

GERMINACIÓN, INFESTACIÓN Y VIABILIDAD EN BELLOTAS DE *Quercus polymorpha* (Schltdl. & Cham.) TRAS UN AÑO DE ALMACENAMIENTO

GERMINATION, INFESTATION, AND VIABILITY IN ACORNS OF *Quercus polymorpha* (Schltdl. & Cham.) AFTER 1-YEAR STORAGE

Claudia González-Salvatierra; Ernesto I. Badano¹; Joel Flores; Juan P. Rodas
División de Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica,
A. C. Camino a la presa San José, San Luis Potosí. 2055. C. P. 78216. S. L. P., México.
Correo-e: ernesto.badano@ipicyt.edu.mx; Tel.: +52 444 8342049; Fax: +52 444 8342010
(¹ Autor para correspondencia).

RESUMEN

Los encinos blancos tienen semillas recalcitrantes que se mantienen viables por corto tiempo. Sin embargo, esta información es escasa para encinos mexicanos. Este es el caso de *Quercus polymorpha*, una especie tolerante a la sequía y ampliamente distribuida en la Sierra Madre Oriental que puede utilizarse en programas de restauración forestal. Las bellotas son colectadas durante la época reproductiva y son almacenadas por varios meses antes de su germinación. Este estudio se enfocó en 1) determinar cuántas semillas se pierden durante el almacenamiento debido a factores fisiológicos relacionados con su viabilidad, 2) cuantificar las semillas que se pierden por otros factores, y 3) evaluar si la estratificación fría puede estimular la germinación de las bellotas. Las bellotas utilizadas fueron almacenadas durante un año. El 70 % de las bellotas estaban parasitadas por insectos antes de su almacenamiento, mientras que el 20 % perdió su viabilidad debido a factores fisiológicos o infestación por hongos. Los ensayos de germinación se llevaron a cabo utilizando sólo bellotas potencialmente viables, las cuales fueron sometidas a tres periodos de estratificación en frío (0, 20 y 50 días). El experimento mostró que las bellotas estratificadas durante 50 días tienen mayores tasas de germinación (64.2 %) que las de 20 (44.8 %) y 0 días (16.5 %).

PALABRAS CLAVE: Estratificación en frío, parasitismo de semillas, insectos, hongos, pruebas de viabilidad.

ABSTRACT

White oaks have recalcitrant seeds that remain viable for short periods of time, but this information is still conspicuously lacking for Mexican oaks. This is the case of *Quercus polymorpha*, a drought-tolerant species widely distributed across Sierra Madre Oriental that can be used in forest restoration programs. The acorns used to develop their saplings are collected during the reproductive season and stored by several months before their germination. This study focused in 1) determining how many seeds are lost during storage because of physiological factors linked to their viability, 2) quantifying how many seeds were lost by other factors, and 3) assessing whether cold stratification can stimulate acorn germination. Acorns used in this study were stored during a round year. We found that 70 % of these acorns were parasitized by insects prior to their storage, while an additional 20 % had lost their viability due to physiological factors or fungal infestation. Germination trials were performed by only using potentially viable acorns, which were subjected to three different cold stratification periods (0, 20 and 50 days). This experiment indicated acorns stratified during 50 days display higher germination rates (64.2 %) than those stratified by 20 (44.8 %) and 0 days (16.5 %).

KEYWORDS: Cold stratification, seed parasitism, insects, fungi, viability tests.



Recibido: 10 de julio, 2012
Aceptado: 26 de agosto, 2013
doi: 10.5154/r.rchscfa.2012.07.044
<http://www.chapingo.mx/revistas>

INTRODUCCIÓN

México alberga la mayor diversidad de especies de encinos, los cuales se extienden principalmente a través de los bosques templados (Nixon, 1993a). La mayoría de los encinos mexicanos se pueden clasificar en dos grandes grupos: los encinos blancos (sección *Lepidobalanus*) y encinos rojos (sección *Eritrobalanus*) (Nixon, 1993b). Con pocas excepciones, las bellotas de los encinos blancos tienen poca o nula latencia y normalmente germinan después de madurar. Por el contrario, las bellotas de los encinos rojos pueden presentar latencia variable (Zavala-Chávez, 2001, 2004). Los encinos blancos tienen semillas muy recalcitrantes; es decir, la deshidratación reduce drásticamente la viabilidad de la bellota (Bonner, 1996; Gosling, 1989; Guthke & Spethmann, 1993; Pardos, 2000). En el caso de los encinos blancos, la pérdida de agua se inicia casi inmediatamente después que las bellotas son liberadas de los árboles madre y su periodo de viabilidad es inferior a 12 meses (Zavala-Chávez, 2001; Zavala-Chávez & García, 1996). Por lo tanto, en condiciones de campo, la viabilidad de las bellotas es impredecible, ya que depende del equilibrio entre la ganancia/pérdida de agua, que a su vez depende de varios factores ambientales (Vázquez-Yanes & Orozco-Segovia, 1990). A pesar de esta falta de latencia, muchos encinos blancos mexicanos son valiosos para los programas de restauración debido a su plasticidad para establecerse en diferentes tipos de hábitats (Badano, 2011; García-Coll et al., 2004; Nívar-Cháidez, 2010). De hecho, la mayoría de los programas de reforestación de encinos en América dependen de trasplantes masivos brinzales en las zonas seleccionadas (Guthke & Spethmann, 1993; Sáenz-Romero, 2003), los cuales se cultivan a partir de bellotas recolectadas en el campo (Arriaga, Cervantes, & Vargas-Mena, 1994; Sáenz-Romero & Lindig-Cisneros, 2004). Sin embargo, en México, las bellotas que se utilizan para desarrollar árboles jóvenes se suelen almacenar por varios meses después de la recolección (Garwood & Lighton, 1990; Vázquez-Yanez & Orozco-Segovia, 1990), y uno de los principales problemas que deben enfrentar los productores es la baja tasa de germinación en las bellotas proporcionadas por los recolectores (Garwood & Lighton, 1990; Vázquez-Yanez & Orozco-Segovia, 1990). Por lo tanto, existen dos factores importantes que deben tenerse en cuenta para la producción de brinzales de encinos: el periodo en que se almacenan las bellotas antes de su germinación y la aplicación de tratamientos para estimular la emergencia de la radícula y el tallo en las bellotas almacenadas (Arriaga et al., 1994; Díaz-Pontones & Reyes-Jaramillo, 2009; Kolotelo et al., 2001; Martínez-Pérez, Orozco-Segovia, & Martorell, 2006; Willan, 1991).

Quizás el método más común utilizado en los viveros para mejorar la germinación de las bellotas almacenadas y obtener uniformidad en el crecimiento de las plántulas es exponerlas a temperaturas frías durante periodos variables (Castro-Colina et al., 2012; Garwood & Lighton, 1990; Vázquez-Yanez & Orozco-Segovia, 1990). En este sentido,

INTRODUCTION

Mexico harbors the largest diversity of oak species, which mainly spread across temperate forests (Nixon, 1993a). Most Mexican oaks can be classified into two major groups: white oaks (section *Lepidobalanus*) and red oaks (section *Eritrobalanus*) (Nixon, 1993b). With a few exceptions, acorns of white oaks have little or no dormancy and usually germinate after maturing. Conversely, acorns of red oaks may exhibit variable dormancy (Zavala-Chávez, 2001, 2004). White oaks then have highly recalcitrant seeds; that is, dehydration dramatically reduces acorn viability (Bonner, 1996; Gosling, 1989; Guthke & Spethmann, 1993; Pardos, 2000). In white oaks, water loss starts almost immediately after acorns are released from the mother trees and their viability period is lower than twelve months (Zavala-Chávez, 2001; Zavala-Chávez & García, 1996). Thus, under field conditions, acorn viability is unpredictable because it depends on the balance between gain/loss of water, which in turn depends on several environmental factors (Vázquez-Yanes & Orozco-Segovia, 1990). In spite of this lacking of dormancy, many Mexican white oaks are valuable for restoration programs because of their plasticity for establishing in different types of environments (Badano, 2011; García-Coll et al., 2004; Nívar-Cháidez, 2010). Indeed, most oak reforestation programs in the Americas rely on massive transplants of saplings in the target areas (Guthke & Spethmann, 1993; Sáenz-Romero, 2003), where saplings are usually grown from acorns collected in the field (Arriaga, Cervantes, & Vargas-Mena, 1994; Sáenz-Romero & Lindig-Cisneros, 2004). However, in México, acorns used for sapling development are usually stored for several months after collection (Garwood & Lighton, 1990; Vázquez-Yanez & Orozco-Segovia, 1990), and one of the main problems that sapling producers must face is the low germination rates of acorns provided by collectors (Garwood & Lighton, 1990; Vázquez-Yanez & Orozco-Segovia, 1990). Thus, there are two important factors that should be taken into account for the production of oak saplings: the period that acorns are stored before their germination and the application of treatments to stimulate radicle and shoot emergence in stored acorns (Arriaga et al., 1994; Díaz-Pontones & Reyes-Jaramillo, 2009; Kolotelo et al., 2001; Martínez-Pérez, Orozco-Segovia, & Martorell, 2006; Willan, 1991).

Perhaps the most common method used in nurseries for enhancing germination of stored acorns and obtaining uniformity in seedling growth is exposing them to cold temperatures for variable periods (Castro-Colina et al., 2012; Garwood & Lighton, 1990; Vázquez-Yanez & Orozco-Segovia, 1990). In this vein, this study summarizes the results of a series of assessments performed on acorns of *Quercus polymorpha* Schltdl. & Cham., or Monterrey oak, which is widely distributed across North and Central America (Simpson, Karges, & Carpenter, 1992). For this, acorns stored for a round year after their collection were used 1) to determine how many acorns lost their viability during

el presente estudio resume los resultados de una serie de evaluaciones realizadas sobre bellotas de *Quercus polymorpha* Schltdl. & Cham., o roble Monterrey, que se distribuye ampliamente en América del Norte y Centroamérica (Simpson, Karges, & Carpenter, 1992). Para esto, bellotas almacenadas durante un año después de su recolección fueron utilizadas: 1) para determinar cuántas de ellas perdieron su viabilidad durante el almacenamiento debido a factores fisiológicos; 2) para cuantificar el número de bellotas que se perdieron por otros factores, tales como el daño por insectos parásitos; y 3) para evaluar si la estratificación en frío puede estimular la germinación de bellotas sanas, no infectadas, que conservaban su capacidad de germinación después del almacenamiento. Este estudio forma parte de un proyecto a largo plazo centrado en determinar las condiciones de germinación y de almacenamiento requeridas por bellotas de encinos mexicanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de bellotas

Las bellotas de *Q. polymorpha* provenían de bosques de encinos primarios ubicados en los alrededores de Ciudad del Maíz (22° 23' 59" N, 99° 36' 10" O), San Luis Potosí, México. La cosecha de bellotas fue realizada por los agricultores locales en octubre de 2010, recolectando bellotas maduras directamente de las ramas de los árboles madre. Las cúpulas de las bellotas se separaron durante este proceso. Las bellotas cosechadas se colocaron en bolsas de cultivo y se almacenaron inmediatamente en cobertizos locales usados para el almacenamiento de granos, que es el procedimiento más común utilizado por los agricultores mexicanos para acopiar bellotas. En septiembre de 2011, los agricultores nos proporcionaron un total de 28,875 de las bellotas que fueron recogidas y almacenadas en 2010.

Evaluación de la infestación por insectos

Durante la cosecha, los agricultores evitan recoger bellotas dañadas por insectos para asegurarse que sólo se almacenen bellotas potencialmente viables. En el campo, las bellotas que fueron parasitadas por insectos son fácilmente reconocibles porque muestran una perforación pequeña en el pericarpio debido a la aparición del imago y son evitadas por los agricultores. Sin embargo, este es un método *a posteriori* para evaluar la infestación de las bellotas y, en algunos casos, las bellotas que se recolectan y se almacenan ya están infestadas, pero no se identifican como tales porque el daño (el agujero por el cual emerge el imago) no es evidente hasta varios meses más tarde. Por lo tanto, primero se determinó la cantidad de bellotas infectadas por insectos después de un año de almacenamiento. Para ello, las bellotas proporcionadas por los agricultores se agruparon en cinco lotes de igual tamaño (5,775 unidades cada uno). Cada lote estuvo conformado por bellotas seleccionadas al azar de las bellotas totales disponibles. La prueba de flotabilidad se aplicó en es-

storage because of physiological factors; 2) to quantify how many acorns were lost by other factors, such as damage by parasitic insects; and 3) to assess whether cold stratification can stimulate germination of sound, uninfected acorns that retained their germination capability after the storing. This study is part of a long-term project focused in determining germination and storage conditions required by acorns of Mexican oaks.

MATERIALS AND METHODS

Acorn collection

The acorns of *Q. polymorpha* came from primary oak forests located in the surroundings of Ciudad del Maíz (22° 23' 59" N, 99° 36' 10" W), state of San Luis Potosí, México. Acorn harvesting was performed by local farmers in October 2010, by directly taking mature acorns from the branches of mother trees. Cupules were detached from acorns during this process. Harvested acorns were placed in crop bags and immediately stored in local storage sheds, which is the most common procedure used by Mexican farmers to store acorns. By September 2011, the farmers provided us with a total of 28,875 of the acorns that were collected and stored in 2010.

Assessment of insect infestation

During harvesting, farmers avoid collecting insect-damaged acorns to ensure that only potentially viable acorns are stored. In the field, acorns that were parasitized by insects are easily recognized because they show a small perforation in the pericarps due to the emergence of the imago and they are avoided by the farmers. However, this is a *post hoc* method to assess acorn infestation; in some cases, those acorns that are collected and stored are already infested, but they are not identified as infested acorns because the damage (the imago's hole) is not evident until several months later. Therefore, we first determined the amount of acorns that were infected by insects after a year of storage. For this, acorns taken from the farmers were pooled into five equally sized batches (5,775 units each). Each batch was composed of acorns that were randomly selected from the total pool of available acorns. The floatability test was applied on these batches to separate potentially viable acorns from those that were infected (Flores-Cano, Badano, & Flores, 2012; Zavala-Chávez & García, 1996). This test was performed by placing the acorns in containers (100 L) previously filled with water. After 24 h, floating acorns were assumed to be infected because the cotyledons and embryo have been consumed by parasites (i. e., the acorn is empty) (Zavala-Chávez & García, 1996). In contrast, sunken acorns were assumed as potentially viable because their content is intact (Zavala-Chávez & García, 1996). Nevertheless, because floating acorns in this test may be unviable because other factors besides insect infestation (e.g., desiccation or lacking of embryo), all floating and sunken acorns from each batch were visually

tos lotes para separar las bellotas potencialmente viables de las que estaban infectadas (Flores-Cano, Badano, & Flores, 2012; Zavala-Chávez & García, 1996). Esta prueba se llevó a cabo mediante la colocación de las bellotas en recipientes (100 L) previamente llenos de agua. Después de 24 h, se supuso que las bellotas flotantes estaban infectadas debido a que los cotiledones y embriones habían sido consumidos por los parásitos (es decir, la bellota está vacía) (Zavala-Chávez & García, 1996). Por el contrario, se asumió que las bellotas hundidas eran potencialmente viables debido a que su contenido estaba intacto (Zavala-Chávez & García, 1996). Sin embargo, ya que las bellotas flotantes en esta prueba pueden ser inviables debido a otros factores, además de la infestación por insectos (por ejemplo, la desecación o carencia de embrión), todas las bellotas flotantes y hundidas de cada lote fueron inspeccionadas y diseccionadas para evaluar si presentaban daños por insectos. Las bellotas hundidas fueron utilizadas posteriormente para llevar a cabo otras pruebas de viabilidad. Estas bellotas se colocaron en bandejas de plástico y se mantuvieron en condiciones de laboratorio (25 °C) hasta que se llevaron a cabo las pruebas. Todas las pruebas adicionales aplicadas a las bellotas hundidas se realizaron en un plazo de 12 h después de finalizar la prueba de flotabilidad.

Se contaron las bellotas flotantes y las hundidas de cada lote, para estimar la relación entre las bellotas infectadas y las potencialmente viables. Estas proporciones se compararon posteriormente contra un valor esperado de cero mediante el uso de una prueba t para medias simples (Zar, 2010). En este análisis, si la proporción entre las bellotas infectadas y las potencialmente viables difiere significativamente del valor esperado (cero), entonces se asume que una cantidad sustancial de bellotas se perdió debido a la infección por insectos.

Prueba de viabilidad de bellotas

En esta prueba sólo se utilizaron las bellotas hundidas en la prueba de flotabilidad para evaluar la cantidad de bellotas que perdieron su viabilidad después de un año de almacenamiento debido a los procesos fisiológicos. Para ello, se seleccionaron al azar cuatro lotes, incluyendo 20 bellotas de cada uno de la reserva total de bellotas hundidas. Estos lotes se reunieron inmediatamente después de terminar la prueba de flotabilidad. Se realizó una pequeña incisión en el pericarpio de cada una de estas bellotas y los lotes se incubaron por separado en solución al 1 % de sal de tetrazolio (cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio) a 20-25 °C, en oscuridad, durante 24 h. En esta prueba, las bellotas viables se evidencian cuando la sal de tetrazolio (incolora) reacciona con el hidrógeno liberado por las enzimas deshidrogenasas activas, lo que sólo es posible si las células de los embriones están vivas y, por lo tanto, la sal se reduce químicamente a un colorante rojo no difusible, el formazán (Black, Bewley, & Halmer, 2006). Después de 24 h de incubación en solución de tetrazolio, las bellotas fueron partidas a la mitad para evaluar si

inspected and dissected to assess whether they exhibit damage due to insects. Because sunken acorns were later used to perform other viability tests, they were placed in plastic trays and maintained under laboratory conditions (25 °C) until these test were conducted. All further tests applied to sunken acorns were performed within 12 h after the floatability test was finished.

Floating and sunken acorns from each batch were counted and these data were used to estimate the ratio between infected and potentially viable acorns. These ratios were later compared against an expected value of zero by using a t-test for single means (Zar, 2010). In this analysis, if the proportion between infected and potentially viable acorns significantly differs from the expected value (zero), then it is assumed that a substantial amount of acorns were lost because of insect infection.

Viability test of acorns

To assess how many acorns lost their viability after a year of storage because of physiological processes, we only used those acorns that were sunken in the floatability test. For this, four batches including 20 acorns each were randomly selected from the total pool of sunken acorns. These batches were assembled immediately after the floatability test was finished. A small incision was performed on pericarp of each of these acorn and the batches were separately incubated in 1 % solution of tetrazolium salt (2, 3, 5-triphenyl-tetrazolium chloride) at 20-25 °C, in dark, for 24 h. In this test, viable acorns are indicated when the colourless tetrazolium salt reacts with the hydrogen released by active dehydrogenase enzymes, which is only possible if embryo cells are alive and, hence, the salt is chemically reduced to the red non-diffusible dye, formazan (Black, Bewley, & Halmer, 2006). After 24 h of incubation in the tetrazolium solution, acorns were halved to assess whether their embryos were red-stained and the ratio between unviable and viable acorns was estimated for each batch. Afterwards, a similar t-test to that described above was used to determine whether a substantial reduction in viability occurred on those seeds that were not infected by insects.

Effects of cold stratification on acorn germination

To determine whether cold stratification can stimulate acorn germination, three batches of 320 acorns each were randomly selected from the pool of acorns that were sunken in the floatability test. These acorns batches were firstly sterilized by immersing them in solution 1 % of sodium hypochlorite for 10 min, and they were later washed with sterile distilled water under aseptic conditions inside a laminar flow cabinet. Because all these acorns were immersed in water during 24 h for the floatability tests, all of them received the same hydration period. Therefore, acorns from the three batches were subjected the same standardizing conditions to induce germination before the stratification treatments described

sus embriones estaban manchados de rojo y se calculó la relación entre las bellotas inviábiles y las viables para cada lote. Posteriormente, se realizó una prueba t similar a la descrita anteriormente para determinar si se produjo una reducción sustancial en la viabilidad de aquellas semillas que no estaban infectados por los insectos.

Efectos de la estratificación en frío sobre la germinación de bellotas

Para determinar si la estratificación en frío puede estimular la germinación de las bellotas, se seleccionaron al azar tres lotes de 320 bellotas cada uno provenientes del total de bellotas hundidas en la prueba de flotabilidad. En primer lugar, estos lotes de bellotas fueron esterilizados por inmersión en una solución al 1 % de hipoclorito de sodio durante 10 min y, posteriormente fueron lavadas con agua destilada estéril en condiciones asépticas dentro de una cámara de flujo laminar. Debido a que estas bellotas se sumergieron en agua durante 24 h en las pruebas de flotabilidad, todas recibieron el mismo periodo de hidratación. Por lo tanto, las bellotas de los tres lotes se sometieron a las mismas condiciones de normalización para inducir la germinación antes de iniciar los tratamientos de estratificación descritos a continuación. De los tres lotes de bellota, uno no fue estratificado (control) y estas bellotas se colocaron inmediatamente en una bandeja de plástico que contenía una mezcla de suelo limoso húmedo, para evaluar su germinación. Los otros dos lotes se sometieron a la estratificación en frío en diferentes periodos (20 y 50 días, respectivamente). La estratificación en frío se llevó a cabo mediante la colocación de los lotes de bellota en una cámara refrigerada a 4 °C y 100 % de humedad relativa. Después de los tratamientos de frío, los lotes de bellota también se germinaron en bandejas de plástico con una mezcla de suelo limoso húmedo.

Debido a que los tratamientos de estratificación terminaron en diferentes momentos (0, 20 y 50 días), los ensayos de germinación para estos tratamientos se iniciaron en diferentes momentos; en otras palabras, los ensayos de germinación se iniciaron secuencialmente después de acabada la estratificación. Sin embargo, todos los ensayos de germinación se llevaron a cabo en las mismas condiciones. Para esto, las bandejas que contenían las bellotas de los diferentes tratamientos de estratificación se colocaron en una cámara de crecimiento a 25 °C y 70 % de humedad relativa, con un fotoperiodo de 12 h de luz/oscuridad. En todos los casos, la germinación de bellotas se monitoreó cada dos días durante 100 días y se asumió que la germinación había ocurrido al registrar la emergencia de la radícula a 5 mm. Después de finalizados todos los ensayos de germinación, se realizaron análisis de tiempo de falla para determinar si la estratificación en frío aumentó las tasas de germinación de las bellotas, y para evaluar si los diferentes periodos de estratificación afectaron diferencialmente este proceso. La germinación de una bellota en particular, en una fecha de monitoreo determinada, se registró como una "falla" y, por lo tanto,

below were conducted. From the three acorn batches, one of them remained unstratified (control) and these acorns were immediately placed in a plastic dish, containing a mixture of moist silt loam soil, to assess their germination. The other two batches were subjected to cold stratification for different periods (20 and 50 days, respectively). Cold stratification was performed by placing the acorn batches in a refrigerated chamber at 4 °C and 100 % relative humidity. After cold treatments, acorn batches were also germinated in plastic dishes on a mixture of moist silt loam soil.

Because stratification treatments finished at different times (0, 20 and 50 days), germination trials for these different treatments were started in different moments; in other words, germination trials were started sequentially after stratification finished. Nevertheless, all germination trials were conducted under the same conditions. For this the dishes containing the acorns from the different stratification treatments were placed in a growth chamber at 25 °C and 70 % relative humidity, with a photoperiod 12 h dark/light. In all cases, acorn germination was monitored every two days for 100 days, and germination was assumed when radicle emergence at 5 mm had occurred. After all germination trials were finished, failure-time-analyses were performed to determine whether cold stratification increased germination rates of acorns, and to assess whether the different stratification periods differentially affected this process. The germination of a particular acorn at a given monitoring date was recorded as a 'failure' and, thus, these analyses considered each acorn as a replicate (Lee, 1980). The Kaplan-Meier's method (Kaplan & Meier, 1958) was used to estimate the germination rate of each stratification treatment, and the Gehan's generalized Wilcoxon Chi-square test (Lee, 1980) was used to compare germination rates among stratification treatments. If differences were detected, pairwise comparisons between treatments were conducted by using the Cox-Mantel's two-sample test (Lee, Desu, & Gehan, 1975).

RESULTS AND DISCUSSION

The floatability test indicated that 70 % of the acorns were unviable (Figure 1). Among the five batches of acorns on which this test was conducted, the average ratio between infected (floating) and potentially viable (sunken) acorns was 2.41 (± 0.29 S. E.). This ratio was significantly higher than zero ($t_{(1,4)} = 8.193$, $P = 0.002$), indicating that insects caused substantial losses of acorns during the storage. The subsequent visual inspection on floating acorns showed that 96.3 % of them had small holes in their pericarps, between 1.5 and 2.0 mm diameter, suggesting that adult insects had emerged during the storage (Figure 2A). The remaining 3.7 % of the acorns that floated in this test showed no apparent external damage, but they were assumed as unviable because of other factors (e.g., fails in their development). Those acorns that were sunken in this test showed no apparent external damage. Post-dispersal acorn damage by insects has been commonly reported in European oak

estos análisis consideraron a cada bellota como una réplica (Lee, 1980). El método de Kaplan-Meier (Kaplan & Meier, 1958) se utilizó para estimar la tasa de germinación de cada tratamiento de estratificación. La prueba Chi cuadrada de Wilcoxon generalizada de Gehan (Lee, 1980) se empleó para comparar las tasas de germinación entre los tratamientos de estratificación. Si se detectaban diferencias, se realizaban comparaciones por pares entre los tratamientos mediante el uso de pruebas para dos muestras de Cox-Mantel (Lee, Desu, & Gehan, 1975).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prueba de flotabilidad indicó que 70 % de las bellotas eran inviables (Figura 1). Entre los cinco lotes de bellotas en que se llevó a cabo esta prueba, la relación promedio entre las bellotas infectadas (flotantes) y las potencialmente via-

species. For example, Csóka and Hirka (2006) indicated that parasitic insects may consume 36 to 61 % of the acorns produced in a single reproductive event in Hungarian forests, while Branco, Branco, Merouani, and Almeida (2002) showed that 68 % of the acorns produced by Portuguese oaks can be infested by weevils almost immediately after they are released from the mother plant. Further, in southeastern of Spain, acorn post-dispersal predation rates in *Q. ilex* were indicated to be negatively related to acorn size, where larger acorns are highly preferred by seed predators (Gómez, 2004). In our case, *Q. polymorpha* in the site where acorns were collected for this study (Ciudad del Maíz, Mexico) was reported to produce similarly sized acorns (1.38 g) (Flores-Cano et al., 2012) and, therefore, seed mass might not be an important force driving acorn infestation by insects during storage. Indeed, insect parasitism on Mexican oaks was suggested to occur while acorns are still attached to the mother

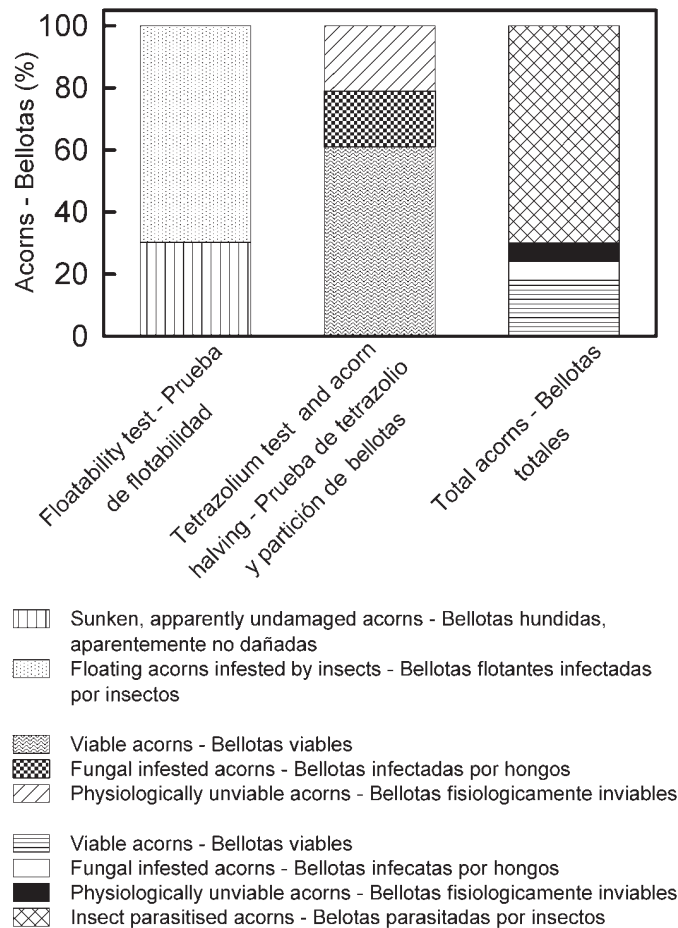


FIGURA 1. Porcentaje de bellotas agrupadas en diferentes clases después de realizar la prueba de flotabilidad y la prueba de tetrazolio. La figura incluye el porcentaje total de las bellotas en cada clase, después de que los resultados de estas pruebas se extrapolaron con el total de bellotas proporcionadas por los agricultores (barra derecha).

FIGURE 1. Percent of acorns in the different classes in which they were grouped after performing the floatability test (left bar), and after performing the tetrazolium test and acorn halving (center bar). The figure also included the total percent of acorns at each class after the results of these tests were extrapolated to the total number of acorns that were obtained from farmers (right bar).

bles (hundidas) fue de $2.41 (\pm 0.29 \text{ S. E.})$. Esta relación fue significativamente mayor que cero ($t_{(1,4)} = 8.193, P = 0.002$), lo que indica que los insectos causaron pérdidas sustanciales durante el almacenamiento de las bellotas. La posterior inspección visual de las bellotas flotantes mostró que el 96.3 % tenía pequeños agujeros en su pericarpio, entre 1.5 y 2.0 mm de diámetro, lo que sugiere que insectos adultos habían surgido durante el almacenamiento (Figura 2A). El restante 3.7 % de las bellotas que flotaron en esta prueba no mostró daños externos aparentes, pero se asumieron como inviables debido a otros factores (por ejemplo, fallas en su desarrollo). Las bellotas que estaban hundidas en esta prueba no mostraron daños externos aparentes. En las especies de encinos europeos con frecuencia se han reportado daños por insectos posteriores a la dispersión. Por ejemplo, Csóka y Hirka (2006) indicaron que los insectos parásitos pueden consumir de 36 a 61 % de las bellotas producidas en un evento reproductivo único en los bosques de Hungría, mientras que Branco, Branco, Merouani y Almeida (2002) mostraron que 68 % de las bellotas producidas por encinos portugueses pueden ser infestadas por gorgojos casi inmediatamente después de haber sido liberados de la planta madre. Además, en el sureste de España, se mostró que las tasas de depredación postdispersión en *Q. ilex* estaban rela-

tree (Cibrián-Tovar, Mendez-Montiel, Campos-Bolaños, Yates, & Flores-Lara, 1995). Nevertheless, studies reporting acorn infestation rates are still being scarce. After revising the published literature, we found that only one study has assessed the impact of insect parasitism on acorns of *Q. candicans*, reporting that up to 21.6 % of the acorns produced by this oak species are infested by insects in a cloud forest of the state of Veracruz (Díaz-Fleischer, Hernández-Arellano, Cano-Medina, Cervantes-Alday, & López-Ortega 2010). As compared to our findings, it seems that insect infestation rates may be even higher if acorns are stored during prolonged periods of time within farm sheds.

Up 61% of the acorns on which the tetrazolium test was applied showed red-stained embryos (Figure 2B), which suggests that they were viable. The remaining acorns used in this test showed no reaction to tetrazolium salt, but later we realized that the loss of viability was due to different factors. The average proportion between unviable and viable acorns in the tetrazolium test was $0.64 (\pm 0.06 \text{ S. E.})$, and the statistical analysis indicated that this ratio was significantly higher than zero ($t_{(1,3)} = 9.629, P = 0.003$). Although these results are not fully conclusive because tetrazolium tests should also be conducted prior to the storage, these findings

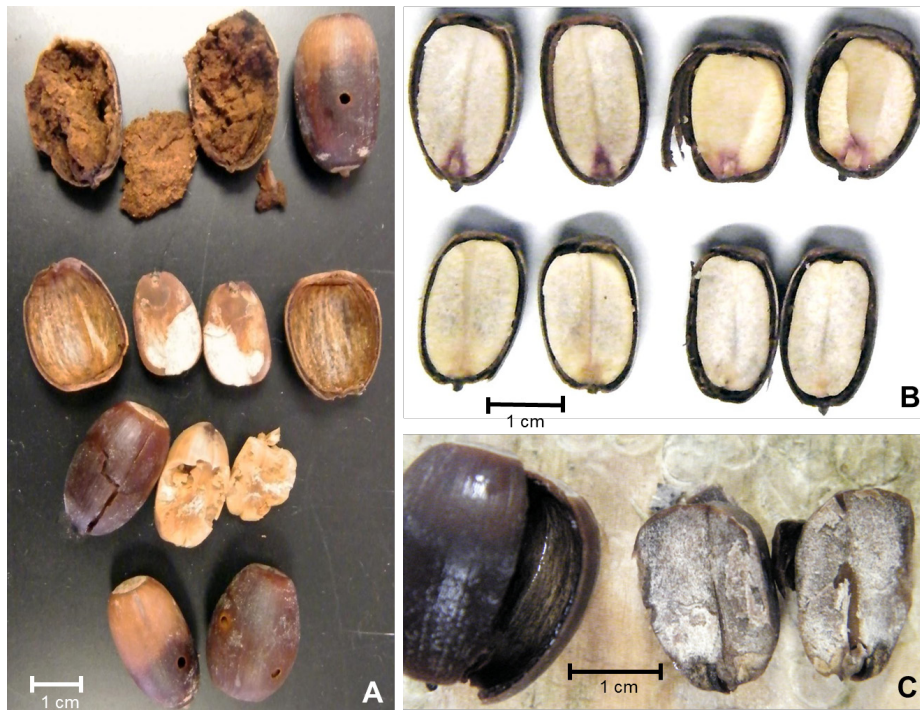


FIGURA 2. Bellotas de *Quercus polymorpha* después de un año de almacenamiento. A) Bellotas afectadas por insectos parásitos y perforaciones en los pericarpios resultantes de la emergencia del imago. B) Bellotas partidas a la mitad después de aplicar la prueba de tetrazolio, donde las bellotas viables (parte superior de la placa) se pueden distinguir de las bellotas inviables (parte inferior de la placa) a causa de sus embriones teñidos de rojo. C) Bellotas infectados por hongos.

FIGURE 2. Acorns of *Quercus polymorpha* after a year of storage. A) Acorns affected by parasitic insects and the perforations in the pericarps resulting from the emergence of the imago. B) Acorns halved after applying the tetrazolium test, where viable acorns (upper section of the plate) can be distinguished from unviable acorns (lower section of the plate) because of their red-stained embryos. C) Acorns infected by fungi.

cionadas negativamente con el tamaño de la bellota, donde las bellotas más grandes son mayoritariamente preferidas por los depredadores de semillas (Gómez, 2004). En nuestro caso, se reportó que, en el sitio donde se recogieron bellotas para este estudio (Ciudad del Maíz, México), *Q. polymorpha* produce bellotas de tamaño similar (1.38 g) (Flores-Cano et al., 2012) y, por lo tanto, la masa de las semillas no sería una fuerza importante que promueva la infestación de bellotas por insectos durante el almacenamiento. En efecto, se ha sugerido que el parasitismo por insectos en los encinos de México ocurre mientras las bellotas todavía se encuentran en el árbol madre (Cibrián-Tovar, Mendez-Montiel, Campos-Bolaños, Yates, & Flores-Lara, 1995). Sin embargo, los estudios que reportan tasas de infestación de bellota siguen siendo escasos. Después de revisar la literatura publicada, se observa que sólo un estudio ha evaluado el impacto del parasitismo por insectos en bellotas de *Q. candicans*, reportando que hasta 21.6 % de las bellotas producidas por esta especie de roble son infestadas por insectos en un bosque de niebla del estado de Veracruz (Díaz-Fleischer, Hernández-Arellano, Cano-Medina, Cervantes-Alday, & López-Ortega 2010). En comparación con los resultados, se considera que las tasas de infestación por insectos pueden ser aún mayores si las bellotas se almacenan durante periodos prolongados en cobertizos agrícolas.

Hasta 61 % de las bellotas en las que se aplicó la prueba de tetrazolio mostraron embriones teñidos de rojo (Figura 2B), lo que sugiere que eran viables. Las bellotas restantes, utilizadas en este ensayo, no mostraron ninguna reacción a la sal de tetrazolio, posteriormente se observó que la pérdida de viabilidad se debía a otros factores. La proporción promedio entre las bellotas inviables y las viables en la prueba de tetrazolio fue 0.64 (± 0.06 S. E.), y el análisis estadístico indicó que esta relación fue significativamente mayor que cero ($t_{(1,3)} = 9.629$, $P = 0.003$). Aunque estos resultados no son del todo concluyentes, ya que las pruebas de tetrazolio también debieron realizarse antes del almacenamiento; estos hallazgos sugieren que, si las bellotas no están parasitadas por insectos, una cantidad sustancial de bellotas puede conservar su capacidad de germinación después de un año de almacenamiento (Figura 1). Esto contradice un tanto la suposición general de que los encinos blancos tienen semillas muy recalcitrantes, que rápidamente pierden su viabilidad si son almacenadas (Kibinza et al., 2011). En este sentido, es importante destacar que hay un grupo de semillas que está entre las recalcitrantes y las ortodoxas; es decir, el grupo de semillas intermedias (Ellis, Hong, & Roberts, 1990). Se propuso que algunas especies de encinos blancos pertenecen a este grupo, como ocurre con *Q. lyrata* en el sur de Estados Unidos, cuyas bellotas mantienen niveles elevados de viabilidad (95.8 %) durante un año (Bonner & Vozzo, 1987). Por lo tanto, aunque *Q. polymorpha* parece tener menor capacidad para retener la viabilidad en comparación con otras especies de encinos, nuestros resultados permiten proponer que sus bellotas pueden pertenecer a este grupo. A pesar de esta la alta viabilidad detectada con la prueba de tetrazo-

allow suggest that, if acorns are not parasitized by insects, a substantial amount of acorns may retain their germination capability after a year of storing (Figure 1). This somewhat contradicts the general assumption that white oaks have highly recalcitrant seeds that quickly lose their viability if there are stored (Kibinza et al., 2011). On this issue, it is important to highlight that there is a group of seeds that is halfway between recalcitrant and orthodox ones, namely the intermediate seed group (Ellis, Hong, & Roberts, 1990). Some white oak species were proposed to belong to this group, as occurs with *Q. lyrata* in southern Unites States of America, whose acorns retain elevated levels of viability (95.8 %) during one year round (Bonner & Vozzo, 1987). Thus, although *Q. polymorpha* seem to have a lower capacity to retain viability, as compared to other oak species, our results allow proposing that their acorns may belong to this group. Despite this high viability detected with the tetrazolium test, it is important to note that 39 % of those apparently undamaged acorns (they were sunken in the floatability test and showed no holes in their pericarps) were unviable. After halving these acorns, we realized that the loss of viability was due to two factors. On the one hand, the 21 % of the seeds subjected to the tetrazolium test showed no signs of damage, but their embryos were not red-stained (Figures 1 and 2B). This suggests that they lost their physiological capability to germinate because of environmental factors, probably excessive water loss and embryo desiccation (Zavala-Chávez, 2004). On the other hand, 18 % of these acorns showed their cotyledons and embryos infested by fungi (Figures 1 and 2C), which indicates that, besides insects, fungal infestation may also promote acorn losses during the storage. It has been suggested that fungal infestation is closely linked to insect parasitism because fungi penetrate the acorns through the oviposition holes performed by the insects (Csóka & Hirka, 2006). Nevertheless, more studies should be conducted to determine the relative importance of fungi and insects as causes of acorn losses in both, field and storage conditions.

By extrapolating the results described in the previous paragraphs to the total number of acorns that we obtained from farmers (i. e., 28,875), the viability tests (floatability and tetrazolium tests), together with our observational analyses, allow concluding that 82 % of the acorns of *Q. polymorpha* are lost after a year of storing. The main factor contributing to seed losses seems to be parasitic insects, which accounted for 70 % of the acorns (Figure 1). Both fungal infestation and the physiological loss of viability accounted for 6 % of the total acorns each. Therefore, after a year of storing, only 18 % of the acorns seem to be viable (Figure 1).

Germination trials conducted in growth chambers indicated that unstratified acorns had the lowest final germination percentage (16.5 %), while the highest final germination percentage was recorded on acorns that were cold-stratified during 50 days (64.2 %). The final germination percentage for acorns (44.8 %) that were stratified during 20 days was intermediate (Figure 3). These results differ from those

lio, es importante tener en cuenta que 39 % de esas bellotas aparentemente no dañadas (se hundieron en la prueba de flotabilidad y no mostraron agujeros en sus pericarpio) eran inviables. Después de partir las bellotas a la mitad, se observó que la pérdida de viabilidad se debió a dos factores. Por un lado, 21 % de las semillas sometidas a la prueba de tetrazolio no mostró signos de daños, pero sus embriones no estaban manchados de rojo (Figuras 1 y 2B). Esto sugiere que perdieron su capacidad fisiológica para germinar debido a factores ambientales, probablemente pérdida excesiva de agua y desecación del embrión (Zavala-Chávez, 2004). Por otra parte, 18 % de estas bellotas mostró sus cotiledones y embriones infestados por hongos (Figuras 1 y 2c), lo que indica que, además de los insectos, la infestación por hongos también puede promover la pérdida de bellotas durante el almacenamiento. Se ha sugerido que la infestación por hongos está estrechamente vinculada al parasitismo de insectos debido a que los hongos penetran las bellotas a través de los agujeros de oviposición realizados por los insectos (Csóka

of Flores-Cano et al. (2012), which found germination percentages lower than 10 % for *Q. polymorpha* acorns after two weeks of stratification. Therefore, it is possible that the stratification period used by these authors (14 days) was not enough to promote the acorn germination. Our germination trials also indicated that germination rates significantly differed among stratification treatments (Gehan's generalized Wilcoxon Chi-square = 1,029.104, df = 2, $P < 0.001$). Here, pairwise comparisons indicated that unstratified acorns require more time to germinate, while also had lower germination rates, than stratified acorns. Moreover, these analyses also indicated that acorns stratified during 50 days germinated even faster, and showed higher germination rates, than those acorns that were stratified during 20 days (Figure 3). This suggests that cold stratification would help to improve germination of stored acorns. Vogt (1974) studied the germination of *Q. rubra* acorns and found that cold-stratification can biochemically alter, dilute or leach the ABA-like inhibitors

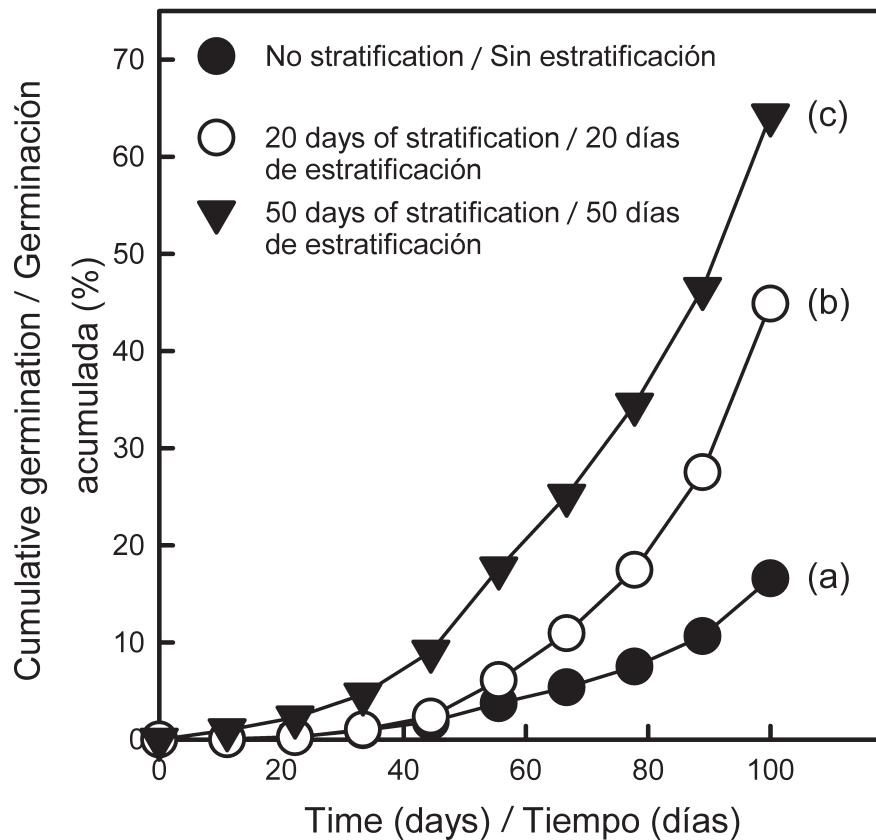


FIGURA 3. Curvas de germinación estimadas por el método de Kaplan-Meier para los tratamientos de estratificación en frío. Las diferentes letras que acompañan a las curvas indican diferencias estadísticamente significativas en las tasas de germinación de bellotas (prueba de Cox-Mantel $P = 0.05$).

FIGURE 3. Germination curves estimated by the Kaplan-Meier's method for the differed cold-stratification treatments. Different letters accompanying the curves indicate statistical differences in acorn germination rates (Cox-Mantel test critical $P = 0.05$).

& Hirka, 2006). Sin embargo, se deben realizar más estudios para determinar la importancia relativa de los hongos y los insectos como las causas de las pérdidas de bellotas tanto en condiciones de campo como en almacenamiento.

Al extrapolar los resultados descritos en los párrafos anteriores al número total de bellotas obtenidas (28,875) de los agricultores, las pruebas de viabilidad (pruebas de tetrazolio y flotabilidad) junto con los análisis observacionales, permiten concluir que 82 % de las bellotas de *Q. polymorpha* se pierden después de un año de almacenamiento. El principal factor que contribuye a la pérdida de semillas parece ser los insectos parásitos, que representaron el 70 % de las bellotas (Figura 1). Tanto la infestación por hongos como la pérdida fisiológica de viabilidad representaron el 6 % del total de las bellotas, cada uno. Por lo tanto, después de un año de almacenamiento, sólo el 18 % de las bellotas parecen ser viables (Figura 1).

Los ensayos de germinación realizados en las cámaras de crecimiento indicaron que las bellotas no estratificadas tuvieron el porcentaje final de germinación más bajo (16.5 %), mientras que el más alto se registró en las bellotas estratificadas en frío durante 50 días (64.2 %). El porcentaje final de germinación de las bellotas (44.8 %) que fueron estratificadas durante 20 días fue intermedio (Figura 3). Estos resultados difieren de los de Flores-Cano et al. (2012), quienes encontraron porcentajes de germinación inferiores al 10 % para las bellotas *Q. polymorpha* después de dos semanas de la estratificación. Por lo tanto, es posible que el periodo de estratificación utilizado por estos autores (14 días) no fuera suficiente para promover la germinación de la bellota. Las pruebas de germinación también indicaron que las tasas de germinación difieren significativamente entre los tratamientos de estratificación (Prueba Chi cuadrada de Wilcoxon generalizada de Gehan = 1,029.104, df = 2, $P < 0.001$). En este caso, las comparaciones de pares indicaron que las bellotas no estratificadas requieren más tiempo para germinar, mientras que también tenían tasas de germinación más bajas que las bellotas estratificadas. Asimismo, estos análisis indicaron que las bellotas estratificadas durante 50 días germinaban aún más rápido y mostraron tasas de germinación más altas que las bellotas que fueron estratificadas durante 20 días (Figura 3). Esto sugiere que la estratificación en frío ayudaría a mejorar la germinación de las bellotas almacenadas. Vogt (1974) estudió la germinación de las bellotas *Q. rubra* y encontró que la estratificación en frío puede alterar bioquímicamente, diluir o lixiviar los inhibidores como ABA contenidos en el embrión. Además, este autor indica que el tratamiento también puede promover la germinación mediante el aumento de los niveles de giberelinas en el embrión por antagonizar los efectos de los inhibidores como ABA. Por lo tanto, es factible pensar que se produjeron procesos similares en las semillas *Q. polymorpha* después de que se aplicó la estratificación. Sin embargo, los resultados obtenidos también indican que la germinación de *Q. polymorpha* puede incluso aumentar al extender los periodos de estra-

contained in the embryo. Further, this author indicated that this treatment may also promote germination by increasing the levels of gibberellins in the embryo by antagonizing the effects of the ABA-like inhibitors. Therefore, it is feasible to think that similar processes occurred in *Q. polymorpha* seeds after stratification was applied. However, our findings also indicate that germination of *Q. polymorpha* may even increase by extending the cold-stratification periods, and this concurs with that observed in other oak species (Bonner & Vozzo, 1987; Díaz-Pontones & Reyes-Jaramillo, 2009; Pritchard, 1991; Willan, 1991). Nevertheless, in United States of America, Peterson (1983) reported that the germination capability of other oak species may decrease if they are stored at low temperatures for more than six months. Thus, more studies are required to assess the effects of long term cold-stratification on acorns of Mexican oak species.

CONCLUSIONS

This study indicates that more than 80 % of the acorns of *Q. polymorpha* may be lost during their storage, and that the main factor promoting acorn losses are parasitic insects. However, it is important to note that insect infestation may not necessarily occur during the storing. In turn, acorns may be infested by larvae of parasitic insects when they are collected, but the collectors did not realize that these acorns are infested because damage cannot be visually assessed. Nevertheless, our results also indicate that up to 60 % of the acorns could remain viable by a round year if insect parasitism is prevented. Semi-persistent germplasm banks (i. e., 1-3 years of storage) can be then generated if storage methods avoid the development of insects that have already parasitized the acorns collected in the field. This aim could be perhaps reached by storing recently collected acorns at low temperatures (4 to 5 °C), as suggested for oaks from other countries or by applying insecticides prior to storing these seeds. Later, stratification methods should be used to trigger seed germination.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to Grupo de Mujeres de la Comunidad de Monte Caldera (San Luis Potosí-México) and Mónica Martínez Zavala (PRONATURA) for donate the acorns, and Coraquetzali Magdaleno López for their help in mounting the germination trials. Also thank to Andrea Pavlick for revising the English version of the manuscript. This study was founded by project SEMARNAT-2006-1-23818 to Joel Flores. Claudia González-Salvatierra thanks the postdoctoral grant CONACYT-172810.

tificación en frío, y esto coincide con lo observado en otras especies de encinos (Bonner & Vozzo, 1987; Díaz-Pontones & Reyes-Jaramillo, 2009; Pritchard, 1991; Willan, 1991). Sin embargo, en Estados Unidos, Peterson (1983) informó que la capacidad de germinación de otras especies de encinos puede disminuir si se almacenan a bajas temperaturas durante más de seis meses. Por lo tanto, se necesitan más estudios a largo plazo para evaluar los efectos de la estratificación en frío en bellotas con bellotas de encinos mexicanos.

CONCLUSIONES

Este estudio indica que más del 80 % de las bellotas de *Q. polymorpha* se puede perder durante su almacenamiento y que el factor principal que promueve la pérdida de bellota son los insectos parásitos. Sin embargo, es importante señalar que la infestación de insectos no necesariamente puede ocurrir durante el almacenamiento. En cambio, las bellotas pueden estar infestadas por larvas de insectos parásitos cuando se recogen, sin que los colectores se percaten de que las bellotas están infestadas porque el daño no puede ser evaluado visualmente. Los resultados también indican que hasta 60 % de las bellotas podrían permanecer viables por un año si se previene el parasitismo de insectos. Se pueden generar los bancos de germoplasma semi-persistentes (es decir, 1-3 años de almacenamiento) si los métodos de almacenamiento evitan el desarrollo de insectos que ya han parasitado las bellotas recolectadas en el campo. Este objetivo se podría alcanzar al almacenar las bellotas recolectadas recientemente a bajas temperaturas (4-5 °C), como se sugiere para los encinos de otros países, o mediante la aplicación de insecticidas antes de guardar las semillas. Posteriormente, se deberán utilizar para métodos de estratificación y desencadenar la germinación de las semillas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Grupo de Mujeres de la Comunidad de Monte Caldera (San Luis Potosí, México) y a Mónica Martínez Zavala (PRONATURA) por donar las bellotas y a Coraquetzali Magdalena López por su ayuda en el montaje de los ensayos de germinación. También se agradece a Andrea Pavlick por revisar la versión en inglés del manuscrito. Este estudio fue fundado para el proyecto SEMARNAT-2006-1-23818 para Joel Flores. Claudia González-Salvatierra quienes agradecen la beca postdoctoral CONACYT-172810.

REFERENCIAS

- Arriaga, V., Cervantes, V., & Vargas-Mena, A. (1994). *Manual de reforestación con especies nativas: Colecta y preservación de semillas, propagación y manejo de plantas*. México, D. F.: Universidad Nacional Autónoma de México-Instituto Nacional de Ecología.
- Badano, E. I. (2011). Conservation and restoration of Mexican forests in the global change scenario: A shared responsibility with multiple benefits. *Madera y Bosques*, 17, 7–18. <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3945093>
- Black, M., Bewley, J. D., & Halmer, P. (2006). *The encyclopedia of seeds. Science, technology and uses*. Wallingford: CAB International.
- Bonner, F. T. (1996). Responses to drying of recalcitrant seeds of *Quercus nigra* L. *Annals of Botany*, 78(2), 181–187. doi: 10.1006/anbo.1996.0111
- Bonner, F. T., & Vozzo, J. A. (1987). *Seed biology and technology of Quercus. Genetic and technology reproduction*. SO-66. New Orleans, USA: Department of Agriculture, Forest Service.
- Branco, M., Branco, C., Merouani, H., & Almeida, M. H. (2002). Germination success, survival and seedling vigour of *Quercus suber* acorns in relation to insect damage. *Forest Ecology and Management*, 166(1), 159–164. doi: 10.1016/S0378-1127(01)00669-7
- Castro-Colina, L., Martínez-Ramos, M., Sánchez-Coronado, M. E., Huante, P., Mendoza, A., & Orozco-Segovia, A. (2012). Effect of hydropriming and acclimation treatments on *Quercus rugosa* acorns and seedlings. *European Journal of Forest Research*, 131(3), 747–756. doi: 10.1007/s10342-011-0548-7
- Cibrián-Tovar, D., Mendez-Montiel, J. T., Campos-Bolaños, R., Yates III, H. O., & Flores-Lara, J. (1995). *Insectos forestales de México*. México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Csóka, G., & Hirka, A. (2006). Direct effects of carpophagous insects on the germination ability and early abscission of oak acorns. *Acta Silvatica and Lignaria Hungarica*, 2, 57–68. http://aslh.nyme.hu/fileadmin/dokumentumok/fmk/acta_silvatica/cikkek/Vol02-2006/csoka-hirka.pdf
- Díaz-Fleischer, F., Hernández-Arellano, V., Cano-Medina, T., Cervantes-Alday, R., & López-Ortega, M. (2010). Investigación preliminar de la depredación de semillas en la germinación de las bellotas de *Quercus candicans* Née. *Agrociencia*, 44(1), 83–92. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v44n1/v44n1a8.pdf>
- 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. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62111396008>
- Ellis, R. H., Hong, T. D., & Roberts, E. H. (1990). An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. *Journal of Experimental Botany*, 41(9), 1167–1174. doi: 10.1093/jxb/41.9.1167
- Flores-Cano, J., Badano, E. I., & Flores, J. (2012). Effects of burial depth on seed germination and seedling emergence of Mexican oaks: A glasshouse experiment. *Archives of Biological Sciences*, 64, 1543–1554. doi: 10.2298/ABS1204543C
- García-Coll, I., Martínez-Otero, A., Ramírez-Soto, A., Niño-Cruz, A., Juan-Rivas, A., & Domínguez-Barrada, L. (2004). La relación agua-bosque: Delimitación de zonas prioritarias para pago de servicios ambientales hidrológicos en la Cuenca del Río Gavilanes, Coatepec, Veracruz. In H. Cotler (Ed.), *El manejo integral de cuencas en México: Estudios y reflexiones para orientar la política ambiental* (pp. 99–114). México, D. F.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales/Instituto Nacional de Ecología.
- Garwood, N. C., & Lighton, J. R. B. (1990). Physiological ecology of seed respiration in some tropical species. *New Phytologist*, 115(3), 549–558. doi: 10.1111/j.1469-8137.1990.tb00483.x

- Gómez, J. M. (2004). Bigger is not always better: Conflicting selective pressures on seed size in *Quercus ilex*. *Evolution* 58, 71–80. doi: 10.1111/j.0014-3820.2004.tb01574.x
- Gosling, P. G. (1989). The effect of drying *Quercus robur* acorns to different moisture contents, followed by storage, either with or without imbibitions. *Forestry*, 62(1), 41–50. doi: 10.1093/forestry/62.1.41
- Guthke, J., & Spethmann, W. (1993). Physiological and pathological aspects of long-term storage of acorns. *Annals of Forest Science*, 50, 384s–387s. doi: 10.1051/forest:19930742
- Kaplan, E. L., & Meier, P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53, 457–481. doi: 10.1080/01621459.1958.10501452
- Kibinza, S., Bazin, J., Bailly, C., Farrant, J. M., Corbineau, F., & El-Maarouf-Bouteau, H. (2011). Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. *Plant Science*, 181(3), 309–315. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.06.003
- Kolotelo, D., Steenis, V., Peterson, M., Bennett, R., Trotter, D., & Dennis, J. (2001). *Seed handling guidebook*. British Columbia, Canada: Ministry of Forest.
- Lee, E. T. (1980). *Statistical methods for survival data analysis*. Belmont, CA, USA: Lifetime Learning Publications.
- Lee, E. T., Desu, M. M., & Gehan, E. A. (1975). A Monte Carlo study of the power of some two-sample tests. *Biometrika*, 62(2), 425–432. doi: 10.1093/biomet/62.2.425
- Martínez-Pérez, G., Orozco-Segovia, A., & Martorell, C. (2006). Efectividad de algunos tratamientos pre-germinativos para ocho especies leñosas de la Mixteca Alta Oaxaqueña con características relevantes para la restauración. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 79, 9–20. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57707902>
- Návar-Cháidez, J. J. (2010). Los bosques templados del estado de Nuevo León: El manejo sustentable para bienes y servicios ambientales. *Madera y Bosques*, 16(1), 51–69. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-04712010000100004&lng=es&tlng=es .
- Nixon, K. C. (1993a). Infrageneric classification of *Quercus* (Fagaceae) and typification of sectional names. *Annals of Forest Science*, 50(1), 25s–34s. doi: 10.1051/forest:19930701
- Nixon, K. C. (1993b). The genus *Quercus* in México. In T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, & J. Fa (Eds.), *Biological diversity of Mexico: Origins and distribution* (pp. 447–548). New York, USA: Oxford University Press.
- Pardos, J. A. (2000). *Fisiología vegetal aplicada a especies forestales*. Madrid, España: Fundación Conde del Valle de Salazar.
- Peterson, J. K. (1983). Mechanisms involved in delayed germination of *Quercus nigra* L. seeds. *Annals of Botany*, 52(1), 81–92.
- Pritchard, H. W. (1991). Water potential and embryonic axis viability in recalcitrant seeds of *Quercus rubra*. *Annals of Botany*, 67(1), 43–49. http://download.bion.com.cn/upload/month_1001/20100126_9191fef6ec321e7a837ac2K90ladDAWF.attach.pdf
- Sáenz-Romero, C. (2003). Alternatives for improving reforestation in México. In Food and Agriculture Organization of the United Nations (Ed.), *XII World Forestry Congress*. Rome, Italy. Obtenido de <http://www.fao.org/DOCREP/ARTICLE/WFC/XII/0381-B4.HTM>.
- Sáenz-Romero, C., & Lindig-Cisneros, R. (2004). Evaluación y propuestas para el programa de reforestación en Michoacán, México. *Ciencia Nicolaita*, 37, 107–122. http://www.cic.umich.mx/documento/ciencia_nicolaita/2004/37/CN37-107.pdf
- Simpson, B. J., Karges, J. P., & Carpenter, J. M. (1992). *Quercus polymorpha* (Fagaceae) new to Texas and The United States. *Sida*, 15(1), 153.
- Vázquez-Yanes, C., & Orozco-Segovia, A. (1990). Seed dormancy in the tropical rain forest. In K. S. Bawa, & M. Hadley (Eds.), *Reproductive biology of tropical plants* (pp. 247–590). Carnforth, UK: UNESCO-Parthenon Publishing.
- Vogt, A. R. (1974). Physiological importance of changes in endogenous hormones during red oak acorn stratification. *Forest Science*, 20(2), 187–191.
- Willan, R. L. (1991). *Guía para la manipulación de semillas forestales-Estudio FAO Montes 20/2*. Roma, Italy: Food and Agriculture Organization.
- Zavala-Chávez, F. (2001). *Introducción a la ecología de la regeneración natural de encinos*. México: Universidad Autónoma Chapingo.
- 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. <http://www.redalyc.org/pdf/104/10411207.pdf>
- Zavala-Chávez, F., & García, E. (1996). *Frutas y semillas de encinos*. México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Zar, J. H. (2010). *Biostatistical analysis*. New Jersey, USA: Prentice Hall.