con especies tropicales y latifoliadas, a pesar de tener potencial dendrocronológico, y siete estados donde no se ha desarrollado investigación al respecto. La información generada ofrece áreas de oportunidad para el desarrollo de trabajos en análisis de tasas de crecimiento, reconstrucciones hidroclimáticas y estudios ecológicos para la conservación de especies.

Palabras clave: anillos de crecimiento; cronología; dendroclimatología; dendrogeomorfología; dendroecología.

Introduction

Dendrochronology is the science that dates the exact year of formation of tree rings, in order to identify and quantify historical events that have occurred in the last centuries or millennia (Fritts, 1976). This is possible because trees are long-term bioindicators (Carlón-Allende et al., 2021; Pawlik et al., 2023). Therefore, dendrochronology is considered a science with great scope in the research of natural and anthropic phenomena such as climate reconstructions (Cook et al., 2016; Morales et al., 2020; Stahle et al., 2016), geomorphological events (Bovi et al., 2022; Tichavský, 2023), fire frequency regimes (Cerano-Paredes et al., 2021; Margolis et al., 2022), volcanic eruptions (Seiler et al., 2017), and reconstructions of the interaction between anthropogenic changes and the environment through dendroarchaeological techniques (Shindo & Wazny 2023). Despite its significant contributions, dendrochronology is a relatively young science; its origins trace back to the late 19th and early 20th centuries (Douglass, 1914), but it wasn't until 1937 that the first tree ring laboratory was founded. In 1970, dendrochronology was established as a relevant science, primarily due to its contributions in climate studies and the understanding of forest dynamics on a temporal scale of hundreds and in some cases, thousands of years (Fritts, 1976). Understanding historical events of both natural and anthropogenic origin requires data with extensive spatial coverage; however, many parts of the world lack pre-instrumental data. Consequently, the longevity of tree species with well-defined tree rings and wide spatial-temporal coverage has significantly contributed to the understanding of interannual and multiyear climate variation, as well as the atmospheric circulation phenomena that modulate them (Babst et al., 2017; Zhao et al., 2019).

In Mexico, the first publication on dendrochronology was the study conducted by Schulman (1944), who developed a tree-ring chronology to determine the variation of precipitation, temperature, and streamflow. Two decades later, other chronologies were developed for northern Mexico (Scott, 1966). Subsequently, Schulman generated 20 tree-ring chronologies; however, many of these have not been used under any specific approach (Villanueva-Díaz et al., 2003). Another dendrochronological study was conducted by Naylor (1971), who preliminarily evaluated the dendrochronological potential of *Pinus ayacahuite* Ehrenb. ex Schltdl. (currently *Pinus strobiformis*), *P. rudis* Endl., and *P. pseudostrobus* Lindl. Additionally, Huante et al. (1991) conducted exploratory dendrochronological research in the Monarch Butterfly Biosphere Reserve and related tree ring growth to precipitation and temperature; they also identified that spring precipitation and winter temperature influence the development of tree rings.

Introducción

La dendrocronología es la ciencia mediante la cual se data el año exacto de formación de los anillos de crecimiento, para la identificación y cuantificación de eventos históricos ocurridos en los últimos siglos o milenios (Fritts, 1976); esto es posible debido a que los árboles son bioindicadores de largo plazo (Carlón-Allende et al., 2021; Pawlik et al., 2023). Por lo tanto, la dendrocronología es una ciencia de gran alcance en la investigación de fenómenos naturales y antrópicos como reconstrucciones climáticas (Cook et al., 2016; Morales et al., 2020; Stahle et al., 2016), eventos geomorfológicos (Bovi et al., 2022; Tichavský, 2023), regímenes de frecuencia de incendios (Cerano-Paredes et al., 2021; Margolis et al., 2022), erupciones volcánicas (Seiler et al., 2017) y reconstrucciones de la interacción entre los cambios antropogénicos y el medio ambiente mediante técnicas dendroarqueológicas (Shindo & Wazny 2023). A pesar de los grandes aportes, la dendrocronología es una ciencia joven; sus inicios datan de finales del siglo XIX y principios del siglo XX (Douglass, 1914), pero no fue hasta 1937 que se fundó el primer laboratorio de investigación sobre anillos de crecimiento de los árboles. En 1970, la dendrocronología se consagró como una ciencia relevante, debido a sus aportes, principalmente en el tema de clima y en la comprensión de la dinámica forestal a escala temporal de cientos y en ocasiones de miles de años (Fritts, 1976). La comprensión de los eventos históricos de origen natural y antrópico requieren datos con amplia cobertura espacial; sin embargo, en muchas partes del mundo se carece de datos preinstrumentales. Por lo tanto, la longevidad de especies arbóreas con anillos de crecimiento bien definidos y de amplia cobertura espacio-temporal ha contribuido notablemente a la comprensión de la variación interanual y multianual del clima y los fenómenos de circulación atmosférica que los modulan (Babst et al., 2017; Zhao et al., 2019).

En México, la primera publicación sobre dendrocronología corresponde al estudio realizado por Schulman (1944), quien desarrolló una cronología de anillos de crecimiento de árboles para determinar la variación de la precipitación, temperatura y escurrimiento de ríos. Dos décadas después se desarrollaron otras cronologías para el norte de México (Scott, 1966). Posteriormente, Schulman generó 20 cronologías de anillos de crecimiento de árboles; sin embargo, muchas de estas no se han utilizado bajo ningún enfoque (Villanueva-Díaz et al., 2003). Otra investigación dendrocronológica fue la desarrollada por Naylor (1971), quien evaluó preliminarmente el potencial dendrocronológico de *Pinus ayacahuite* Ehrenb. ex Schltdl. (actualmente *Pinus strobiformis*), *P. rudis* Endl. y *P. pseudostrobus* Lindl. Asimismo, Huante et al. (1991) realizaron investigación dendrocronológica exploratoria en la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca y relacionaron el crecimiento de los anillos con la precipitación y temperatura; además, identificaron que la

Since 2000, dendrochronological research in Mexico has made substantial contributions to reconstructing precipitation and identifying climatic variables that influence forest growth (Acosta-Hernández et al., 2017); dendrochemical analysis to understand environmental changes caused by natural and anthropogenic sources (Beramendi-Orosco et al., 2018; Sheppard et al., 2008); dendrogeomorphological analysis to comprehend the dynamics of debris flows (De la Peña et al., 2024; Franco-Ramos et al., 2019), the assessment of lahar events (Figueroa-García et al., 2021), the reconstruction of floods (Sánchez-Asunción et al., 2020), and erosion processes (Franco-Ramos et al., 2023); the impact of droughts and wildfires on forest growth (González-Tagle et al., 2023; Margolis et al., 2022); the effect of volcanic eruptions on forest growth (Carlón-Allende et al., 2020, 2022; Sheppard et al., 2008) and studies on the impact of global warming on radial growth and species recruitment at the treeline (Astudillo-Sánchez et al., 2017). However, despite all these contributions, there are still gaps in knowledge that have not been sufficiently addressed to support species conservation plans or sustainable management of ecosystems with high biodiversity. An example of these gaps includes the identification of the dendrochronological potential of species in tropical ecosystems or temperate broadleaf forests (Villanueva et al., 2021).

The objective of this study was to analyze the current state of dendrochronological research conducted in Mexico from 2000 to 2023 through a bibliometric analysis. This analysis highlights the contribution of studies to the understanding of natural phenomena (ecological, environmental, and Earth sciences). It facilitates the identification of the most studied species, the geographical distribution of the research, fields of application, collaboration networks among institutions and authors, and the evolution of dendrochronological research. The information generated has not been reported in other reviews; one of these was developed in 2003 (Villanueva et al., 2003) and another in 2017 (Acosta et al., 2017), but they only reported 24 % of the articles identified in the present review.

Materials and Methods

Compilation of Publications

This study consisted of a search for scientific articles focused on dendrochronological research in Mexico from 2000 to 2023. The search was conducted in Scopus, Web of Science, Redalyc, and Scielo. The search included keywords in both Spanish and English, such as “dendrochronology”, “tree rings” and “Mexico” used to retrieve titles, abstracts, and keywords of publications. In addition, these terms were combined with the words “dendroclimatology”, “dendropyrology”, “dendrochemistry”, “dendrovulcanology”,

precipitación de primavera y la temperatura de invierno influyen en el desarrollo de los anillos de crecimiento.

A partir del año 2000, la investigación dendrocronológica en México ha generado aportes sustanciales en la reconstrucción de precipitación e identificación de variables climáticas que influyen en el crecimiento de los bosques (Acosta-Hernández et al., 2017); análisis dendroquímico para comprender los cambios ambientales provocados por fuentes naturales y antrópicas (Beramendi-Orosco et al., 2018; Sheppard et al., 2008); análisis dendrogeomorfológico para comprender la dinámica de flujos de detritos (De la Peña et al., 2024; Franco-Ramos et al., 2019), evaluación de eventos de lahares (Figueroa-García et al., 2021), reconstrucción de inundaciones (Sánchez-Asunción et al., 2020) y procesos de erosión (Franco-Ramos et al., 2023); impacto de sequías e incendios en el crecimiento de los bosques (González-Tagle et al., 2023; Margolis et al., 2022); impacto de las erupciones volcánicas en el crecimiento de los bosques (Carlón-Allende et al., 2020, 2022; Sheppard et al., 2008) y estudios del impacto de calentamiento global en el incremento radial y reclutamiento de especies en el límite arbóreo (Astudillo-Sánchez et al., 2017). No obstante, a pesar de todos estos aportes, aún existen vacíos de conocimiento que no han sido suficientemente abordados para el sustento de planes de conservación de especies o manejo sustentable de ecosistemas con alta biodiversidad. Un ejemplo de estos vacíos incluye la identificación del potencial dendrocronológico de especies en ecosistemas tropicales o bosques templados de especies latifoliadas (Villanueva et al., 2021).

El objetivo de este estudio fue analizar el estado actual de la investigación dendrocronológica desarrollada en México en el periodo 2000-2023, mediante un análisis bibliométrico, donde se destaca la contribución de los estudios para la comprensión de fenómenos naturales (ecológicos, ambientales y en ciencias de la Tierra). Esto facilita la identificación de las especies más estudiadas, la distribución geográfica de los estudios, los campos de aplicación y las redes de colaboración entre instituciones y autores, así como la evolución de la investigación dendrocronológica. La información generada no ha sido reportada en otras revisiones; una de estas se desarrolló en 2003 (Villanueva et al., 2003) y otra en 2017 (Acosta et al., 2017), pero solo reportaron 24 % de los artículos identificados en la presente revisión.

Materiales y métodos

Recopilación de publicaciones

Este estudio consistió en la búsqueda de artículos científicos enfocados en la investigación dendrocronológica en México durante el período 2000-2023. La búsqueda se hizo en Scopus, Web of Science, Redalyc y Scielo e incluyó las palabras clave en español

“dendrogeomorphology”, “dendroarchaeology”, “dendroecology”, and “dendrohydrology” to identify all dendrochronological subfield. The databases and keywords used for article searching could have underestimated some available information; however, the data reported represent the state of dendrochronological publications currently available in Mexico.

Data Analysis

The articles found in Scopus were used as a reference, and duplicates from other databases were removed. This bibliometric review excluded review articles, articles in non-indexed journals, technical reports, theses, and conference proceedings. A total of 229 articles were identified and classified according to the following parameters: year of publication, influential authors, publishing journals, study area (state and GPS coordinates), tree species, subfield of study (dendroclimatology, dendrochemistry, dendrogeomorphology, etc.), influential institutions, and co-occurrence analysis of keywords used by the authors. The analysis of co-occurrence was useful for understanding the relationship between words and groups and by topic and meaning. A total of 25 keywords with a frequency of ≥ 5 were selected from a total of 535. Collaboration networks were analyzed using VOSviewer version 1.6.20 (van Eck & Waltman, 2023) to identify the leading authors, institutions, and even countries involved in dendrochronological research in Mexico. Additionally, co-occurrence analysis was conducted based on the VOS clustering algorithm to determine relationships between keywords (Kirby, 2023). VOSviewer is a robust tool that uses clustering algorithms based on the strength of connections between elements to build networks (Effendi et al., 2021). This analysis provided insights into the most frequently addressed topics in publications, the research fields developed, and potential research gaps to be explored in future dendrochronological studies.

Results and Discussion

Trends in Dendrochronological Research

A total of 229 articles (Appendix 1) related to dendrochronological research in Mexico were identified for the 2000–2023 period. Figure 1 shows that fewer than 10 publications were identified before 2000, most of the authors were researchers from the United States of America (USA). Between 2000 and 2023, the number of publications exhibited an exponential trend ($R^2 = 0.837$), with an average of 9.5 articles per year. The trend became significant from 2013 to 2023, because 83 % of the total was published in this period (12.6 articles per year) with 21 articles in the years 2022 and 2023, and 17 and 20 articles in 2018 and 2020, respectively (Figure 1. In contrast, prior

e inglés: ‘dendrocronología’, ‘anillos de crecimiento de árboles’ y ‘México’ para la recuperación de títulos, resúmenes y palabras clave de las publicaciones. Además, estos términos se combinaron con las palabras ‘dendroclimatología’, ‘dendropirocronología’, ‘dendroquímica’, ‘dendrovulcanología’, ‘dendrogeomorfología’, ‘dendroarqueología’, ‘dendroecología’ y ‘dendrohidrología’ con el fin de identificar todos los subcampos dendrocronológicos. Las bases de datos y palabras clave utilizadas para la búsqueda de artículos podría haber subestimado alguna información disponible; no obstante, los datos reportados representan el estado de las publicaciones dendrocronológicas disponibles actualmente en México.

Análisis de datos

Los artículos encontrados en Scopus se utilizaron como referencia y se eliminaron los duplicados en las otras bases de datos. Esta revisión bibliométrica no consideró los artículos de revisión, artículos en revistas no indexadas, informes o reportes técnicos, tesis ni memorias de congresos. En el análisis se identificaron 229 artículos y se clasificaron acorde con los parámetros siguientes: año de publicación, autores influyentes, revistas de publicación, área de estudio (entidad y coordenadas GPS), especies arbóreas, subcampo de estudio (dendroclimatología, dendroquímica, dendrogeomorfología, etc.), instituciones influyentes y análisis de coocurrencia de palabras clave utilizadas por los autores. Este último fue útil para comprender la relación entre palabras y grupos, así como el tema y significado de cada palabra. Se seleccionaron 25 palabras clave con una frecuencia ≥ 5 de un total de 535. Las redes de colaboración se analizaron mediante el programa VOSviewer versión 1.6.20 (van Eck & Waltman, 2023), para la identificación de los principales autores, instituciones e incluso países que han desarrollado investigación dendrocronológica en México. Asimismo, con base en el algoritmo de agrupación VOS, se hizo el análisis de coocurrencia para determinar la relación entre palabras claves (Kirby, 2023). VOSviewer es una herramienta robusta que utiliza algoritmos de agrupaciones con base en la fortaleza de las conexiones entre elementos para construir redes (Effendi et al., 2021). Este análisis permitió la comprensión de los temas más abordados en las publicaciones, los campos de investigación desarrollados y las posibles brechas de investigación para abordar en trabajos dendrocronológicos futuros.

Resultados y discusión

Tendencia de la investigación dendrocronológica

Se encontraron 229 artículos (Anexo 1) relacionados con la investigación dendrocronológica en México para el período 2000-2023. La Figura 1 indica que antes del

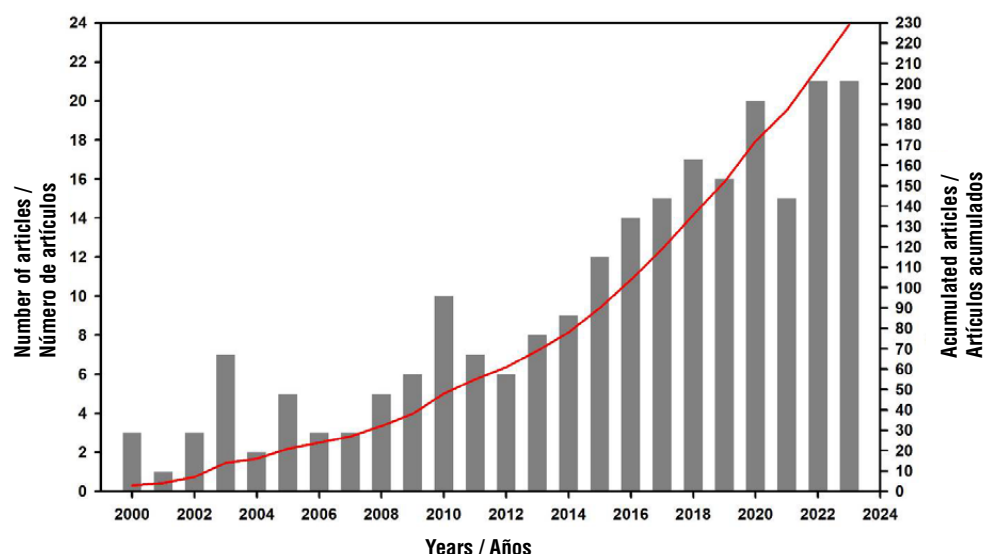


Figure 1. Dendrochronological research articles developed in Mexico, published (dark bars) and accumulated (red line) by year. Period 2000-2023.

Figura 1. Artículos de investigación dendrocronológica desarrollada en México, publicados (barras en color obscuro) y acumulados (línea roja) por año en el período 2000-2023.

to 2010 (2000–2010), an average of four articles were published annually, with 2001 having the lowest output (one article, Figure 1).

In addition to research articles published in Journal Citation Reports, there are a considerable number of publications in Mexican journals that are not indexed, as well as research essays, bachelor theses (approximately 130), dissertations (20), technical reports (20), review articles (4) and electronic reports. Despite the volume of these dendrochronological publications, this study only included indexed articles, specifically from Scopus and Web of Science, because these databases are regarded as key sources for bibliometric analyses (Pranckutė, 2021).

The increase in studies is driven by the growing interest in dendrochronological research. As a result, research and educational institutions in Mexico are offering both traditional and intensive courses in dendrochronology, with applications across various scientific fields. These institutions include the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED), Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) and Universidad Autónoma de Tamaulipas (UAT). Additionally, the expanding collaboration and interaction with researchers from foreign educational institutions, such as the University of Arizona, Northern Arizona University, the University of Arkansas, the University of California, and Ithaca University, have enriched the scope of dendrochronological research and contributed

año 2000 se identificaron menos de 10 publicaciones; la mayoría de los autores fueron investigadores de Estados Unidos de América (EUA). Entre 2000 y 2023, el número de publicaciones tuvo una tendencia exponencial ($R^2 = 0.837$) con un promedio de 9.5 artículos por año. La tendencia fue significativa del 2013 al 2023, ya que en este período se publicó 83 % del total (12.6 artículos por año) con 21 artículos en los años 2022 y 2023, y 17 y 20 artículos en 2018 y 2020, respectivamente (Figura 1). En contraste, previo al 2010 (2000-2010), se publicaban en promedio cuatro artículos por año, siendo 2001 el año con menor producción (un artículo, Figura 1).

Además de los artículos de investigación en Journal Citation Reports, existe un número considerable de publicaciones en revistas mexicanas que no están indexadas, así como ensayos de investigación, tesis de licenciatura (130 aproximadamente), disertaciones (20), informes técnicos (20), artículos de revisión (4) e informes electrónicos. A pesar de la cantidad de estas publicaciones dendrocronológicas, en este estudio solo se incluyeron artículos indexados, v. g., Scopus y Web of Science, dado que estas bases de datos se consideran fuentes clave en los análisis bibliométricos (Pranckutė, 2021).

El incremento de estudios se deriva del creciente interés por la investigación dendrocronológica; por ello, instituciones de investigación y educativas en México están ofreciendo cursos tradicionales e intensivos en dendrocronología con aplicaciones en diversos campos científicos. Entre estas se encuentran el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Universidad Juárez del

to the training of undergraduate and graduate students. This has also increased the participation of scientists in dendrochronology. This training extends beyond dendroclimatology to several subfields, including dendrogeomorphology, dendrochemistry, and dendrovolcanology.

Distribution of Dendrochronological Publications

The bibliometric analysis produced a map showing the distribution of publications by federal entity, representing the sites where dendrochronological studies were conducted, and samples were collected. Sometimes, samples were collected from multiple sites, species, and even countries (Stahle et al., 2016).

In Mexico, dendrochronological studies have been carried out in 25 states. Figure 2 indicates that Durango has the highest number of publications (44), followed by Puebla (33), Chihuahua (22), and Estado de México (22). Most of these studies have been conducted in the Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental, and the Trans-Mexican Volcanic Belt – physiographic provinces characterized by temperate coniferous forests (Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2021). However, some studies have been conducted in tropical ecosystems, such as Yucatán (Figure 2), where 52 species were explored to assess their dendrochronological potential (Roig et al., 2005). This information is essential for analyzing biomass production, ecological aspects, and the influence of human-induced environmental changes. In contrast, states such as Sinaloa, Tabasco, Campeche, Quintana Roo, Aguascalientes, Nayarit, and Guerrero have no published studies (Figure 2), despite the existence of some dendrochronological series. This highlights the urgent need to conduct research with local species in these regions.

Tree Species Studied in Dendrochronological Research

Dendrochronological publications in Mexico have analyzed a total of 76 tree species. Figure 3 shows that the most extensively studied species are *Pinus hartwegii* Lindl. (47 publications), *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco (33 publications), *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. & Cham. (26 publications), *Taxodium mucronatum* Ten. (18 publications), *Pinus cembroides* Zucc. (15 publications), and *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. (15 publications). The remaining species have been studied in fewer than 13 publications. In addition, seven studies did not specify the species analyzed, and 30 species were each studied in only one publication (Figure 3). Of the 229 studies conducted in Mexico, 160 (70 % of the articles) focused on just five species, predominantly conifers. This highlights the need to

Estado de Durango (UJED), Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y Universidad Autónoma de Tamaulipas (UAT). También la creciente colaboración e interacción con investigadores de instituciones educativas extranjeras, incluyendo la Universidad de Arizona, Universidad del Norte de Arizona, Universidad de Arkansas, Universidad de California y Universidad de Ithaca, ha enriquecido el alcance de la investigación de la dendrocronología y la formación de estudiantes de pregrado y posgrado; asimismo, ha incrementado la participación de científicos en dendrocronología. Esta formación se extiende a varios subcampos mas allá de la dendroclimatología, como es el caso de la dendrogeomorfología, dendroquímica y dendrovulcanología.

Distribución de publicaciones dendrocronológicas

A partir del análisis bibliométrico se derivó un mapa con la distribución de publicaciones por entidad federativa; es decir, sitios donde se desarrolló el estudio y se colectaron muestras dendrocronológicas. En algunas publicaciones se colectaron muestras en más de un sitio e incluso comprenden más de una especie y países (Stahle et al., 2016).

En México, se han realizado estudios dendrocronológicos en 25 estados. En la Figura 2 se aprecia que Durango es el que tiene el mayor número de publicaciones (44), seguido por Puebla (33), Chihuahua (22) y el Estado de México (22). Estos estudios, en su mayoría, se han desarrollado en la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental y Cinturón Volcánico Transmexicano, provincias fisiográficas que se caracterizan por la presencia de bosques templados de coníferas (Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2021). No obstante, algunos estudios se desarrollaron en ecosistemas tropicales como en el caso de Yucatán (Figura 2), donde se exploraron 52 especies para identificar su potencial dendrocronológico (Roig et al., 2005). Esta información es importante para analizar la producción de biomasa, aspectos ecológicos y analizar la influencia de los cambios inducidos por el hombre en el ambiente. En contraste, Sinaloa, Tabasco, Campeche, Quintana Roo, Aguascalientes, Nayarit y Guerrero son estados en los que no se han generado publicaciones (Figura 2), aun cuando se cuenta con algunas series dendrocronológicas, lo que indica la urgencia de desarrollar investigación con especies locales.

Especies estudiadas en investigaciones dendrocronológicas

Las publicaciones sobre dendrocronología en México han involucrado el análisis de 76 especies arbóreas. La Figura 3 indica que las especies más exploradas son: *Pinus hartwegii* Lindl. (47 publicaciones), *Pseudotsuga*

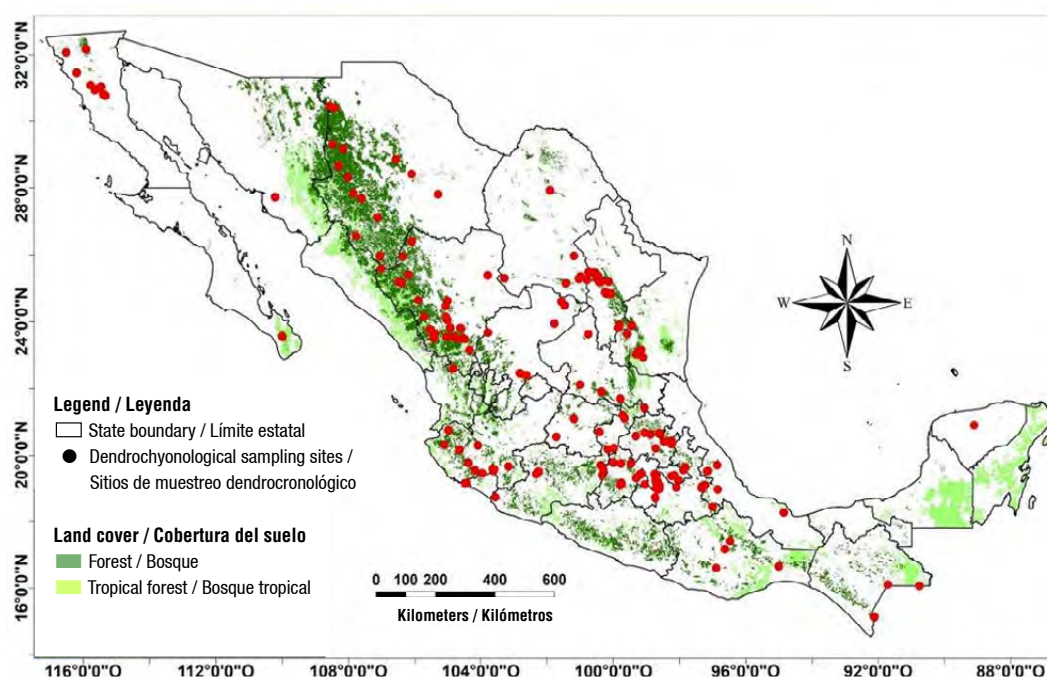


Figure 2. Distribution of sampling sites for dendrochronological research publications in Mexico.

Figura 2. Distribución de los sitios de muestreo para la publicación de investigaciones dendrocronológicas en México.

include other coniferous and broadleaf species found in both temperate and tropical environments (Marcelo-Peña et al., 2020; Quesada-Román et al., 2022; Roig et al., 2005).

Dendrochronological studies in Mexico have analyzed various species, often integrating data from multiple species to strengthen the common climatic signal in reconstructions. This approach enhances the robustness of climatic interpretations, particularly in studies addressing broad spatiotemporal scales, such as the North American and Mexican Drought Atlas (Cook et al., 2016; Stahle et al., 2016). Some studies have explored the dendrochronological potential of species like *Pinus hartwegii*, *Pinus leiophylla*, *Pinus ayacahuite*, *Abies religiosa*, and *Juniperus monticola* Martínez. These studies have investigated the impact and frequency of disturbances, such as debris flows, lahars, and pollution (De la Peña et al., 2024; Franco Ramos et al., 2018; Villanueva-Díaz et al., 2016).

Collaborations between authors and institutions

The collaboration network analysis, using the VOS clustering algorithm from the VOSviewer 1.6.20 software, highlighted the interactions between authors and institutions and their influence in the field of research. From this analysis, only the top 25 authors (Figure 4) and 20 institutions (Figure 5) publishing articles focused on dendrochronology were selected. Figure 4 shows that the authors' network consists of five groups, represented by J. Villanueva-

menziesii (Mirb.) Franco (33 publicaciones), *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. y Cham. (26 publicaciones), *Taxodium mucronatum* Ten. (18 publicaciones), *Pinus cembroides* Zucc. (15 publicaciones) y *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. (15 publicaciones). El resto de las especies han sido estudiadas en menos de 13 publicaciones. Por otra parte, siete publicaciones no especifican la especie estudiada, mientras que 30 especies se utilizaron cada una en una sola publicación (Figura 3). De las 229 investigaciones realizadas en México, 160 (70 % de los artículos) involucraron cinco especies (en su mayoría coníferas); esto demuestra la necesidad de incluir otras coníferas o latifoliadas distribuidas tanto en ambientes templados como en tropicales (Marcelo-Peña et al., 2020; Quesada-Román et al., 2022; Roig et al., 2005).

En varias publicaciones, los autores desarrollaron series dendrocronológicas integradas con más de una especie, corroborando su respuesta climática común, situación que robustece la señal climática en dichas reconstrucciones. Algunas de las publicaciones abordan escalas espacio-temporales amplias al integrar información de varias especies, como es el caso del Atlas de Sequías de Norteamérica y México (Cook et al., 2016; Stahle et al., 2016). Otros estudios han explorado el potencial dendrocronológico de *P. hartwegii*, *P. leiophylla*, *P. ayacahuite*, *A. religiosa* y *Juniperus monticola* Martínez para analizar el impacto y frecuencia de disturbios como flujos de detritos, lahares y contaminación (De la Peña et al., 2024; Franco Ramos et al., 2018; Villanueva-Díaz et al., 2016).

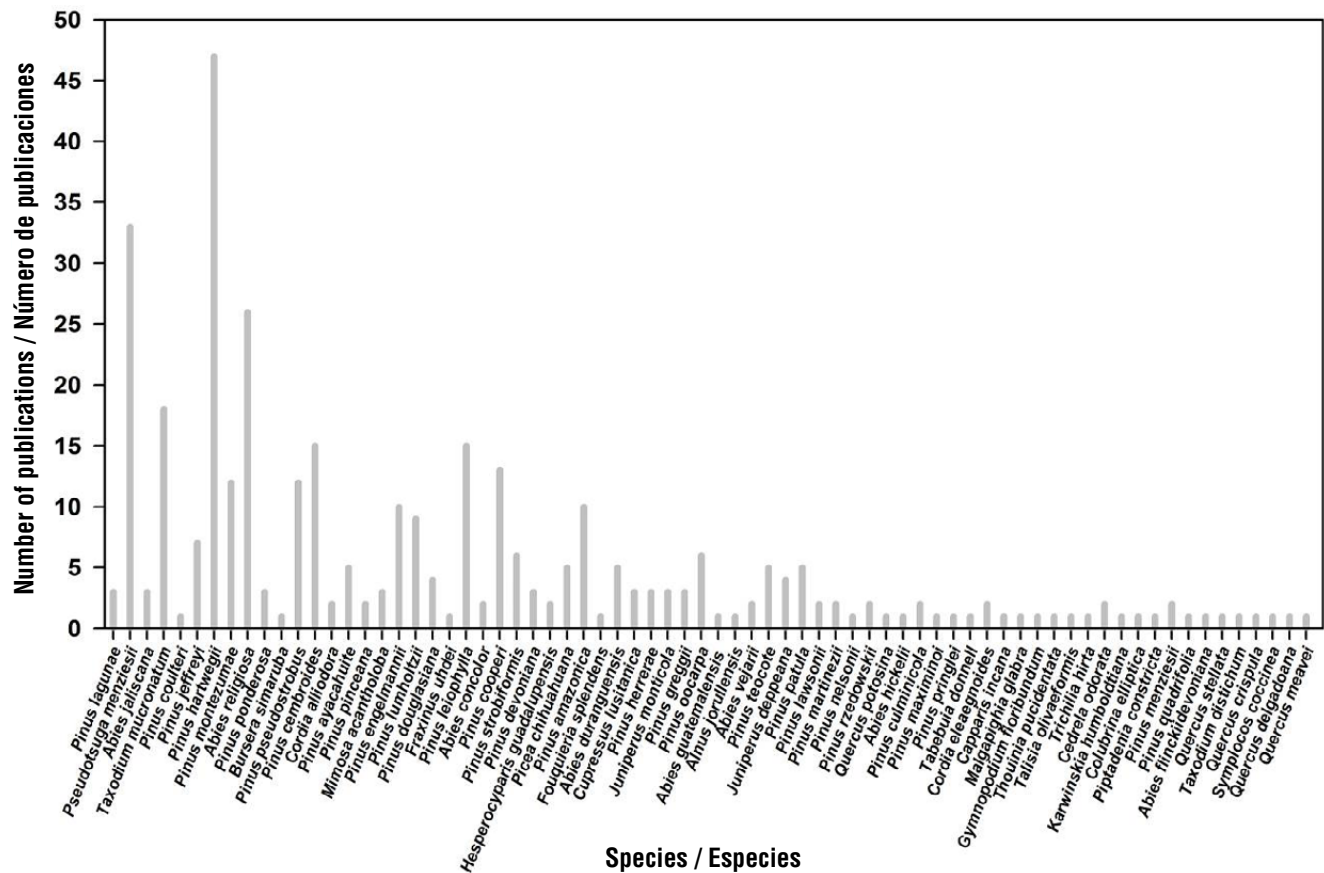


Figure 3. Number of dendrochronological studies conducted in Mexico, grouped by species analyzed (2000–2023).

Figura 3. Número de estudios dendrocronológicos realizados en México, agrupados según la especie analizada en el período 2000-2023.

Díaz (group 1, blue), J. Cerano-Paredes (group 2, red), A. Gómez-Guerrero (group 3, yellow), D. Stahle (group 4, green), and O. Franco-Ramos (group 5, purple). The key researcher among these five groups is J. Villanueva-Díaz, who has published 87 articles on dendrochronology in Mexico. Two other notable researchers, based on the number of publications, are J. Cerano-Paredes (40 publications) and M. Pompa-García (29 publications). The institutional affiliations of these three authors are located in northern Mexico (Durango), which explains why most dendrochronological studies are conducted in the central-northern region of Mexico (Figure 2). This finding agrees with a similar study conducted by Acosta-Hernández et al. (2017). However, it is important to highlight the influence of foreign researchers (Figure 4, group 4, green), who emphasize the significance of dendroclimatic studies in analyzing the historical variability of precipitation in Mexico and the southwestern United States. They also focus on understanding how this variability is affected by large-scale atmospheric circulation modes and the response functions of various species. For example, Therrell et al. (2002) found that tree growth rings in northern Mexico are more sensitive to winter-to-early-summer seasonal

Colaboración entre autores e instituciones

El análisis de redes de colaboración, mediante el algoritmo de agrupación VOS del programa VOSviewer 1.6.20, reflejó la interacción entre autores e instituciones y su influencia en el área de investigación. De este análisis, solo se seleccionaron 25 autores (Figura 4) y 20 instituciones (Figura 5) principales que publicaron artículos enfocados en dendrocronología. La Figura 4 muestra que la red de autores está conformada por cinco grupos representados por J. Villanueva-Díaz (grupo 1, color azul), J. Cerano-Paredes (grupo 2, color rojo), A. Gómez-Guerrero (grupo 3, color amarillo), D. Stahle (grupo 4, color verde) y O. Franco-Ramos (grupo 5, color morado). El investigador referente para los cinco grupos mencionados es J. Villanueva-Díaz, quien ha publicado 87 artículos relacionados con dendrocronología en México; otros dos investigadores destacados por el número de publicaciones son J. Cerano-Paredes (40 publicaciones) y M. Pompa-García (29 publicaciones). La institución de adscripción de los tres autores se ubica en el norte de México (Durango), es por ello que la mayoría de los estudios dendrocronológicos se hacen en la parte centro-



Figura 4. Mapa de visualización de redes de colaboración entre 25 autores principales de acuerdo con el número de publicaciones. El tamaño de los nodos (círculos) y el grosor de las líneas es proporcional al número de publicaciones de los autores y colaboraciones entre autores.



Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente | Vol. XXXI, 2025.

precipitation. In contrast, in southern Mexico, they are more sensitive to seasonal rainfall from April to June. This information agrees with studies by Cleaveland et al. (2003) and Díaz et al. (2001).

The collaboration network analysis among the top 20 institutions highlights the degree of communication and collaboration between them, grouped into five groups (yellow, green, red, blue, and purple), as shown in Figure 5. These groups are represented by INIFAP, UNAM, UJED, the University of Arkansas, Colegio de Postgraduados, and the University of California. INIFAP shows strong connections, maintaining significant scientific collaboration with other groups, including two groups of foreign institutions (Figure 5). INIFAP has contributed to 104 articles, while UNAM has contributed to 75 articles; these two institutions have been the most prominent contributors to the development of dendrochronological research in Mexico and maintain strong scientific collaborations. On the other hand, group 3 (Figure 5, red) appears isolated from the other groups, indicating minimal connections between them. Institutions in southern Mexico are not among the top 20, partly because dendrochronological studies in tropical environments are scarce (Figure 2) (Roig et al., 2005). This contrasts with the dendrochronological research conducted in tropical ecosystems (Quesada-Román et al., 2022; Tomazello Fo et al., 2009).

Keyword Analysis

The keyword analysis is presented in Figure 6, which shows groups differentiated by colors (green, purple, blue, yellow, and red). A shorter distance between nodes indicates a stronger relationship between keywords. For example, there is a close association between the terms “dendrochronology” with “El Niño-Southern Oscillation (ENSO)”, “climate” and “climate variation”. The most frequent keywords are represented in larger nodes (circles), for example; “dendrochronology”, “ENSO”, “tree rings” and “drought”. Group 1 (red) is made up of seven keywords; “climate change”, “dendroclimatology”, “dendroecology”, “drought stress”, “early wood”, “tree rings” and “late wood”. Group 2 (green) is made up of five words; “dendrochronology”, “climate”, “fire history”, “fire regime” and “Pacific Decadal Oscillation”. Group 3 (blue) is made up of five words; “ENSO”, “drought”, “climate reconstruction”, “precipitation reconstruction”, and “tree-ring chronology”. Groups 4 and 5 are made up of four words each. It is important to note, that in four of the five groups, the climatic phenomena are highlighted (example; drought, stress, climate change, climate variability, climate reconstruction, precipitation, temperature), while, in the remaining group, the use and analysis of tree rings to evaluate geomorphological

norte de México (Figura 2). Este resultado concuerda con otro estudio de esta índole realizado por Acosta-Hernández et al. (2017). No obstante, es importante destacar la influencia de investigadores extranjeros (Figura 4, grupo 4, color verde), quienes enfatizan la importancia de los estudios dendroclimáticos para analizar la variabilidad histórica de la precipitación en México y suroeste de EUA, saber cómo esta es afectada por los modos circulatorios atmosféricos a gran escala y conocer la función de respuesta de las especies. Por ejemplo, Therrell et al. (2002) encontraron que los anillos de crecimiento de los árboles del norte de México son más sensibles a la precipitación estacional de invierno a principios de verano, mientras que en el sur, son más sensibles a la precipitación estacional de abril a junio; tal información coincide con los estudios de Cleaveland et al. (2003) y Díaz et al. (2001).

El análisis de redes de colaboración entre 20 de las principales instituciones refleja el grado de comunicación y colaboración entre ellas, las cuales se integran en cinco grupos (color amarillo, verde, rojo, azul y morado) mostrados en la Figura 5. Estos grupos están representados por el INIFAP, UNAM, UJED, Universidad de Arkansas, Colegio de Postgraduados y Universidad de California. El INIFAP muestra fuertes conexiones, por tanto, mantiene importante colaboración científica con otros grupos e incluso con dos grupos de instituciones extranjeras (Figura 5). El INIFAP ha participado en 104 artículos y la UNAM en 75 artículos; estas dos instituciones son las que más han contribuido al desarrollo de la investigación dendrocronológica en México y mantienen fuerte colaboración científica. Por otro lado, el grupo 3 (Figura 5, color rojo) se muestra apartado de los demás grupos, lo que indica que tiene poca conexión entre ellos. Las instituciones del sur de México no figuran entre las 20 principales; esto se debe en parte a que los estudios dendrocronológicos en ambientes tropicales son escasos (Figura 2) (Roig et al., 2005), situación que contrasta con la investigación dendrocronológica realizada por países con ecosistemas tropicales (Quesada-Román et al., 2022; Tomazello Fo et al., 2009).

Análisis de palabras clave

El análisis de las palabras clave se muestra en la Figura 6, donde se observan grupos diferenciados por colores (verde, morado, azul, amarillo y rojo). Una menor distancia entre nodos implica mayor relación entre las palabras clave; por ejemplo, existe una relación estrecha entre las palabras ‘dendrocronología’ con ‘El Niño-Oscilación del Sur (ENOS)’, ‘clima’ y ‘variación climática’. Las palabras clave más frecuentes están representadas en nodos (círculos) más grandes, por ejemplo: ‘dendrocronología’, ‘ENOS’, ‘anillos de árboles’ y ‘sequía’. El grupo 1 (rojo) está integrado por siete palabras clave: ‘cambio climático’, ‘dendroclimatología’, ‘dendroecología’, ‘estrés por

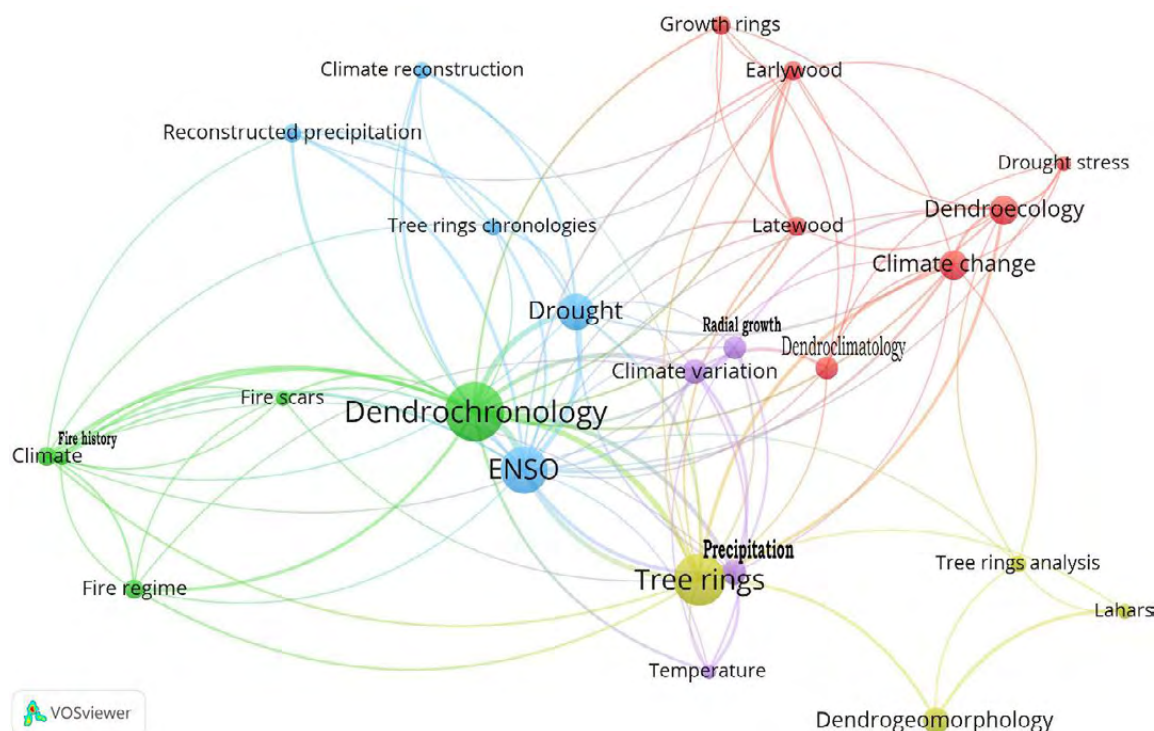


Figure 6. Visualization map of co-occurrence of the 25 main keywords used by the authors. The colors represent different groups and the lines are the connection between keywords.

Figura 6. Mapa de visualización de coocurrencia de las 25 palabras clave usadas principalmente por los autores. Los colores representan agrupación diferente y las líneas la conexión entre palabras clave.

processes are highlighted. We also identified that the keywords and their frequencies have changed over time, the keywords “dendrochronology”, “ENSO”, “tree rings”, “drought” and “dendroecology” are the five most frequent keywords during 2000–2023 (Figure 6), which demonstrates concern for climate issues, the evaluation of droughts and their effects of global circulation phenomena on tree rings. This coincides with other studies where it has been reported that dendroclimatic studies have been the most addressed in Mexico (Acosta-Hernández et al., 2017; Sánchez-Calderón et al., 2022). In recent years (2016–2023), the keyword ‘dendrogeomorphology’ has gained prominence, indicating the growing relevance of studies under this approach despite its recent implementation in Mexico. The first study of this type was published 15 years ago, identifying and describing alterations in tree growth rings caused by lahar events (Bollschweiler et al., 2010). However, it was not until 2016 that dendrogeomorphological studies increased (Figure 8), focusing on evaluating and analyzing various types of mass movement processes (Figueroa-García et al., 2021; Franco-Ramos et al., 2019). Regarding less-cited keywords, it seems that some applications of dendrochronology in Mexico—such as dendrovolcanology, dendroarchaeology, and dendrochemistry—have been underexplored (Cui et al., 2022).

sequía’, ‘madera temprana’, ‘anillos de crecimiento’ y ‘madera tardía’. El grupo 2 (verde) está integrado por cinco palabras: ‘dendrocronología’, ‘clima’, ‘historia de incendios’, ‘régimen de incendios’ y ‘Oscilación Decadal del Pacífico’. El grupo 3 (azul) está integrado por cinco palabras: ‘ENOS’, ‘sequía’, ‘reconstrucción climática’, ‘reconstrucción de la precipitación’ y ‘cronología de anillos de árboles’. Los grupos 4 y 5 están integrados por cuatro palabras clave. Es importante mencionar que en cuatro de los cinco grupos resaltan los fenómenos climáticos (v. g., sequía, estrés, cambio climático, variabilidad climática, reconstrucción climática, precipitación y temperatura); mientras que, en el grupo restante, resalta el uso y análisis de los anillos de los árboles para evaluar procesos geomorfológicos. También se identificó que las palabras clave y sus frecuencias han cambiado con el tiempo; las palabras clave ‘dendrocronología’, ‘ENOS’, ‘anillos de árboles’, ‘sequía’ y ‘dendroecología’ fueron las más frecuentes durante 2000–2023 (Figura 6), lo que demuestra preocupación por los temas climáticos, la evaluación de las sequías y efectos de fenómenos de circulación global en los anillos de crecimiento de árboles. Esto coincide con otros estudios donde se ha reportado que los estudios dendroclimáticos han sido los más abordados en México (Acosta-Hernández et al., 2017; Sánchez-Calderón et al., 2022). Asimismo, se identificó que la palabra clave dendrogeomorfología ha sido frecuente en los últimos años (2016 a 2023), lo cual indica que los

Subfields Studied in Dendrochronology

The publications were classified according to the studied subfields of dendrochronology. Figures 7 and 8 show the nine main subfields/thematic groups. Most of the studies have been developed with a dendroclimatic approach (119 publications, 52 %); in this aspect, the first article was published by Díaz et al. (2001), who reconstructed the precipitation from September to July in Baja California Sur for the period 1862-1996. The years 2022 and 2023 had the highest number of publications on this topic (10 publications per year), followed by 2018 and 2015 (nine publications per year). These focused mainly on precipitation reconstructions, drought identification, influence of climatic variables on forest growth, and response function analysis (Carlón-Allende et al., 2021; Villanueva-Díaz et al., 2007), as well as the development of the Drought Atlas for Mexico, which was based on a network of 252 tree-ring chronologies (Stahle et al., 2016). Dendroecological studies have also had significant contribution (29 publications, 13 %; Figures 7 and 8), mainly from 2016, where the implications of climate change on the ecological functions of trees, spatio-temporal identification of past forest disturbances (Pompa-García et al., 2023) and the dynamics of the long-term trend of forests (Correa et al., 2021) are addressed. Another subfield with

estudios bajo este enfoque han ganado relevancia a pesar de su reciente implementación en México. El primer estudio de este tipo fue publicado hace 15 años, donde se identificaron y describieron alteraciones en los anillos de crecimiento de los árboles inducidas por eventos de lahar (Bollschweiler et al., 2010), pero fue hasta 2016 que los estudios dendrogeomorfológicos incrementaron (Figura 8) y se enfocaron en la evaluación y análisis de varios tipos de procesos de remoción en masa (Figueroa-García et al., 2021; Franco-Ramos et al., 2019). Respecto a las palabras clave poco citadas, podría ser que, en México, algunas de las aplicaciones de la dendrocronología como la dendrovulcanología, la dendroarqueología y la dendroquímica han sido poco exploradas (Cui et al., 2022).

Subcampos estudiados de la dendrocronología

Las publicaciones se clasificaron de acuerdo con los subcampos estudiados de la dendrocronología. Las Figuras 7 y 8 muestran los nueve subcampos/grupos temáticos principales. La mayoría de los estudios se han desarrollado con un enfoque dendroclimático (119 publicaciones, 52 %); en este aspecto, el primer artículo fue publicado por Díaz et al. (2001), quienes reconstruyeron la precipitación de septiembre a julio en Baja California Sur para el período 1862-1996. Los años 2022 y 2023 tuvieron el mayor número de publicaciones en este tema (10 publicaciones por año), seguidos por

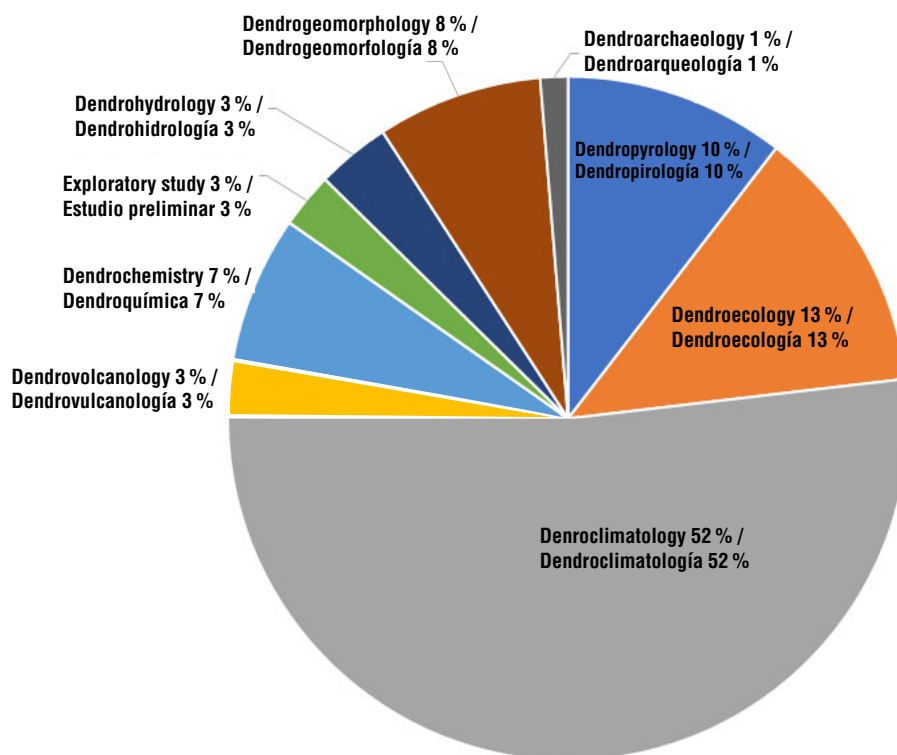


Figure 7. Proportion of publications by dendrochronological subfield in Mexico from 2000-2023.

Figura 7. Proporción de publicaciones por subcampo dendrocronológico en México en el período 2000-2023.

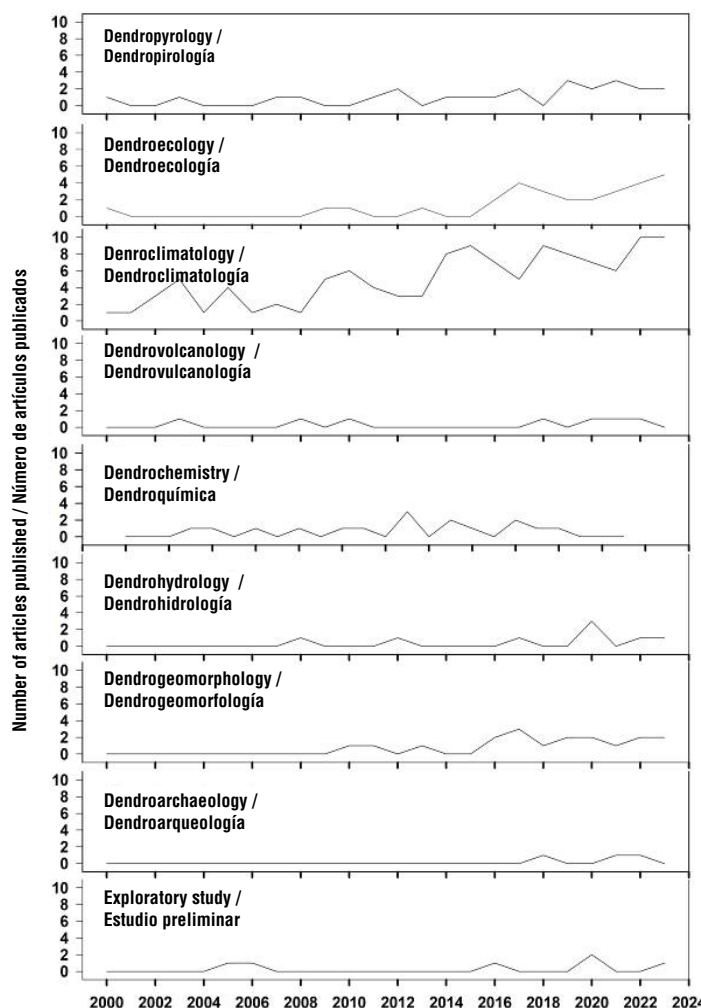


Figure 8. Number of studies in the subfields of dendrochronology by year of publication.

Figura 8. Número de estudios en los subcampos de la dendrocronología por año de publicación.

relevant development in Mexico is dendropyrology with 24 publications representing 10 % of the total (Figures 7 and 8), in which spatio-temporal reconstruction of fire regimes and frequency (Zúñiga-Vásquez et al., 2023) and climatic influence on fire occurrence (Yocom et al., 2014) have been performed, being this development more constant from 2019 (Figure 8).

Regarding studies with a dendrogeomorphological approach, 18 publications (8 %) have been published, particularly since 2016 (Figure 8). These studies have focused on the evaluation of mass removal processes such as lahars, debris flows, soil erosion and rotational movements (Figueroa-García et al., 2021; Franco-Ramos et al., 2023; Šilhán et al., 2024; Stoffel et al., 2011). Some studies were also conducted in less explored fields such as dendrochemistry (16 publications), dendrohydrology (eight publications), dendrovulcanology (six publications), dendroarchaeology (three publications) and exploratory studies (six publications, Figures 7 and 8). These subfields of dendrochronology could

2018 y 2015 (nueve publicaciones por año). Estas se enfocaron principalmente en las reconstrucciones de precipitación, identificación de sequía, influencia de variables climáticas en el crecimiento de los bosques y análisis de función de respuesta (Carlón-Allende et al., 2021; Villanueva-Díaz et al., 2007), así como el desarrollo del Atlas de Sequía para México, el cual se fundamentó en una red de 252 cronologías de anillos de árboles (Stahle et al., 2016). Los estudios dendroecológicos también han tenido gran contribución (29 publicaciones, 13 %; Figuras 7 y 8) principalmente a partir del 2016, donde se abordan las implicaciones del cambio climático en las funciones ecológicas de los árboles, identificación espacio-temporal de perturbaciones forestales pasadas (Pompa-García et al., 2023) y la dinámica de la tendencia a largo plazo de los bosques (Correa et al., 2021). Otro subcampo con desarrollo relevante en México es la dendropyrología con 24 publicaciones que representan 10 % del total (Figuras 7 y 8), en los cuales se ha realizado reconstrucción espacio-temporal de regímenes y frecuencia de incendios (Zúñiga-Vásquez et al., 2023) y la influencia climática en

be considered windows of opportunity to assess the natural and anthropogenic impact of land use changes in recent centuries. In addition, there is a lack of exploratory studies that represent an extensive field for identifying the dendrochronological potential of little studied genera such as *Quercus* or broadleaf species from tropical environments.

Most influential journals in dendrochronology research in Mexico

Figure 9 shows the 103 national and international journals, where the 229 articles studying dendrochronology in Mexico were published. According to Table 1, 30 % of the articles are concentrated in six journals: 7 % were published in the journal *Forests* (15 articles), 6 % in *Madera y Bosques* (14 articles), 5 % in *Trees-Structure and Function* (11 articles), 4 % in *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* (10 articles), 4 % in *Dendrochronologia* (nine articles) and 4 % in *Tree-Ring Research* (nine articles), which shows that foreign journals are preferred by researchers. Of the total number of articles, 53 % were published in 20 journals (Table 1), while 47 % were published in the rest (83 journals, Figure 9).

Mexican journals published 26 % (57 articles) of dendrochronological research, with notable contributions from *Madera y Bosques* (14 articles), *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* (10 articles), *Investigaciones Geográficas* (seven articles) and *Agrociencia* (five articles). These have been preferred by researchers for more than a decade, as reported by Acosta-Hernández et al. (2017) eight years ago in a review study. Most articles published in leading journals (Table 1) have a dendroclimatic focus (Carlón Allende et al., 2018; Herrera-Soto et al., 2018; Villanueva-Díaz et al., 2020).

Conclusions

This research highlights the trends in dendrochronology in Mexico during the period 2000–2023. Dendrochronological research has increased since 2010, with educational institutions from the central-northern region of the country standing out in publishing articles. Few studies involving tropical and broadleaf species were identified, despite their dendrochronological potential, and there are seven states where no research has been conducted on this topic. Finally, there are subfields within dendrochronology – such as dendrogeomorphology, dendrochemistry, and dendrovolcanology – that, while not having a large number of publications, have grown in recent years. The information generated underscores the importance of dendrochronology in Mexico and identifies opportunities for the development of future research in this field.

la ocurrencia de incendios (Yocom et al., 2014), siendo este desarrollo más constante a partir del 2019 (Figura 8).

Por lo que respecta a estudios con enfoque dendrogeomorfológico se tienen 18 publicaciones (8 %), particularmente a partir del 2016 (Figura 8). Estos estudios se han centrado en la evaluación de procesos de remoción en masa como lahares, flujos de detritos, evaluación de erosión de suelos y movimientos rotacionales (Figueroa-García et al., 2021; Franco-Ramos et al., 2023; Šilhán et al., 2024; Stoffel et al., 2011). También se realizaron algunos estudios en campos menos explorados como dendroquímica (16 publicaciones), dendrohidrología (ocho publicaciones), dendrovulcanología (seis publicaciones), dendroarqueología (tres publicaciones) y estudios exploratorios (seis publicaciones, Figuras 7 y 8). Estos subcampos de la dendrocronología podrían considerarse ventanas de oportunidad para evaluar el impacto natural y antrópico de los cambios de uso del suelo en los últimos siglos. Además, destaca la falta de estudios exploratorios que representan un campo extenso para la identificación del potencial dendrocronológico de géneros poco estudiados como *Quercus* o especies latifoliadas de ambientes tropicales.

Revistas más influyentes en investigación dendrocronológica en México

La Figura 9 muestra las 103 revistas, nacionales e internacionales, donde se publicaron los 229 artículos de estudio de la dendrocronología en México. De acuerdo con el Cuadro 1, 30 % de los artículos se concentran en seis revistas: 7 % se publicó en la revista *Forests* (15 artículos), 6 % en *Madera y Bosques* (14 artículos), 5 % en *Trees-Structure and Function* (11 artículos), 4 % en *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* (10 artículos), 4 % en *Dendrochronologia* (nueve artículos) y 4 % en *Tree-Ring Research* (nueve artículos), lo que demuestra que las revistas extranjeras son las preferidas por los investigadores. Del total de artículos, 53 % fueron publicados en 20 revistas (Cuadro 1), mientras que 47 % fueron publicados en el resto (83 revistas, Figura 9).

Las revistas mexicanas publicaron 26 % (57 artículos) de la investigación dendrocronológica, entre las cuales destacan *Madera y Bosques* (14 artículos), *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* (10 artículos), *Investigaciones Geográficas* (siete artículos) y *Agrociencia* (cinco artículos). Estas han sido las preferidas por los investigadores desde hace más de una década, como lo reportaron Acosta-Hernández et al. (2017) hace ocho años en un estudio de revisión. La mayoría de los artículos publicados en las principales revistas (Cuadro 1) tienen enfoque dendroclimático (Carlón Allende et al., 2018; Herrera-Soto et al., 2018; Villanueva-Díaz et al., 2020).

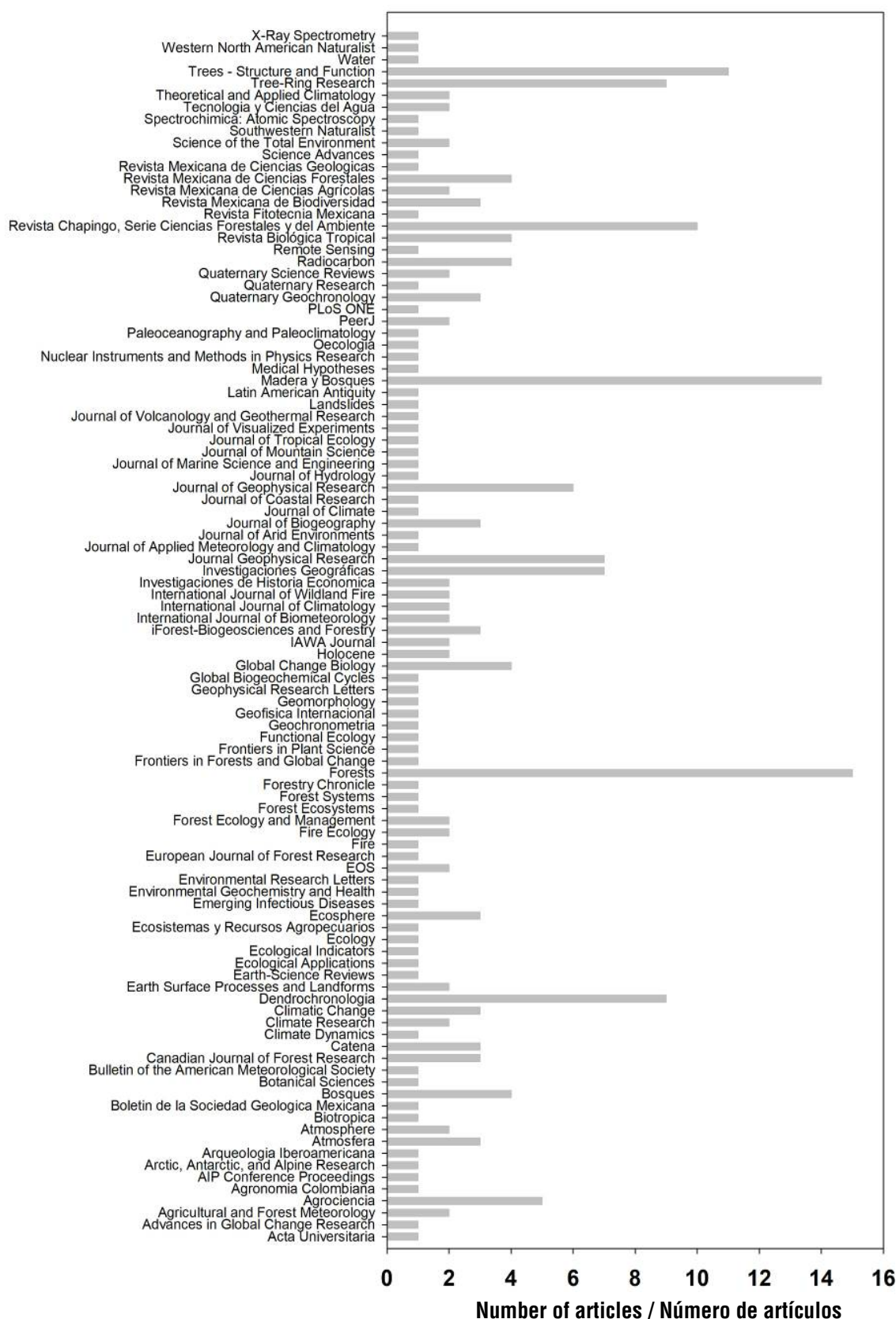


Figure 9. Number of articles on dendrochronology in Mexico, grouped according to the journal of publication in the period 2000-2023.

Figura 9. Número de artículos sobre dendrocronología en México, agrupados de acuerdo con la revista donde fueron publicados en el período 2000-2023.

Table 1. Twenty national and international journals with the highest number of publications on dendrochronology in Mexico. These journals published 53 % of the studies in 2000-2023.

Cuadro 1. Veinte revistas nacionales e internacionales con mayor número de publicaciones sobre dendrocronología en México. Estas revistas publicaron 53 % de los estudios en período 2000-2023.

Number / Número	Journal / Revista	Artiles published / Artículos publicados
1	Forests	15
2	Madera y Bosques	14
3	Trees - Structure and Function	11
4	Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente	10
5	Dendrochronologia	9
6	Tree-Ring Research	9
7	Investigaciones Geográficas	7
8	Journal of Geophysical Research	7
9	Agrociencia	5
10	Revista Mexicana de Ciencias Forestales	4
11	Bosques	4
12	Radiocarbon	4
13	Revista de Biología Tropical	4
14	Atmósfera	3
15	Canadian Journal of Forest Research	3
16	CATENA	3
17	Climatic Change	3
18	Global Change Biology	3
19	iForest-Biogeosciences and Forestry	3
20	Journal of Biogeography	3

Acknowledgments

The authors thank the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) for support to J. L. Macías through project IN112720 and funding support from the Instituto de Geofísica to T. Carlón. Also thanks to Wendy Paola Galindo and Alberto González for analyzing the data on the locations of dendrochronological studies, and to Paula Turkon for her support in reviewing the English version of the manuscript.

Conflict of interest

The authors hereby state there are no known financial conflicts of interest or personal relationships that could have influenced the research presented in this manuscript.

Conclusiones

Esta investigación muestra las tendencias de la dendrocronología en el período 2000-2023 en México. La investigación dendrocronológica incrementó a partir de 2010 y las instituciones educativas de la zona centro-norte del país son las más destacadas en la publicación de artículos. Se identificaron pocos estudios con especies tropicales y latifoliadas, a pesar de tener potencial dendrocronológico, y siete estados donde no se ha desarrollado investigación al respecto. Finalmente, existen subcampos de la dendrocronología (dendrogeomorfología, dendroquímica y dendrovulcanología) que, a pesar de no contar con gran número de publicaciones, han incrementado en los últimos años. La información generada destaca la importancia de la dendrocronología en México y ofrece áreas de oportunidad para el desarrollo de futuros trabajos en esta ciencia.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el apoyo a J. L. Macías mediante el proyecto IN112720 y el apoyo financiero del Instituto de Geofísica a T. Carlón. A Wendy Paola Galindo y Alberto González por

End of English version

References / Referencias

- Acosta-Hernández, A. C., Pompa-García, M., & Camarero, J. J. (2017). An updated review of dendrochronological investigations in Mexico, a megadiverse country with a high potential for tree-ring sciences. *Forests*, 8(5), 160. <https://doi.org/10.3390/f8050160>
- Astudillo-Sánchez, C. C., Villanueva-Díaz, J., Endara-Agramont, A. R., Nava-Bernal, G. E., & Gómez-Albores, M. (2017). Influencia climática en el reclutamiento de *Pinus hartwegii* Lindl. del ecotono bosque-pastizal alpino en Monte Tláloc, México. *Agrociencia*, 51(1), 105–118. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30249773001>
- Babst, F., Poulter, B., Bodesheim, P., Mahecha, M. D., & Frank, D. C. (2017). Improved tree-ring archives will support earth-system science. *Science Advances*, 1(5), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41559-016-0008>
- Beramendi-Orosco, L., González-Hernández, G., Martínez-Reyes, A., Morton-Bermea, O., Santos-Arévalo, F. J., Gómez-Martínez, I., & Villanueva-Díaz, J. (2018). Changes in CO₂ emission sources in Mexico city metropolitan area deduced from radiocarbon concentrations in tree rings. *Radiocarbon*, 60(1), 21–34. <https://doi.org/10.1017/RDC.2017.100>
- Bollschweiler, M., & Stoffel, M. (2010). Tree rings and debris flows: Recent developments, future directions. *Progress in Physical Geography*, 34(5), 625–645. <https://doi.org/10.1177/0309133310370283>
- Bovi, R. C., Romanelli, J. P., Caneppele, B. F., & Cooper, M. (2022). Global trends in dendrogeomorphology: A bibliometric assessment of research outputs. *CATENA*, 210, 105921. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2021.105921>
- Carlón-Allende, T., Macías, J. L., Mendoza, M. E., & Villanueva-Díaz, J. (2022). Influence of volcanic ash deposits on the radial growth of trees in Central Mexico: the case of Parícutin volcano. *European Journal of Forest Research*, 8701. <https://doi.org/10.1007/s10342-022-01463-7>
- Carlón-Allende, T., Macías, J. L., Mendoza, M. E., & Villanueva Díaz, J. (2020). Evidence of volcanic activity in the growth rings of trees at the Tacaná volcano, Mexico–Guatemala border. *Canadian Journal of Forest Research*, 50(1), 65–72. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2019-0214>
- Carlón Allende, T., Mendoza, M. E., Villanueva Díaz, J., & Li, Y. (2018). Climatic response of *Pinus cembroides* Zucc. radial growth in Sierra del Cubo, Guanajuato, Mexico. *Trees - Structure and Function*, 32(5), 1387–1399. <https://doi.org/10.1007/s00468-018-1720-1>
- Carlón-Allende, T., Villanueva Díaz, J., Soto Castro, G., Mendoza, M. E., & Macías, J. L. (2021). Tree rings as indicators of climatic variation in the Trans-Mexican Volcanic Belt, central Mexico. *Ecological Indicators*, 120, 106920. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106920>
- Cerano-Paredes, J., Iniguez, J. M., Villanueva-Díaz, J., Vázquez-Selem, L., Cervantes-Martínez, R., Esquivel-Arriaga, G., Franco-Ramos, O., & Rodríguez-Trejo, D. A. (2021). Effects of climate on historical fire regimes (1451-2013) in *Pinus hartwegii* forests of Cofre de Perote National Park, Veracruz, Mexico. *Dendrochronologia*, 65, 125784. <https://doi.org/10.1016/j.dendro.2020.125784>
- el análisis de los datos de la ubicación de los estudios dendrocronológicos, y a Paula Turkon por su apoyo en la revisión de la versión en inglés del manuscrito.
- ## Conflicto de intereses
- 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.
- ## Fin de la versión en español
- Cleaveland, M. K., Stahle, D. W., Therrell, M. D., Villanueva-Díaz, J., & Burns, B. T. (2003). Tree-ring reconstructed winter precipitation and tropical teleconnections in Durango, Mexico. *Climatic Change*, 59, 369–388. <https://doi.org/10.1023/A:1024835630188>
- Cook, B. I., Cook, E. R., Smerdon, J. E., Seager, R., Williams, A. P., Coats, S., Stahle, D. W., & Díaz, J. V. (2016). North American megadroughts in the common era: Reconstructions and simulations. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change*, 7(3), 411–432. <https://doi.org/10.1002/wcc.394>
- Correa-Díaz, A., Romero-Sánchez, M. E., & Villanueva-Díaz, J. (2021). The greening effect characterized by the Normalized Difference Vegetation Index was not coupled with phenological trends and tree growth rates in eight protected mountains of central Mexico. *Forest Ecology and Management*, 496, 119402. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119402>
- Cui, Y., Ouyang, S., Zhao, Y., Tie, L., Shao, C., & Duan, H. (2022). Plant responses to high temperature and drought: A bibliometrics analysis. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1052660>
- De la Peña, K. A., Mendoza, M., Carlón-Allende, T., Macías, J. L., Villanueva-Díaz, J. (2024). Dendrogeomorphological analysis of a debris flow in the Monarch Butterfly Biosphere Reserve, central Mexico. *Natural Hazards*, 121, 1575–1598. <https://doi.org/10.1007/s11069-024-06873-x>
- Díaz, S., Touchan, R., Swetnam, T., & Cleaveland, M. (2001). A tree-ring reconstruction of past precipitation for Baja California Sur, Mexico. *International Journal of Climatology*, 21(8), 1007–1019. <https://doi.org/10.1002/joc.664>
- Douglass, A. E. (1914). A method of estimating rainfall by the growth of trees. *Bulletin of the American Geographical Society*, 46(5). <https://doi.org/10.2307/201814>
- Effendi, D. N., Irwandani, Anggraini, W., Jatmiko, A., Rahmayanti, H., Ichsan, I. Z., & Rahman, M. M. (2021). Bibliometric analysis of scientific literacy using VOS viewer: Analysis of science education. *Journal of Physics: Conference Series*, 1796(1), 012096. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1796/1/012096>
- Figueroa-García, J. E., Franco-Ramos, O., Bodoque, J. M., Ballesteros-Cánovas, J. A., & Vázquez-Selem, L. (2021). Long-term lahar reconstruction in Jamapa Gorge, Pico de Orizaba (Mexico) based on botanical evidence and numerical modelling. *Landslides*, 18(10), 3381–3392. <https://doi.org/10.1007/s10346-021-01716-3>

- Franco-Ramos, O., Ballesteros-Cánovas, J. A., Terrazas, T., Vázquez-Selem, L., Figueroa-García, J. E., & Stoffel, M. (2023). Combining exposed tree roots and UAV imagery to quantify land denudation in central Mexico. *Science of the Total Environment*, 880, 163265. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163265>
- Franco-Ramos, O., Stoffel, M., & Ballesteros-Cánovas, J. A. (2019). Reconstruction of debris-flow activity in a temperate mountain forest catchment of central Mexico. *Journal of Mountain Science*, 16(1), 2096–2109. <https://doi.org/10.1007/s11629-019-5496-6>
- Franco Ramos, O., Vázquez Selem, L., Stoffel, M., & Villanueva Díaz, J. (2018). Potencial dendrogeomorfológico de coníferas en volcanes del centro de México. *Bosque (Valdivia)*, 39(2), 191–204. <https://doi.org/10.4067/s0717-92002018000200191>
- Fritts, H. C. (1976). *Tree rings and climate*. Academic Press Inc.
- González-Tagle, M. A., Cerano-Paredes, J., Himmelsbach, W., Alanís-Rodríguez, E., & Colazo-Ayala, Á. A. (2023). Fire records based on dendrochronological techniques for a coniferous forest in the southeastern region of Jalisco, Mexico. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 29(1), 35–50. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2022.03.018>
- Herrera-Soto, G., González-Cásares, M., Pompa-García, M., Camarero, J. J., & Solís-Moreno, R. (2018). Growth of *Pinus cembroides* Zucc. in response to hydroclimatic variability in four sites forming the species latitudinal and longitudinal distribution limits. *Forests*, 9(440). <https://doi.org/10.3390/f9070440>
- Huante, P., Rincón, E., & Swetnam, T. (1991). Dendrochronology of *Abies Religiosa* in Michoacan, Mexico. *Tree Ring Bulletin*, 51, 15–28.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2021). *Uso del suelo y vegetación. Escala 1:250 000* (pp. 20–21). Author.
- Kirby, A. (2023). *Exploratory bibliometrics: Using VOSviewer as a preliminary research tool*. *Publications*, 11(1), 10. <https://doi.org/10.3390/publications11010010>
- Marcelo-Peña, J. L., Roig, F. A., Goodwin, Z. A., & Tomazello-Filho, M. (2020). Characterizing growth rings in the trees of Perú: A wood anatomical overview for potential applications in dendroecological-related fields. *Dendrochronologia*, 62, 125728. <https://doi.org/10.1016/j.dendro.2020.125728>
- Margolis, E. Q., Guiterman, C. H., Chavardès, R. D., Coop, J. D., Copes-Gerbitz, K., Dawe, D. A., Falk, D. A., Johnston, J. D., Larson, E., Li, H., Marschall, J. M., Naficy, C. E., Naito, A. T., Parisien, M.-A., Parks, S. A., Portier, J., Poulos, H. M., Robertson, K. M., Speer, J. H., ... Weisberg, P. J. (2022). The North American tree-ring fire-scar network. *Ecosphere*, 13(7), 1–36. <https://doi.org/10.1002/ecs2.4159>
- Morales, M. S., Cook, E. R., Barichivich, J., Christie, D. A., Villalba, R., LeQuesne, C., Srur, A. M., Eugenia Ferrero, M., González-Reyes, Á., Couvreur, F., Matkovsky, V., Aravena, J. C., Lara, A., Mundo, I. A., Rojas, F., Prieto, M. R., Smerdon, J. E., Bianchi, L. O., Masiokas, M. H., ... Boninsegna, J. A. (2020). Six hundred years of South American tree rings reveal an increase in severe hydroclimatic events since mid-20th century. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(29), 16816–16823. <https://doi.org/10.1073/pnas.2002411117>
- Naylor, T. (1971). Dendrochronology in Oaxaca, Mexico: A preliminary study. *Tree Ring Bulletin*, 31, 25–29.
- Pawlik, Ł., Buma, B., Wistuba, M., Malik, I., & Ślęzak, A. (2023). Trees as bioindicators of hillslope degradation by debris flows and dangerous rockfalls along the Lefthand Canyon, Colorado Front Range. *Land Degradation and Development*, 34(6), 1869–1884. <https://doi.org/10.1002/ldr.4575>
- Pompa-García, M., Altman, J., Paéz-Meráz, D. S., & Martínez Rivas, J. A. (2023). Spatiotemporal variability in disturbance frequency and severity across Mexico: Evidence from conifer tree rings. *Forests*, 14(5), 1–21. <https://doi.org/10.3390/f14050900>
- Pranckutė, R. (2021). Web of Science (WoS) and Scopus: the titans of bibliographic information in today's academic world. *Publications*, 9(1), 12. <https://doi.org/10.3390/publications9010012>
- Quesada-Román, A., Ballesteros-Cánovas, J. A., St. George, S., & Stoffel, M. (2022). Tropical and subtropical dendrochronology: Approaches, applications, and prospects. *Ecological Indicators*, 144, 109506. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109506>
- Roig, F. A., Osornio, J. J., Diaz, J. V., Luckman, B., Tiessen, H., Medina, A., & Noellemeier, E. J. (2005). Anatomy of growth rings at the Yucatán Peninsula. *Dendrochronologia*, 22(3), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.dendro.2005.05.007>
- Sánchez-Asunción, W., Cerano-Paredes, J., Franco-Ramos, O., Cornejo-Oviedo, E., Villanueva-Díaz, J., Flores-López, C., & Garza-Martínez, M. (2020). Dendrogeomorphological potential of *Pinus ponderosa* Douglas ex C. Lawson for the reconstruction of flash floods in Los Picos de Davis, Coahuila. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 26(3), 451–467. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2020.02.006>
- Sánchez-Calderón, O. D., Carlón-Allende, T., Mendoza, M. E., & Villanueva-Díaz, J. (2022). Dendroclimatology in Latin America: A review of the state of the art. *Atmosphere*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/atmos13050748>
- Schulman, E. (1944). Dendrochronology in Mexico, I. *Tree-Ring Bulletin*, 10(3), 18–24. <https://doi.org/10.1215/00182168-48.2.349>
- Scott, S. D. (1966). Dendrochronology in Mexico. *Hispanic American Historical Review*, 48(2), 349–349. <https://doi.org/10.1215/00182168-48.2.349>
- Seiler, R., Houlié, N., & Cherubini, P. (2017). Tree-ring width reveals the preparation of the 1974 Mt. Etna eruption. *Scientific Reports*, 7, 44019. <https://doi.org/10.1038/srep44019>
- Sheppard, P. R., Ort, M. H., Anderson, K. C., Clynne, M. A., & May, E. M. (2009). Multiple dendrochronological responses to the eruption of Cinder Cone, Lassen Volcanic National Park, California. *Dendrochronologia*, 27(3), 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.dendro.2009.09.001>
- Sheppard, P. R., Ort, M. H., Anderson, K. C., Elson, M. D., Vázquez-selem, L., Clemens, A. W., Little, N. C., & Speakman, R. J. (2008). Multiple dendrochronological signals indicate the eruption of Parícutin Volcano, Michoacán, Mexico. *Tree-Ring Research*, 64(2), 97–108. <https://doi.org/10.3959/2008-3.1>
- Shindo, L., & Ważny, T. (2023). Dendroarchaeology for the reconstruction of human-environment interactions: Current research. *Quaternary International*, 659, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2023.05.003>
- Šilhán, K., De la Peña Guillén, K. A., Carlón Allende, T., Tsou, C. Y., & Zhang, Y. (2024). Tree-ring eccentricity-based dating of

- landslide movements: Defining a new effective approach. *CATENA*, 234. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2023.107576>
- Stahle, D., Cook, E., Burnette, D., Villanueva, J., Cerano, J., Burns, J., Griffin, D., Cook, B., Acuña, R., Torbenson, M., Sjezner, P., & Howard, I. (2016). The Mexican Drought Atlas: Tree-ring reconstructions of the soil moisture balance during the late pre-Hispanic, colonial, and modern eras. *Quaternary Science Reviews*, 149, 34–60. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2016.06.018>
- Stoffel, M., Bollschweiler, M., Vázquez-Selem, L., Franco-Ramos, O., & Palacios, D. (2011). Dendrogeomorphic dating of rockfalls on low-latitude, high-elevation slopes: Rodadero, Iztaccíhuatl volcano, Mexico. *Earth Surface Processes and Landforms*, 36(9), 1209–1217. <https://doi.org/10.1002/esp.2146>
- Therrell, M. D., Stahle, D. W., Cleaveland, M. K., & Villanueva-Díaz, J. (2002). Warm season tree growth and precipitation over Mexico. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 107(D14), ACL 6-1. <https://doi.org/10.1029/2001JD000851>
- Tichavský, R. (2023). Understanding hydrometeorological triggers of natural hazards through dendrogeomorphology: Methods, limitations, and challenges. *Earth-Science Reviews*, 244, 104546. <https://doi.org/10.1016/j.EARSCIREV.2023.104546>
- Tomazello Fo, M., Roig Juárez, F., & Zevallos Pollito, P. (2009). Dendrocronología y dendroecología tropical: marco histórico y experiencias exitosas en los países de América Latina. *Revista del Instituto de Ecología*, 44(2), 73–82.
- van Eck, N. J., & Waltman, L. (2023). {VOSviewer} manual. Leiden: Univeriteit Leiden. <https://www.vosviewer.com/>
- Villanueva-Díaz, J., Stahle, D. W., Cleaveland, M. K., & Therrell, M. D. (2003). Estado actual de la dendrocronología en México. *Revista Ciencia Forestal en México*, 25(88), 5–36. <https://cienciasforestales.inifap.gob.mx/index.php/forestales/article/view/921>
- Villanueva-Díaz, J., Stahle, D. W., Luckman, B. H., Cerano-Paredes, J., Therrell, M. D., Cleaveland, M. K., & Cornejo-Oviedo, E. (2007). Winter-spring precipitation reconstructions from tree rings for northeast Mexico. *Climatic Change*, 83, 117–131. <https://doi.org/10.1007/s10584-006-9144-0>
- Villanueva-Díaz, J., Stahle, D. W., Therrell, M. D., Beramendi-Orosco, L., Estrada-Ávalos, J., Martínez-Sifuentes, A. R., Astudillo-Sánchez, C. C., Cervantes-Martínez, R., & Cerano-Paredes, J. (2020). The climatic response of baldcypress (*Taxodium mucronatum* Ten.) in San Luis Potosi, Mexico. *Trees - Structure and Function*, 34(2), 623–635. <https://doi.org/10.1007/s00468-019-01944-0>
- Villanueva-Díaz, J., Vázquez-Selem, L., Gómez-Guerrero, A., Cerano-Paredes, J., Aguirre-González, N. A., & Franco-Ramos, O. (2016). Potencial dendrocronológico de *Juniperus monticola* Martínez en el monte Tláloc, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39(2), 175–185. <https://doi.org/10.35196/rfm.2016.2.175-185>
- Villanueva-Díaz, J., Martínez-Sifuentes, A. R., Quiñonez-Barraza, G., Estrada-Avalos, J. F. Del R. Reyes-Camarillo. (2021). Annual radial growth and climatic response of *Quercus crassifolia* Bonpl. in northwestern Durango, Mexico. *Trees*, 35, 783–798. <https://doi.org/10.1007/s00468-020-02077-5>
- Yocom, L. L., Fulé, P. Z., Falk, D. A., García-Domínguez, C., Cornejo-Oviedo, E., Brown, P. M., Villanueva-Díaz, J., Cerano, J., & Montaña, C. C. (2014). Fine-scale factors influence fire regimes in mixed-conifer forests on three high mountains in Mexico. *International Journal of Wildland Fire*, 23(7), 959–968. <https://doi.org/10.1071/WF13214>
- Zhao, S., Pederson, N., D'Orangeville, L., HilleRisLambers, J., Boose, E., Penone, C., Bauer, B., Jiang, Y., & Manzanedo, R. D. (2019). The International Tree-Ring Data Bank (ITRDB) revisited: Data availability and global ecological representativity. *Journal of Biogeography*, 46(2), 355–368. <https://doi.org/10.1111/jbi.13488>
- Zúñiga-Vásquez, J. M., Villanueva-Díaz, J., Cerano-Paredes, J., & Quiñonez-Barraza, G. (2023). Impact of fire history on the structure of a temperate forest in Northern Mexico. *Fire*, 6(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/fire6010019>

LA EDICIÓN DE ESTE NÚMERO
ESTUVO A CARGO DE LA
**COORDINACIÓN
DE REVISTAS
INSTITUCIONALES
DE LA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
CHAPINGO**

DICIEMBRE, 2024

Revista Chapingo es una publicación periódica con arbitraje que difunde información científica y tecnológica de temas agropecuarios, forestales y de recursos naturales, desde 1927.

Actualmente es presentada en varios índices internacionales (abstracts), cuenta con registro ISSN y es distribuida a más de 200 instituciones en todo el mundo. Está organizada en series y en cada una de ellas agrupa material afín, con el propósito de ofrecer información sistematizada de temas específicos.

Las formas de publicación son: artículos científicos por invitación y proposición, notas científicas breves y revisiones bibliográficas en español, inglés, francés y portugués, de investigadores o profesores de cualquier institución, tanto nacional como internacional.

Los puntos básicos que deberán contener los artículos científicos y las notas científicas breves para su publicación en la revista son: título, nombre(s), filiación y dirección postal completa del autor(es), resumen y palabras clave en español y en el idioma en el que el artículo esté escrito, introducción, materiales y métodos, resultados y discusión, conclusiones y literatura citada.

La revista se encuentra en los siguientes índices:

ELSEVIER

THOMSON REUTERS - INSTITUTE FOR SCIENTIFIC INFORMATION ISI

CONACyT - Índice de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnológica

REDALyC - Red de Revistas Científicas de América Latina y El Caribe, España y Portugal

JCR - Journal Citation Reports

Las personas interesadas en la publicación de sus contribuciones técnico-científicas o que soliciten información complementaria, deberán dirigirse a:

Oficina Editorial Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente

División de Ciencias Forestales

Universidad Autónoma Chapingo

km 38.5 Carretera México-Texcoco

Chapingo, Estado de México. C. P. 56230

Tel.: 01 (595) 95 2-15-00 Ext. 5281

Correo-e: rforest@chapingo.mx

Coordinación de Revistas Institucionales

Dirección General de Difusión Cultural y Servicio

Edificio Dr. Efraím Hernández Xolocotzi, Oficina 113

Universidad Autónoma Chapingo

km 38.5 Carretera México-Texcoco

Chapingo, Estado de México. C. P. 56230

Tel. 01 (595) 95-2-15-00 Ext. 1569

Correo-e: cori@chapingo.mx