



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“EFECTO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO EN LA
GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE *Quercus laurina*”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. EXP. TANIA CORAL VIRUEL RAMIREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. CLARA LEONOR TINOCO OJANGUREN

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNIDAD HERMOSILLO, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. CÉSAR MATEO FLORES ORTIZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX., SEPTIEMBRE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos institucionales

Al programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo con la beca de manutención (N°479395)

Al proyecto financiado por Conacyt: Problemas Nacionales 2025-1-218, "Estrategia de rehabilitación ecológica empleando biodiversidad nativa, en bosque templado afectado por actividad minera pétrea y agropecuaria"

Al comité Tutor que asesoró el desarrollo de esta tesis y estuvo formado por: Dra. María del Rocío Cruz Ortega, Dra. Clara Leonor Tinoco Ojanguren y Dr. César Mateo Flores Ortiz.

Agradecimientos personales

A mi madre: Elba Ramirez Bibiano, por guiarme con sus sabios consejos, por ser el apoyo y la fortaleza en aquellos momentos de dificultad, por confiar y creer en mi todos los días.

A mis hermanos: Oscar y Yovani Ramirez, por ser los principales promotores de nuestros sueños, por acompañarme en el trancurso de mi vida y por llenarme de amor, cariño y alegría día tras día.

A mi novio: Marco, por el apoyo incondicional en mi vida, que con su amor y respaldo, me ayuda a alcanzar mis metas.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Violeta, Areli, Verónica, Joselín, Agueda, Morayna, Gabriel, Jonathan y Veronica Reyes, quienes me permitieron enriquecer diariamente ésta incomparable experiencia.

Agradezco a:

Jurado de examen

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Dra. Margarita Collazo Ortega

Dr. Cesar Alejandro Ordoñez Salanueva

Dr. Ulises Yunuén Rosas López

Facultad de Estudios Superiores, Iztacala, UNAM

Biol. Luis Bardo Hernández Portilla por su asesoría en la técnica de cromatografía de gases - acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Biol. Rafael Quintanar Zúñiga por su asesoría en la técnica de Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).

Instituto de Ecología, UNAM

Dra. Alma Delfina Lucía Orozco Segovia y la M. en C. María Esther Sánchez Coronado por su apoyo en la técnica de Rayos X, aplicada al análisis de semillas.

Instituto de Biología, UNAM

Dra. Estela Sandoval Zapotitla por su asesoría en las técnicas histológicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal.

Facultad de Ciencias, UNAM

Dra. Saraí Montes Recinas por su apoyo en la localización de lugares de recolecta.

Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán por su apoyo en las técnicas histológicas.

Dra. Susana Valencia Avalos por la identificación del ejemplar *Quercus laurina*.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Servicios Ecosistémicos	6
1.2 Grado de riesgo.....	9
1.3 Recalcitrancia de las bellotas de encino	9
1.4 Conservación y factores que influyen en el deterioro de las bellotas por almacenamiento	12
1.5 Sistemas de defensa antioxidante.....	18
1.6 Tipos de estrés en plantas	19
1.7 Estrés hídrico en plántulas	21
1.8 Efecto del estrés hídrico en el crecimiento de plántulas	22
1.9 Perturbaciones ambientales en los bosques de encinos.....	24
2. PREGUNTAS A RESPONDER	26
3. OBJETIVO GENERAL	26
3.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
4. METODOLOGÍA.....	27
4.1 Material biológico.....	27
4.2 Pruebas de viabilidad	27
4.3 Condiciones de almacenamiento controlado	28
4.4 Prueba de germinación	28
4.5 Análisis microestructural por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).....	29
4.6 Perfil de ácidos grasos	29
4.7 Estrés oxidativo y actividad enzimática.....	31
4.8 Estrés hídrico en plántulas de <i>Quercus laurina</i>	33

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
6. RESULTADOS	38
6.1 Obtención de bellotas viables.....	38
6.2 Porcentaje de germinación de las bellotas durante el almacenamiento a 4 °C	39
6.3 Microestructura del eje embrionario de la bellota durante el almacenamiento	39
6.4 Patrón de la lipoperoxidación de los ácidos grasos insaturados	44
6.5 La actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, APX y GR	47
6.6 El estrés hídrico y el crecimiento de las plántulas de <i>Quercus laurina</i>	51
7. DISCUSIÓN.....	57
7.1 El número de bellotas viables de <i>Q. laurina</i> disminuye por la infestación de insectos previo al almacenamiento.....	57
7.2 La característica de recalcitrancia en la especie de <i>Q. laurina</i> puede contribuir a la disminución de la germinación.....	58
7.3 El almacenamiento a 4° C de las bellotas de <i>Q. laurina</i> no preservó la germinación ni la viabilidad	59
7.4 Efecto del estrés hídrico en plántulas de <i>Q. laurina</i>	64
8. CONCLUSIONES	68
9. PERSPECTIVAS	67
10. ANEXO 1.....	68
11. REFERENCIAS.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de encinos a nivel mundial. _____	4
Figura 2. Distribución geográfica de las secciones de encinos en México. _____	5
Figura 3. Estructura externa e interna de bellotas de <i>Quercus laurina</i> . _____	6
Figura 4. Producción de madera por especie arbórea a nivel nacional. _____	8
Figura 5. Secuencia de reacciones que tienen lugar durante la lipoperoxidación de los ácidos grasos insaturados mediada por radicales libres. _____	14
Figura 6. Representación esquemática de la lipoperoxidación del ácido linoleico, inducido por los radicales hidroxilos. _____	15
Figura 7. Curso temporal de los acontecimientos físicos y metabólicos que ocurren en la germinación (Fase I y II) y el crecimiento temprano de las plántulas (Fase III) y la generación de ERO. _____	17
Figura 8. Estructura del fruto de encino. _____	28
Figura 9. Esquema que representa la distribución de las hojas seleccionadas para el análisis de conductancia estomática en las plántulas de <i>Q. laurina</i> . _____	33
Figura 10. Periodo de crecimiento y de tratamiento con el tiempo inicial (t_0), y tiempo final (t_1), N=8 de cosecha para evaluar el análisis de crecimiento clásico. _____	33
Figura 11. Características de las bolsas para la siembra de bellotas. _____	34
Figura 12. Asignación de las plántulas a los grupos de tratamiento en un diseño aleatorio para la segunda cosecha. _____	35
Figura 13. (A) Prueba de viabilidad por el método de flotación. (B) Bellotas perforadas por curculiónidos (<i>Curculionidae</i>). _____	37
Figura 14. Fotografías digitales de la prueba de viabilidad por Rayos X. _____	38

- Figura 15.** Prueba de germinación en bellotas de encino (*Quercus laurina*) almacenadas durante 5 meses a 4 °C. _____ **39**
- Figura 16.** Micrografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) del eje embrionario de semillas de *Q. laurina* a diferentes tiempos de almacenamiento a 4 °C. _____ **43**
- Figura 17.** Cromatograma de los ácidos grasos presentes en el extracto crudo del tejido de las bellotas de *Q. laurina*. _____ **44**
- Figura 18.** Diagrama de cajas y bigotes mostrando el contenido de ácidos grasos saturados. _____ **45**
- Figura 19.** Correlación del contenido de ácidos grasos insaturados y el porcentaje de germinación de bellotas de *Q. laurina*, almacenadas durante 5 meses a 4 °C. **46**
- Figura 20.** Cambios en las actividades Superóxido dismutasa (SOD) (A), Catalasa (CAT) (B), Ascorbato peroxidasa (APX) (C) y Glutación reductasa (GR) (D) en ejes embrionarios de bellotas de *Q. laurina*, almacenadas durante 5 meses a 4 °C. _ **47**
- Figura 21.** Cambios en las actividades y coeficiente de correlación de las enzimas antioxidantes: Superóxido dismutasa (SOD) (A); Catalasa (CAT) (B); Ascorbato peroxidasa (APX) (C) y Glutación reductasa (GR) (D), con respecto al porcentaje de germinación en ejes embrionarios de bellotas de *Q. laurina*, almacenadas durante 5 meses a 4 °C. _____ **49**
- Figura 22.** Conductancia estomática (*gs*) de las hojas de plántulas de *Q. laurina* de 7 meses, en invernadero sometidas a estrés hídrico durante 63 días. _____ **51**
- Figura 23.** Biomasa seca total de plántulas de *Q. laurina* de 7 meses de edad, bajo diferentes condiciones de estrés hídrico. _____ **52**
- Figura 24.** Tasa absoluta de crecimiento (AGR) (A) y Tasa relativa de crecimiento (RGR) (B) de plántulas de *Q. laurina* de 7 meses de edad, bajo diferentes condiciones de estrés hídrico. _____ **53**

Figura 25. Componentes de la tasa relativa de crecimiento de plántulas de siete meses de edad de *Q. laurina*, en condiciones de invernadero, bajo diferentes condiciones de estrés hídrico. _____ **54**

Figura 26. Asignación de biomasa a raíz (RWR), tallo (SWR), hojas (LWR) de plántulas de siete meses de edad de *Q. laurina*, en condiciones de invernadero, bajo diferentes condiciones de estrés hídrico. _____ **55**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros del análisis de crecimiento clásico (RGR). _____ **36**

ABREVIATURAS

APX = Ascorbato peroxidasa

AGR = Absolute Growth Rate (Tasa de crecimiento absoluta)

AsA =Ascorbato

Abs = Absorbancia

ap = Ápice

bc = Borde de la cubierta

BSA = Albumina de Suero Bovino

BF3 = Trifluoruro de Boro

C =Citoplasma

C₆H₁₄ = Hexano

CAT = Catalasa

CHCl₃ = Cloroformo

CH₃OH = Metanol

C₁₇H₃₄O₂ = Ácido heptadecanoico

CO₂ = Dióxido de carbono

C = Curculionido

Ca = Cámara de aire

Cb =Contorno de la bellota

Ct = Cotiledones

Cz = Cicatriz

CL = Cuerpos Lipídicos

CP= Cuerpos Proteicos

C₁₆H₃₂O₂ = Ácido hexadecanoico (Ácido palmítico)

CH₃(CH₂)₁₆COOH=Ácido octadecanoico (Ácido esteárico)

C₁₈H₃₂O₂ = Ácido 9, 12 octadecanoico (Ácido linoleico)

C₁₈H₃₄O₂ = Ácido 9, octadecanoico (Ácido oleico)

DB-1 = Dimetilpolisiloxano

ERO =Especies Reactivas de Oxígeno

EDTA = Ácido Etilen Diaminotetra Acético

EI = Impacto Electrónico

EE = Eje Embrionario completo

EL = Corte longitudinal del eje embrionario

ev = Electrovols

ε= Coeficiente de Extinción

FAA = Formaldehído – Ácido Acético glacial y Alcohol

GSSG =Glutación oxidado

GSH = Glutación Reducido

GR = Glutación Reductasa

gs = Conductancia estomática

GC-MS = Gas Chromatography coupled to Mass Spectrophotometry (Cromatografía de Gases acoplada a Espectrofotometría de Masas)

H.R. = Humedad Relativa

HV = High Vacuum (Alto vacío)

HPLC = High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía de líquidos de Alta Eficiencia)

H₂O₂ = Peróxido de Hidrógeno

Kv = kilovoltio

Kvp = Kilovatios de Potencia

LAR = Leaf Area Ratio (Tasa de Área Foliar)

LWR = Leaf Weight Ratio (Asignación de biomasa-hoja)

LA₁ = Área foliar total inicial

LA₂ = Área foliar total final

InLA₁ = Logaritmo natural del área foliar inicial

In LA₂ = Logaritmo natural de área foliar final

LW = Peso seco de las hojas

LW₁ = Peso seco total inicial de las hojas

LW₂ = Peso seco total final de las hojas

MEB = Microscopía Electrónica de Barrido

msnm = metros sobre el nivel del mar

m/z = Masa/carga

n = Hojas jóvenes

NaCl = Cloruro de Sodio

Na₂EDTA = Ácido Etilen Diamina Tetra Acético Disódico

NIST = National Institute of Standards and Technology (Instituto Nacional de Estándar y Tecnología)

NADPH = Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleótido

NaOCl = Hipoclorito de sodio

NAR = Net Assimilation Rate (Tasa de **Asimilación Neta**)

NMWL = Nominal Molecular Weight Limit (Límite de Peso Molecular Nominal)

PC = Pared Celular

PVPP = Polivinilpolipirrolidona

ROS = Reactive Oxygen Species
(Especies Reactivas de Oxígeno)

R/S=Root/ShootAllometry
(**Coefficiente Alométrico**)

RGR = Relative Growth Rate (Tasa de crecimiento relativo)

RWR = Root Weight Ratio (Asignación de biomasa- Raíz)

RW = Peso seco de la raíz

Rw₁ = Peso seco inicial de la raíz

Rw₂ = Peso seco final de la raíz

rpm = Revoluciones por minuto

r=Coeficiente de Correlación

RT = Time Retention (Tiempo de Retención)

SOD = Superóxido Dismutasa

SE = Superficie Externa del eje embrionario

SLA = Specific Leaf Area (Área Foliar Específica)

SWR = Stem Weight Ratio (Proporción de Peso en Tallo)

SW = Peso seco del tallo

Sw₁ = Peso seco inicial del tallo

Sw₂ = Peso seco final del tallo

s = Hojas seleccionadas

T₀ = Cosecha del tiempo inicial

T₁= Cosecha del tiempo final

V= Hojas maduras

W₁= Peso seco total inicial de las plántulas

W₂= Peso seco total final de las plántulas

WD = (Distance from Detector to Sample) Distancia del detector a la muestra

RESUMEN

México es centro de diversidad de los encinos, ya que cuenta con 161 especies. La intensa deforestación por las actividades humanas, por ejemplo, minería pétreo y producción de madera, ha puesto en riesgo a muchas especies de encinos. Por lo tanto, para su conservación y proyectos de restauración, es importante el estudio de las primeras fases del ciclo de vida de estas especies, desde la germinación hasta el estadio de plántula. La conservación de semillas es un reto, dado que son recalcitrantes. En este trabajo se evaluó el estrés oxidativo en bellotas almacenadas a 4 °C y el efecto del estrés hídrico en el crecimiento de plántulas de *Quercus laurina*.

Durante 5 meses de almacenamiento se realizaron pruebas de germinación en bellotas de *Q. laurina* para determinar su viabilidad, en una cámara de crecimiento y oscuridad a 27 °C. El estrés oxidativo se evaluó analizando la lipoperoxidación ocasionada por las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y la actividad de las enzimas: Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) , Ascorbato peroxidasa (APX) y Glutación reductasa (GR), y un análisis microestructural en ejes embrionarios por microscopía electrónica de barrido. El efecto de un estrés hídrico (moderado y severo), se evaluó en plántulas de 7 meses, midiendo la conductancia estomática (*gs*) y realizando un análisis de crecimiento clásico durante 63 días.

El porcentaje de germinación de *Q. laurina* disminuyó drásticamente (40%) después de tres meses de almacenamiento a 4 °C. Al mismo tiempo se observó una disminución significativa de la actividad de las enzimas antioxidantes, así como un aumento en lipoperoxidación y un daño microestructural en los ejes embrionarios.

El análisis de crecimiento mostró que las tasas de crecimiento absoluta (AGR), relativa (RGR) y la *gs* disminuyeron significativamente en las plántulas de encino sometidas a un estrés hídrico moderado y severo. Los resultados sugieren que las bellotas de *Q. laurina* fueron deterioradas rápidamente por el efecto del almacenamiento a 4 °C causado por un deficiente sistema antioxidante. Asimismo, las plántulas de encino no mostraron mecanismos que les permitiera minimizar el impacto del estrés hídrico en condiciones de invernadero.

ABSTRACT

México is a center of oak diversity because it has 161 species. The intensive deforestation by human activities, for example, stone mining and agriculture, has put many oak species at risk. Therefore, for their conservation and restoration projects it is important to study the early phases of their life cycle, from germination to seedling establishment. In this work, we evaluated oxidative stress in acorns stored at 4 °C and the effect of water stress on the growth of *Quercus laurina* seedlings.

During 5 months of storage, germination tests were performed on acorns of *Q. laurina* to determine its viability, in a growth chamber and darkness at 27 °C. Oxidative stress was evaluated analyzing the lipoperoxidation caused by Reactive Oxygen Species (ROS) and the activity of the enzymes: Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Ascorbate peroxidase (APX) and Glutathione reductase (GR), and a microstructural analysis in embryonic axes by scanning electron microscopy. The effect of water stress (moderate and severe), was evaluated in 7-months-old seedlings, measuring stomatal conductance (*gs*) and performing a classic growth analysis for 63 days.

The germination percentage of *Q. laurina* decreased dramatically (40%) after three months of storage at 4 °C. At the same time, a significant decrease in the activity of antioxidant enzymes was observed, an increase in lipoperoxidation and a microstructural damage in the embryonic axes as well.

Growth analysis showed that the absolute growth rate (AGR), the relative growth rate (RGR) and the *gs* decreased significantly in oak seedlings subjected to moderate and severe water stress.

The results suggest that the acorns of *Q. laurina* were rapidly deteriorated by the effect of storage at 4 °C with a deficient antioxidant system. Likewise, oak seedlings do not present mechanisms that allow them to minimize the impact of water stress in greenhouse conditions.

1. INTRODUCCIÓN

El Bosque Mesófilo de Montaña se encuentra distribuido ampliamente en las regiones montañosas y húmedas de México, abarcando un área de entre el 0.5 y 7% del territorio nacional (Valencia-A. y Gual-Díaz, 2014). El clima de estas regiones presenta temperaturas anuales promedio de 12 a 23 °C, pero en invierno se pueden alcanzar temperaturas de 0 °C, con una precipitación anual de 600-1000 mm (CONABIO, 2010). Por otro lado, se ha reportado que este tipo de bosques es el más amenazado a nivel mundial y nacional, la mitad de la cobertura de bosque mesófilo de montaña ha sido transformado, ha sufrido degradación y pérdida de hábitat. Además, se ha considerado por CONABIO (2010) y reportado por Valencia-A. y Gual-Díaz (2014), que este tipo de ecosistema es el más amenazado de México debido a la alta deforestación a nivel nacional, lo que hace imperante conocer la distribución y composición de sus elementos arbóreos, dentro de los cuales se encuentran los robles o encinos que pertenecen a la Familia Fagaceae. Se ha reportado que los encinos presentan una gran diversidad y son los más importantes y distintivos de estos bosques (Valencia-A., 2004). Esta familia se compone de seis a nueve géneros y de 600 a 900 especies de árboles (Arizaga et al., 2009). Uno de los géneros más representativos es *Quercus* que se divide en dos subgéneros: *Quercus* y *Cyclobalanopsis*; el subgénero *Quercus* se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, debido a que se localiza en bosques mesófilos de montaña (regiones templadas) y subtropicales del hemisferio norte, Nororiente de África, Sureste de Asia y América (desde Canadá hasta Colombia, incluyendo Cuba) (Arizaga et al., 2009). Además, se considera que tiene dos centros de diversificación muy importantes: el primero en el Sureste de Asia que cuenta con 125 especies y el segundo en América con 250 especies (Fig. 1).

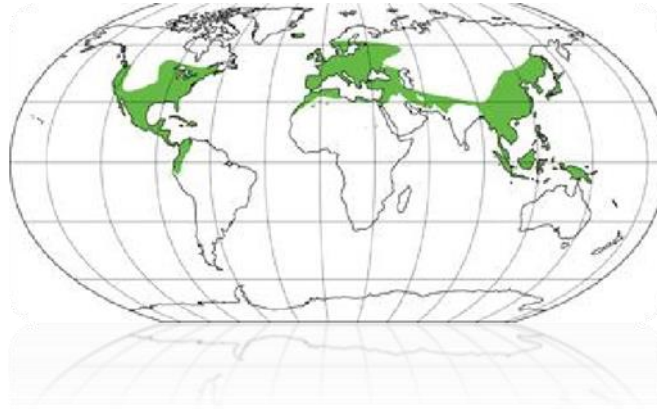


Figura 1. Distribución geográfica de encinos a nivel mundial (Gil-Pelegrin et al., 2017).

Este último centro de diversificación se encuentra en las zonas montañosas de la República Mexicana que es el país con la mayor representación de este taxa, ya que contiene una amplia riqueza de encinos (Valencia-A., 2010). Se distribuye ampliamente en la Sierra Madre Oriental, Sierra Madre Occidental, Sierra Madre del Sur, Sierra Madre de Oaxaca, Sierra Madre de Chiapas, Montañas del Norte de Chiapas, Sierra de Juárez, Sierra de San Pedro Mártir, Sierra de San Lorenzo y el Eje Neovolcánico (De La Paz Pérez-Olvera y Dávalos-Sotelo, 2008). Este último abarca parte de los estados de Nayarit, Jalisco, Estado de México, Hidalgo, Morelos, Tlaxcala, Ciudad de México; pero el mayor número de especies que se distribuyen dentro del Eje Neovolcánico se localizan en los estados de Michoacán, Guanajuato, Querétaro, Puebla y Veracruz en altitudes de 1350 a 2700 msnm (metros sobre el nivel del mar) (De La Paz Pérez-Olvera y Dávalos-Sotelo, 2008), que actualmente es la región con mayor deforestación (Romero-Rangel et al., 2015).

Se han caracterizado 161 especies de estos árboles en México, las cuales se ubican en tres secciones: 81 especies pertenecen a la sección *Quercus* (encinos blancos), 76 especies a *Lobatae* (encinos rojos) y 4 especies de *Protobalanus*, encinos de copa dorada o intermedios (Fig. 2) (Valencia-A., 2004). Las dos primeras secciones son las que presentan la mayor diversidad y distribución, mientras que la última tiene una distribución restringida al noroeste de México y suroeste de Estados Unidos de Norteamérica (Manos et al., 2001; Zavala-Chávez, 2003). De estas 161

especies se han identificado que 109 son endémicas (Santa Cruz-García y Espejel-Rodríguez, 2004).

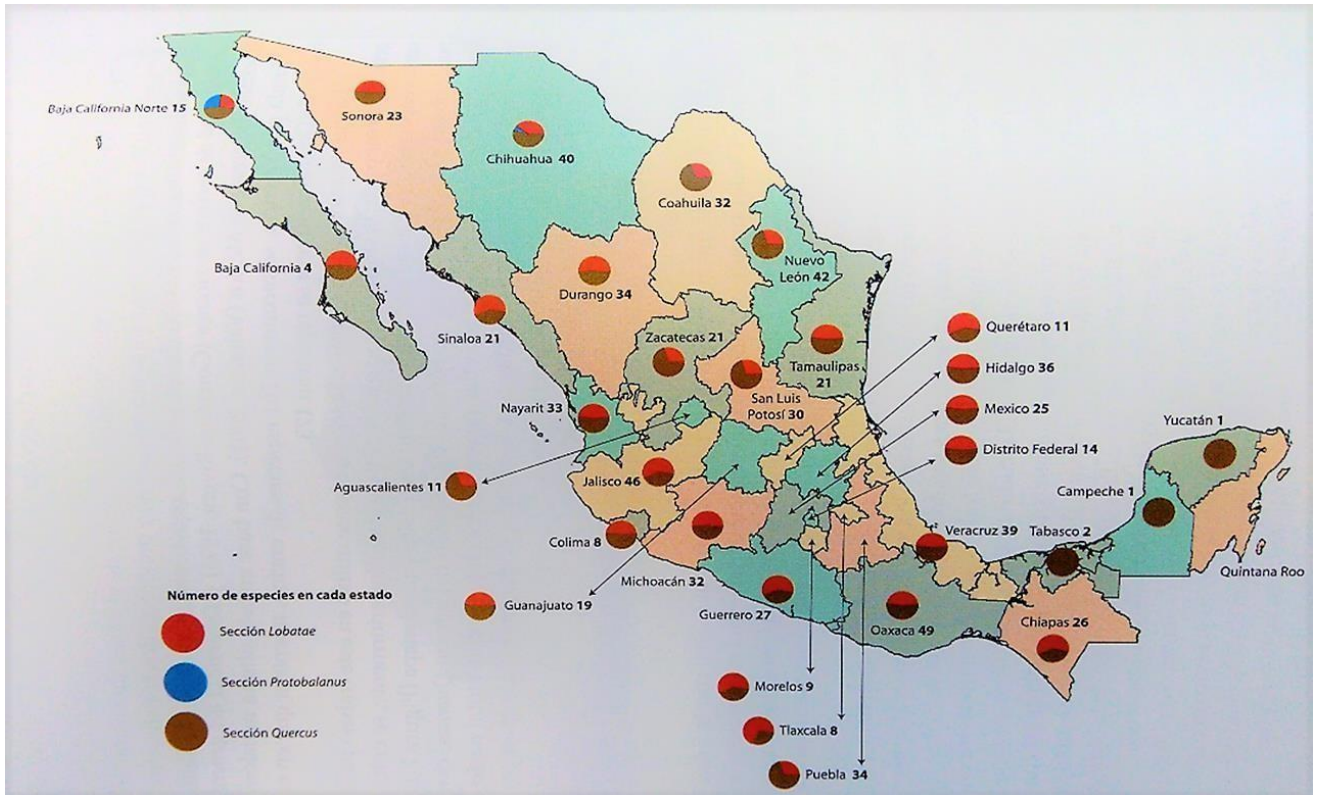


Figura 2. Distribución geográfica de las secciones de encinos en México (Romero-Rangel et al., 2015).

Dentro de la sección Lobatae se encuentra *Quercus laurina* o encino de hoja delgada. Esta especie se ha caracterizado como un árbol que mide de 10 a 30 m de altura, tronco de 50 cm o más de diámetro, con amentos masculinos que miden de 3.5 a 8.5 cm de largo, y amentos femeninos que alcanzan hasta 15 mm de largo. Se puede encontrar a una altitud de 1600 – 3000 msnm en el occidente, centro, sur y sureste de México: Ciudad de México, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Edo. de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y Zacatecas. En Centroamérica, en Guatemala y El Salvador. Esta especie florece en abril y fructifica de octubre a diciembre y sus frutos son anuales o bianuales.

El fruto botánicamente se describe como nuez (bellota) (Fig. 3), es de forma ovoide o globosa de 7 -12 a 16 -19 mm de largo por 7 a 10 -12 mm de diámetro, y generalmente contiene una semilla en cada fruto (Romero-Rangel et al., 2014). El fruto tiene una cubierta denominada pericarpio, contenida en una estructura nombrada involucro o cúpula hemisférica de 13 a 16 mm de largo por 8-10 a 15 mm de diámetro, con escamas leñosas de ápice obtuso. Estructuralmente, se compone de un eje embrionario (epicótilo, hipocótilo y radícula) (Rodríguez-Trejo y Pompa-García, 2016), con dos cotiledones gruesos y carnosos que funcionan como fuentes de reservas, para proporcionar energía en la etapa de germinación. Estos cotiledones contienen altos niveles de lípidos ricos en energía que pueden ser utilizados como una fuente importante de alimento para mamíferos y aves (Chittaranjan, 2011; Xia et al., 2012).

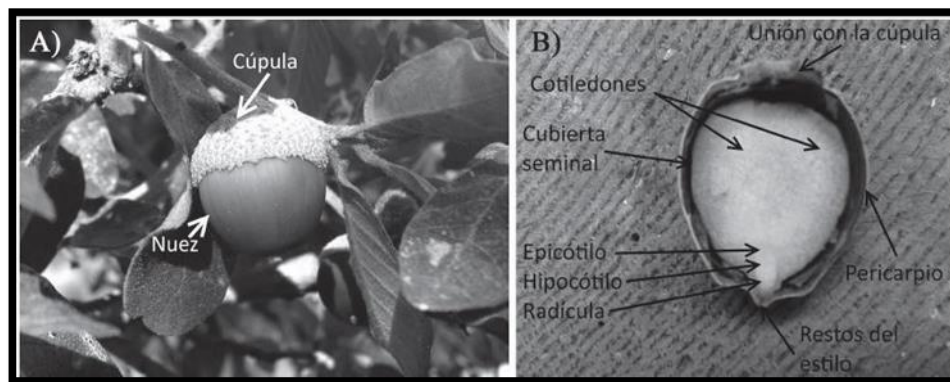


Figura 3. Estructura externa e interna de bellotas de *Quercus laurina* (Rodríguez-Trejo y Pompa-García, 2016).

1.1 Servicios Ecosistémicos

El género *Quercus* se conoce generalmente como encino; son plantas leñosas que se encuentran en altitudes variables desde los 1200 hasta los 3500 msnm (Romero-Rangel et al., 2015). Este género es de gran importancia y de ellos obtenemos varios servicios ecosistémicos. Esto último debido a que tienen asociaciones benéficas con agentes dispersantes de semillas como las ardillas y asociaciones simbióticas con hongos ectomicorrizicos (*Ascomycota* y *Basidiomycota*). Además, las hojas de los encinos mantienen una fauna diversa de herbívoros (138 especies

de insectos masticadores fueron encontrados en *Q. alba* y *Q. velutina*) algunos de los cuales son de interés económico como la *Antheraea yamamai*. Alrededor de 1,000 especies (más del 80 %) de avispas (Cynipidae) tienen asociaciones importantes con los encinos debido a que estas provocan el crecimiento de las agallas (estructuras de crecimiento anormal en los tejidos de las plantas) de encino. También, mantienen una gran diversidad de organismos como las plantas epifitas, animales como el búho cornudo (*Bubo virginianus*), ciervos (*Cervus elaphus*) y el pájaro carpintero (*Picoides nuttallii*), entre otros (Romero- Rangel et al., 2015).

Debido al aprovechamiento no sustentable de estos bosques se está afectando la diversidad de los encinos mexicanos. Una de las razones es la intensa deforestación del hábitat causada por las diferentes actividades antropocéntricas, como la producción de madera. A nivel nacional, y de acuerdo con los estudios por especie arbórea, realizados desde 1990 hasta 2007, y reportados por SEMARNAT en 2009, muestran que los encinos se encuentran en el segundo lugar, (con un 8.5 %, Fig. 4), del aprovechamiento maderable; además, los usos a los que se destina son: celulosa (54 %), escuadría (30 %), carbón (6 %) y leña (3 %) (De la Paz Pérez-Olvera et al., 2000).

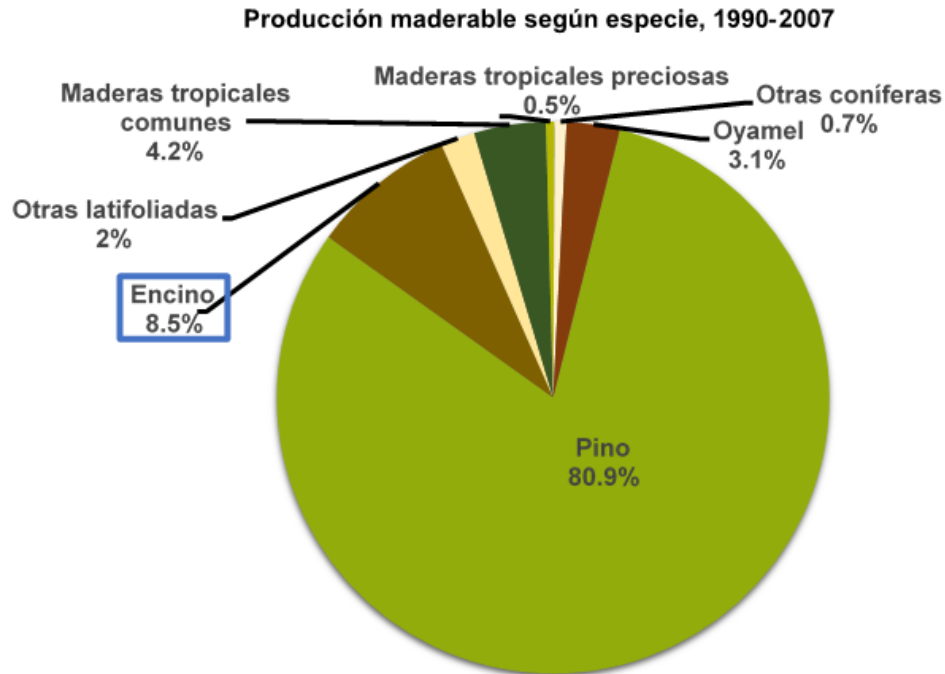


Figura 4. Producción de madera por especie arbórea a nivel nacional (SEMARNAT, 2009).

A los encinos también se les dan otros tipos de usos no leñosos, en donde se aprovechan las diferentes estructuras vegetativas y reproductivas para realizar actividades económicas, sociales y culturales. Dentro de estas actividades se utiliza la corteza, las flores, las raíces, la savia, las agallas y las hojas como un recurso medicinal para mitigar la inflamación, la gastritis, la tos, entre otros. Como fuente de alimento se pueden utilizar las bellotas, las agallas, las hojas, las yemas foliares y la flor para producir harina para tortillas, pan o atole. Estos son los recursos más aprovechables en grupos étnicos con un 47 %, en comparación con las actividades ganaderas, donde se utilizan las bellotas y el follaje de los árboles para alimentar al ganado (porcino o caprino) con un 26 %. En las actividades artesanales se utilizan bellotas y agallas para crear aretes, cestos o juguetes y representan el 16 % de su aprovechamiento. El uso industrial representa el 11 % en donde se utilizan los taninos para curtir pieles o teñir hilos (Luna-José et al., 2003).

1.2 Grado de riesgo

Aunado a las actividades maderables y no maderables también se ha reportado que las actividades humanas como talar, la explotación forestal no regulada, el cambio del uso del suelo, de bosque a uso urbano, la utilización de sistemas agropecuarios, la construcción de casas o fraccionamientos, y la sobreexplotación de las minas pétreas para construcción, afectan las zonas de distribución de los encinos, y por ende las poblaciones de los encinos están en riesgo (Oldfiel y Eastwood, 2007; Rzedowski, 2006).

Sabás-Rosales y colaboradores (2015), reportan que 35 especies de encinos en México están en algún grado de riesgo, y en 2007 la IUCN (International Union for Conservation of Nature) generó la lista roja de encinos amenazados o en peligro de extinción. Sin embargo, hasta la fecha no se ha tenido un reporte del estado actual de la distribución de la vegetación de los encinos. Esta situación es la base de muchos estudios relacionados con la reforestación y/o rehabilitación de las zonas afectadas para reincorporar estas especies, y así restablecer los servicios ecosistémicos de estas zonas.

1.3 Recalcitrancia de las bellotas de encino

De acuerdo con Roberts (1973) y Baskin y Baskin (1998) las semillas se clasifican en dos grupos conforme a su comportamiento en condiciones de almacenamiento: en ortodoxas y recalcitrantes. Posteriormente, Pritchard (2004a) en el primer grupo incluyó a las semillas cuya viabilidad se prolonga por mayor tiempo, al tolerar niveles bajos de humedad hasta un 5 %, y en el segundo grupo, a las semillas que no toleran la deshidratación y que no podrían sobrevivir durante mucho tiempo a niveles bajos de humedad, entre el 20-30 % de la cantidad de agua contenida en la semilla, además no es posible almacenarlas. Este tipo de semillas recalcitrantes experimentan un secado limitado o nulo en la etapa de maduración (Berjak y Pammenter, 2001; Kermodé y Finch-Savage, 2002) y, en consecuencia, son liberadas con un alto contenido de humedad que llega a representar más del 50 % del peso húmedo de la semilla. Además, cuando se requiere almacenarlas, es imposible disminuir su contenido de humedad por debajo del 20 %, debido a que

esta condición puede causarles daños irreversibles. Las semillas recalcitrantes mantienen un cierto grado de actividad metabólica, por lo que su requerimiento de oxígeno es elevado y mueren al carecer de ventilación adecuada (Christensen, 1978; Chin et al., 1984). Las semillas recalcitrantes se presentan principalmente entre las plantas leñosas que crecen en ambientes húmedos, y, son frecuentes en los árboles de bosques templados que predominan a lo largo del cinturón intertropical, como son las especies del género *Quercus*, que producen semillas recalcitrantes (Zavala-Chávez, 2004).

En encinos blancos, las bellotas suelen mantener su viabilidad bajo contenidos de humedad de 40 a 45 %, por lo cual no se recomienda almacenar sus bellotas, debido a que pierden su viabilidad rápidamente, o deben almacenarse sólo algunos días o semanas; mientras que en encinos rojos cuando la humedad de la bellota se mantiene alrededor del 25 % pueden almacenarse no más de seis meses. Tanto en bellotas de encinos blancos como de rojos, los niveles críticos de pérdida de humedad se alcanzan cuando las bellotas se deshidratan al aire libre y a la sombra entre 2 y 5 días (Johnson et al., 2002). Sin embargo, los niveles precisos de humedad, en las que se mantienen viables, pueden depender de la especie y del ambiente particular donde crecen. El espesor de la capa de hojarasca en el piso del bosque es una característica particular del ambiente que puede retardar la desecación de bellotas diseminadas. La ausencia de esta capa de hojarasca provoca la rápida deshidratación de bellotas, no germinan, y por tanto, no hay rebrote de plántulas de encinos al bosque (Zavala-Chávez, 2001). Las semillas recalcitrantes, al ser liberadas en un estado hidratado, muestran una velocidad de germinación rápida poco después de ser dispersadas, lo que sugiere que pueden recambiar sus metabolitos para continuar su actividad metabólica y crecimiento (Pritchard et al., 2004b). La germinación rápida es un factor determinante para evitar la desecación de las semillas (Zavala-Chávez, 2004); además permite minimizar la ventana de oportunidad para la depredación de estas. Sin embargo, la recalcitrancia es una característica considerada como uno más de los factores que dificultan las medidas de conservación y manejo de las especies en estos ecosistemas (Vázquez-Yanes y Toledo, 1989). De acuerdo con Bradford (2004), se requieren de al menos

dos componentes claves que están relacionados con la tolerancia a la desecación por parte de las semillas:

- a) La capacidad de pasar por estados de bajo contenido de humedad sin tener disfunciones metabólicas o daños por oxidación.
- b) La capacidad para prevenir o disminuir el efecto de la salida del agua de la estructura de membranas y moléculas.

En este contexto las semillas recalcitrantes como las bellotas carecen en mayor o menor grado de estas cualidades. Y debido a esto la humedad no puede ser el factor clave en la ralentización del proceso de germinación, el éxito en el almacenamiento de este tipo de semillas requiere del manejo de otro factor esencial, como la temperatura (Aroca et al., 2005).

1.4 Conservación y factores que influyen en el deterioro de las bellotas por almacenamiento

En los programas de reforestación para la producción adecuada y la obtención de plántulas sanas de encinos en vivero es necesario que las bellotas o semillas tengan una alta germinación (Díaz-Fleischer et al., 2010), además de la producción de plántulas vigorosas para asegurar su crecimiento y lograr establecer el mayor número de plántulas en campo (Himmelsbach et al., 2012). Sin embargo, la calidad de la semilla puede ser afectada por factores bióticos y abióticos. Dentro de los factores bióticos la presencia de insectos (curculiónidos, Curculionidae), hongos, bacterias y roedores deterioran en un 70 % a la semilla (Díaz Pontones y Reyes Jaramillo, 2009). Los factores de estrés abiótico que deterioran a la semilla en un 20 % pueden ser condiciones extremas de: calor, nutrientes, sequía, pH, metales pesados, luz, humedad, etc. Por la pérdida ocasionada por ambos factores solo queda disponible un 10 % de las semillas para su conservación, lo que resalta la importancia de tener un método eficiente y seguro para lograr la conservación de este tipo de semillas forestales. Uno de los métodos sugeridos es el almacenamiento adecuado de la semilla; la cual se ha caracterizado como recalcitrante (Zavala, 2003), y por lo tanto de baja tolerancia a la desecación.

Sin embargo, aunque los frutos se almacenen en condiciones óptimas de temperatura y humedad, sufren deterioro en sus estructuras celulares que podría causarles la muerte del embrión (Zavala, 2008), y así la pérdida de su viabilidad (Pasquini et al., 2012), denominado envejecimiento o longevidad de las semillas, que en condiciones de almacenamiento prolongado dependerá de su actividad metabólica. Uno de los factores que hay que tomar en consideración al almacenar las semillas es la temperatura, debido a que las bajas temperaturas reducen la actividad metabólica de la semilla haciendo más lento su deterioro, y, por lo tanto, manteniendo su viabilidad durante un tiempo más prolongado que bajo condiciones de temperatura ambiente (Doria, 2010). Además, se ha reportado que temperaturas bajas entre 2 y 4 °C son las recomendadas para el almacenamiento de las semillas del género *Quercus* (Gosling, 2002).

Una de las desventajas de las condiciones de almacenamiento prolongado es que las semillas podrían acumular especies reactivas de oxígeno (ERO) que se producen en los glioxisomas, los cuales tienen la función de la movilización de reservas de lípidos de las semillas. Las dos vías involucradas en el metabolismo de lípidos son la β -oxidación y el ciclo del glioxilato, este último convierte las reservas de lípidos en azúcares durante las primeras etapas de desarrollo de las semillas. Durante el catabolismo de los ácidos grasos se genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como producto de la actividad de enzimas como la Acil-CoA oxidasa (Ribas-Carbó et al., 2014).

Otro mecanismo para generar las ERO es por la fuga de electrones durante la transferencia de éstos hacia el oxígeno, como en la cadena respiratoria mitocondrial (fuente principal de ERO), generando superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que es una molécula con un electrón desapareado y puede reaccionar con otras moléculas para estabilizar su energía (Demidchick, 2014). El radical $O_2^{\cdot-}$ es altamente reactivo y es un radical libre de corta duración (vida media 2 μ s), pero puede formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH \cdot). El H_2O_2 se puede generar mediante la reducción del $O_2^{\cdot-}$ en presencia de iones H^+ , tiene una fuerte capacidad de oxidación y su vida media es más larga que la del $O_2^{\cdot-}$ (1ms) (Halliwell y Gutteridge, 2007). Además, el

H₂O₂ puede difundirse fácilmente a través de la membrana plasmática, por lo cual puede interactuar con diferentes biomoléculas cerca de su sitio de producción. El radical OH· se puede generar mediante las reacciones de Haber -Weiss y Fenton, a partir del O₂⁻ y el H₂O₂ en presencia de hierro u otros metales de transición. Esta es la forma más tóxica o dañina de las ERO (Haber y Weiss, 1932), porque no puede ser eliminada enzimáticamente y puede reaccionar con biomoléculas que generan un estrés oxidativo, el cual puede ser irreversible y causar un daño celular, en diferentes macromoléculas de las semillas como en el ADN, proteínas, carbohidratos y en los lípidos (Møller et al., 2007). Estos últimos están constituidos estructuralmente por los ácidos grasos (Garrido - Pertierra y Teijón - Rivera, 2006), y la composición de estos en las bellotas es muy variable dependiendo de las variaciones estacionales, especies y ubicaciones geográficas. Las bellotas son ricas en ácidos grasos monoinsaturados, principalmente el ácido oleico y también en ácidos grasos esenciales como el ácido linoleico (poliinsaturado: ω-6 y ω-3) (Akcan et al., 2017). De acuerdo con Papoti et al., (2018) el ácido oleico y linoleico representan aproximadamente el 50 % y 23 % respectivamente, de los ácidos grasos totales de las bellotas. Además, el ácido palmítico y el ácido esteárico son los principales ácidos grasos saturados presentes en 16 taxones de *Quercus*. Por lo que, las bellotas se componen de ácidos grasos saturados e insaturados, los cuales representan en promedio 22.2 % y 79.3 % respectivamente, del aceite total de las bellotas (Özcan, 2007; Charef et al., 2008). Estos lípidos se encuentran almacenados en los cotiledones de la semilla, son componentes de reserva, y sirven para proveer de nutrientes al eje embrionario y mantener el proceso de la germinación (Azcón-Bieto y Talón, 2013).

Estas reservas embrionarias, le permiten a la plántula una buena capacidad de establecimiento bajo condiciones de estrés biótico y abiótico y subraya la importancia de tener reservas suficientes que puedan mantener el proceso de germinación y viabilidad de la semilla (Rubio-Licona et al., 2011). Es por esto, que es importante realizar un análisis del contenido de reservas en las bellotas de encino durante el tiempo de almacenamiento, puesto que pueden ser sujetas a una degradación de las mismas.

El daño que las ERO pueden ocasionar en los lípidos, es mediante la lipoperoxidación (Figura 5), que se produce por una reacción en cadena inducida por los radicales libres sobre los ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoleico (Figura 6). La reacción de las ERO promueve la eliminación de un átomo de hidrógeno de un grupo metileno cercano a un doble enlace, en condiciones aeróbicas, el radical del carbono que se originó por la abstracción del hidrógeno se estabiliza con el oxígeno y genera un radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), que tiene la capacidad de eliminar un átomo de hidrógeno de otra cadena de ácido graso para formar un hidroperóxido de lípido (LOOH) en una etapa de propagación (Konigsberg, 2008).

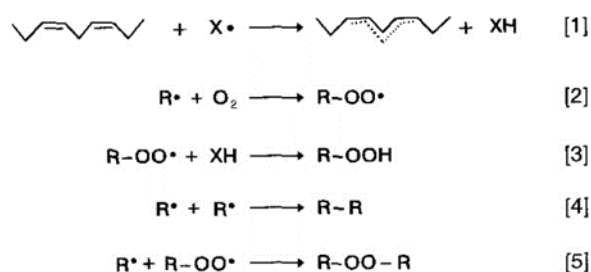


Figura 5. Secuencia de reacciones que tienen lugar durante la lipoperoxidación de los ácidos grasos insaturados mediada por radicales libres. 1 y 2-Iniciación, 3 – propagación; 4 y 5 propagación de lipoperoxidación. Completa la reacción (Konigsberg, 2008). R. (radical libre), X. (ácido graso insaturado), XH (radical lipídico), R-OOH (radical peróxilo), R-R (hidroperóxido), $\text{ROO}\cdot$ (compuestos estables), R-OO-R (propagación).

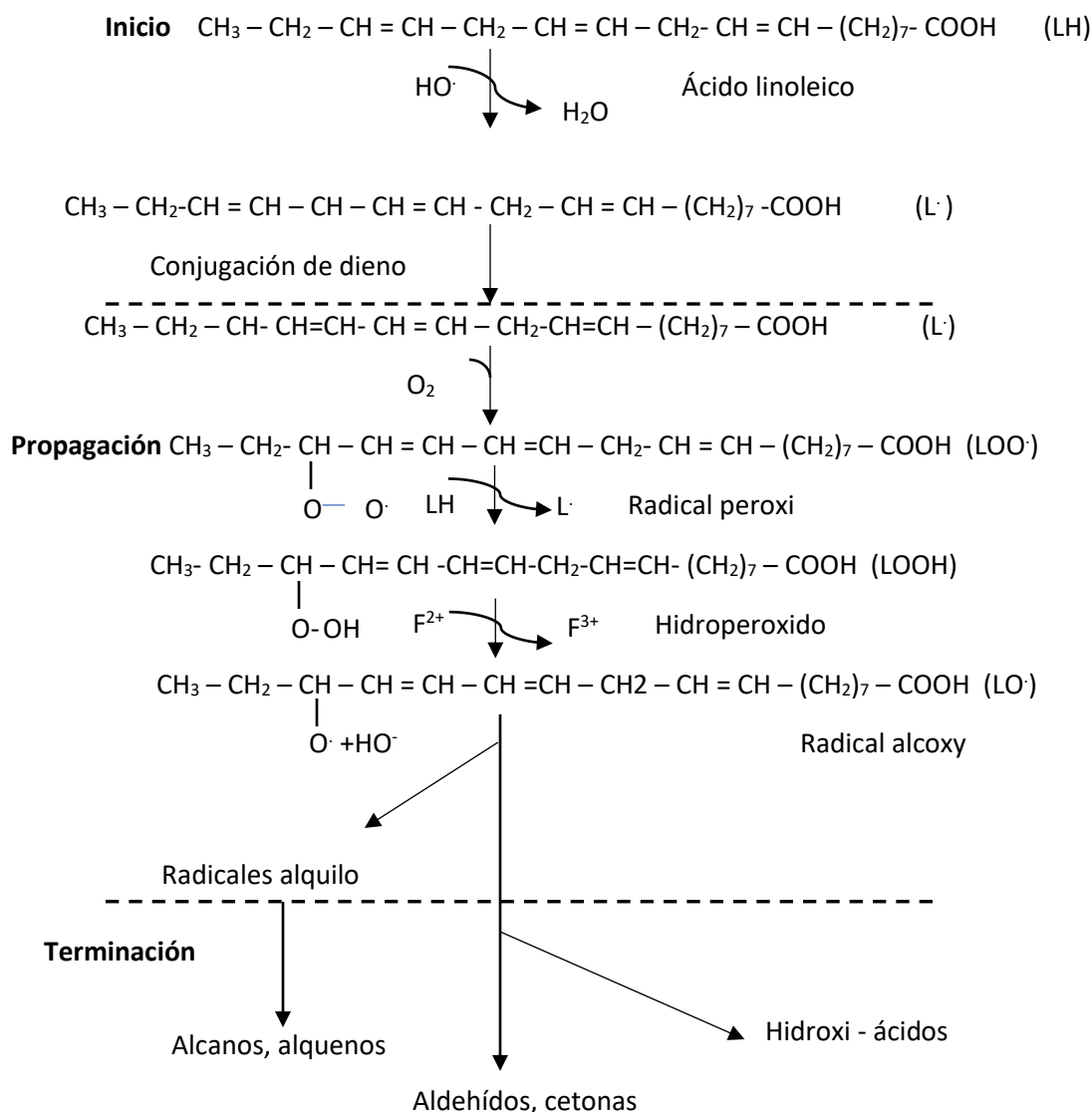


Figura 6. Representación esquemática de la lipoperoxidación del ácido linoleico, inducido por los radicales hidroxilos (Vaca et al., 1988). LH (ácido graso insaturado), L \cdot (radical lipídico), LOO \cdot (radical lipídico peroxilo), LOOH (hidroperóxido lipídico) y LO \cdot (radical lipídico del tipo alcoxilo).

La lipoperoxidación puede afectar directamente al embrión, e interferir en la germinación de la semilla, en el vigor o incluso producir su muerte, por lo que se considera que la acumulación de ERO es uno de los factores más importantes del envejecimiento en las semillas (Aguirre-Bolaños et al., 2017).

De acuerdo con Bailly (2004), la participación de las ERO en el envejecimiento de las semillas se puede dar en dos etapas:

Etapa I. Si las semillas tienen un bajo contenido de humedad, las ERO podrían causar reacciones de autooxidación de lípidos que dan paso a la producción de radicales libres (primarios - FRI), lo que degradaría los triacilglicéridos (TAGs). En estas condiciones las actividades de las enzimas antioxidantes *in vivo* se encuentran disminuidas y, por lo tanto, no son capaces de eliminar las ERO que podrían tener un efecto nocivo sobre las biomoléculas.

Etapa II. La imbibición y la germinación de las semillas previamente almacenadas deben considerarse como los pasos críticos de los procesos oxidativos relacionados con el envejecimiento, debido a que en estas etapas se generan los mayores daños celulares. Durante la imbibición se liberan los radicales libres que se acumularon durante el almacenamiento de la semilla, y durante la germinación se producen nuevas ERO debido a la reanudación del metabolismo (FR: radicales libres secundarios) por la actividad respiratoria mitocondrial (Figura 7). Aunado a los radicales libres primarios producidos en la etapa I del envejecimiento de las semillas, la maquinaria de enzimas antioxidantes se vuelve ineficiente y causa más daños a los fosfolípidos de membrana (PLs).

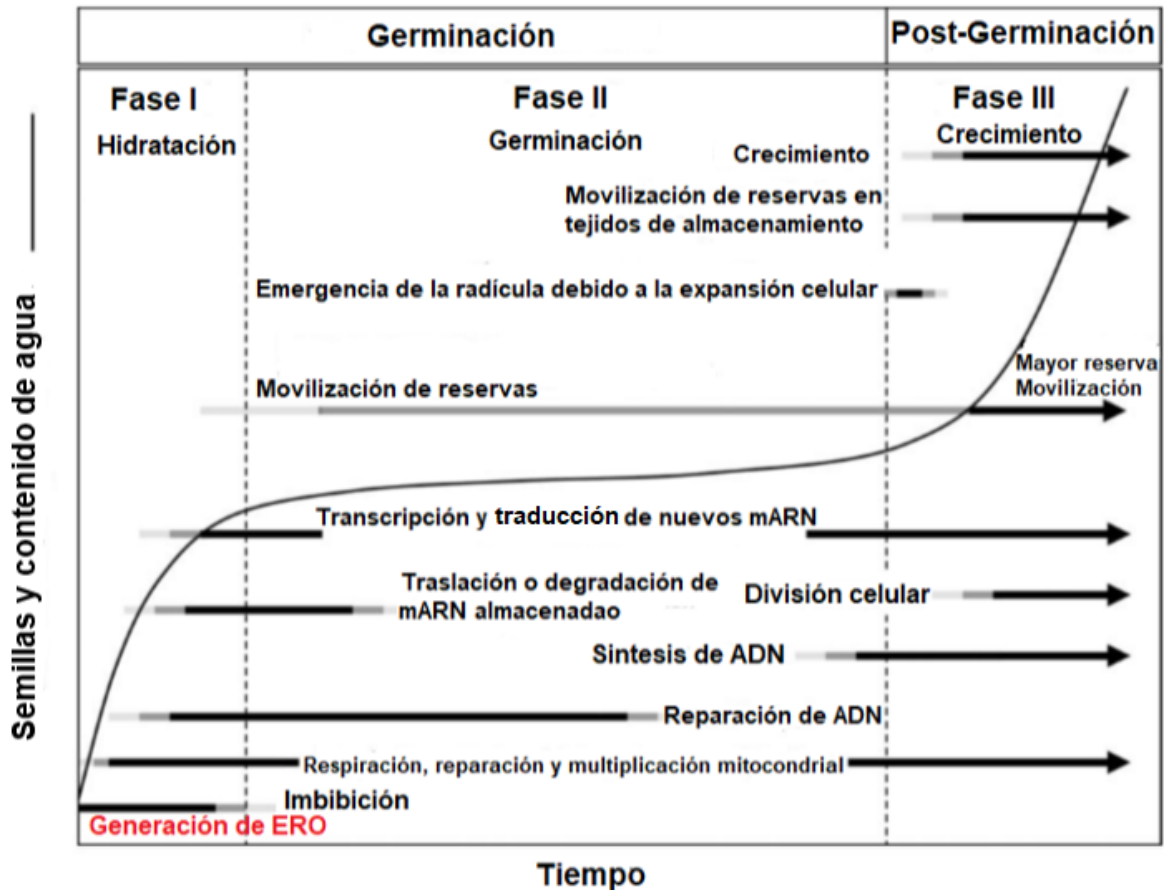


Figura 7. Curso temporal de los acontecimientos físicos y metabólicos que ocurren en la germinación (Fase I y II) y el crecimiento temprano de las plántulas (Fase III). En rojo se señala la generación de ERO (Modificado de Nonogaki et al., 2010).

1.5 Sistemas de defensa antioxidante

Las semillas cuentan con un sistema antioxidante que contrarresta el efecto de las ERO mediante la regulación estricta de la actividad de las enzimas antioxidantes, como la primera línea de defensa, la cual se ha dividido en dos grupos: 1) antioxidantes de tipo enzimático que incluye a la Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), la Glutatión peroxidasa (GPx) y las tiorredoxinas, entre otras, y 2) antioxidantes de tipo no enzimático como: las vitaminas A (cuyo precursor es el β -caroteno), C (ácido ascórbico) y E (α -tocoferol) o el tripéptido glutatión (GSH) (Konigsberg, 2008).

Dentro de los antioxidantes enzimáticos, la enzima SOD es la encargada de convertir el radical superóxido en una molécula menos reactiva, como el H_2O_2 , mediante una reacción que se denomina dismutación. La SOD puede clasificarse en varios tipos, pero los más importantes son tres: la del tipo I que tiene como cofactores al cobre y al zinc (CuZn-SOD o SOD1) y se encuentra de forma constitutiva en el citosol. Del tipo II que tiene al manganeso (Mn) como cofactor (Mn-SOD o SOD2) y es una isoforma inducible que se localiza en el interior de las mitocondrias; y por último las del tipo III, que se ubican fuera de la célula y están asociadas a la matriz extracelular; y al igual que las SOD1 se asocian con cobre y zinc y se denominan EC-SOD o SOD3. Estas variantes de SOD distribuidas en diferentes compartimentos celulares podrían explicar la dificultad que tiene el $O^{\cdot -}$ para atravesar las membranas lipídicas (Konigsberg, 2008).

Las peroxidasas son las enzimas responsables de eliminar los hidroperóxidos, tanto al H_2O_2 como a los ROOH, esta eliminación se lleva a cabo mediante la oxidoreducción que emplea una molécula específica como agente reductor. De manera tradicional las enzimas que eliminan peróxidos se dividen en dos grupos: catalasas y peroxidasas. La CAT es una enzima que se ubica primordialmente en los peroxisomas y protege a la célula de la acumulación de H_2O_2 , mediante su degradación hasta convertirlo en agua. Para que se lleve a cabo esta reacción la CAT emplea una segunda molécula de H_2O_2 como agente reductor, por lo que no requiere ningún otro sustrato, además la CAT tiene una baja afinidad por su sustrato ($K_m = 2.5 \times 10^{-2} M$), pero tiene una velocidad máxima alta, por lo que continuamente está activa cuando hay altas concentraciones de H_2O_2 (Rivera et al., 2008).

Por otra parte, las peroxidasas son mucho más afines al H_2O_2 y a los ROOH, por lo cual tienen la capacidad de eliminarlos cuando se encuentran en bajas concentraciones, aunque necesitan un agente reductor para llevar a cabo su función. Entre las peroxidasas más importantes se encuentra la ascorbato peroxidasa (APX), que es un componente principal del ciclo ascorbato-glutatión (AsA- GSH), esta peroxidasa utiliza dos moléculas de ácido ascórbico para reducir al H_2O_2 a moléculas de agua, además la APX es un miembro de la superfamilia de

peroxidasas hemo de la Clase I y es regulada por señales redox y H_2O_2 . La APX se ha localizado en el cloroplasto, la mitocondria y el peroxisoma en donde elimina el H_2O_2 producido dentro de estos orgánulos; mientras que la APX citosólica elimina el H_2O_2 producido en el citosol, en el apoplasto, o el que se difunde desde los orgánulos (Sharma et al., 2012).

Por último, la enzima glutatión reductasa (GR) cuando actúa como antioxidante participa en ciclos de oxidación y reducción enzimáticos y no enzimáticos, el glutatión reducido (GSH) se oxida en una reacción catalizada por la enzima dehidroascorbato reductasa (DHAR). La GR, es una enzima dependiente de NAD(P) H que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a GSH (glutatión reducido), y por lo tanto mantiene una alta proporción de GSH /GSSH celular, el cual es utilizado por la Glutatión reductasa para la reducción del H_2O_2 (Sharma, et al., 2012).

1.6 Tipos de estrés en plantas

Las plantas han evolucionado desde su aparición para adaptarse a los ambientes diversos a los que están expuestas. Las respuestas que las plantas muestran ante distintos factores ambientales les permiten detectar cambios ambientales sutiles y/o más fuertes, y responder inmediatamente a éstos (Martínez-Nuñez et al., 2018). El estrés se ha definido como el conjunto de respuestas bioquímicas o fisiológicas, que especifican un estado particular del organismo diferente al observado bajo un rango de condiciones óptimas (Benavides-Mendoza, 2004). Este conjunto de respuestas se puede inducir en las plantas a lo largo de su ciclo de vida, ya que están expuestas a un gran número de condiciones o factores estresantes, los cuales pueden agruparse en:

1) **Factores bióticos**, que son causados por la acción de los seres vivos, como el ataque de insectos o grandes animales, otras plantas y los denominados agentes patógenos (bacterias, hongos, virus y viroides) (Madhava et al., 2006; Nicot et al., 2005).

2) **Factores abióticos**, los cuales, dependiendo de la naturaleza del agente causal, puede dividirse en físicos y químicos. Entre los químicos, se puede incluir la salinidad (en su componente iónico o tóxico), carencia de elementos minerales y contaminantes ambientales (dióxido de azufre, óxidos de nitrógeno, compuestos clorofluorocarbonatos, el ozono y los metales). El estrés físico está causado por los cambios drásticos de temperatura (calor, frío y/o congelación), la deficiencia o el exceso de luz, los cambios en la concentración de sales (en su componente osmótico), la anaerobiosis producida por encharcamiento o inundación, mecánico (producido por el viento), excesiva compactación del suelo y el déficit hídrico (Azcón-Bieto y Talón, 2013).

1.7 Estrés hídrico en plántulas

El agua es una molécula esencial de la vida de las plantas, debido a sus propiedades fisicoquímicas que intervienen en la estabilidad de las moléculas (proteínas, carbohidratos, etc.), la expansión celular y la integridad de la pared celular. Además, el agua forma parte de la regulación de los procesos celulares que dependen del volumen celular y la hidrodinámica, algunos de ellos son: la proliferación, la migración celular, la obtención de nutrientes y el crecimiento; este último es primordial debido a que el agua constituye típicamente del 80 al 95 % de la masa de los tejidos en crecimiento (Zonia y Munnik, 2007).

Teniendo en cuenta que el agua es uno de los recursos más importantes para las funciones fisiológicas y procesos celulares en las plantas, se considera que una limitación o un exceso de este recurso es un factor que provoca situaciones adversas o estresantes en las plantas. La poca disponibilidad de agua en el suelo de los ecosistemas que se puede dar por las bajas precipitaciones, la baja capacidad de retención de agua del suelo, la excesiva salinidad, las temperaturas extremas (frías o calientes), la baja presión de vapor atmosférica, o una combinación de estos factores, puede ocasionar que la transpiración exceda al agua absorbida por las raíces, produciendo lo que se ha denominado estrés hídrico (Moreno, 2009; Munns y Tester, 2008). La intensidad y duración del estrés hídrico

influyen en los efectos y la capacidad de las plantas para resistirlo. Además, se debe tener en cuenta que la etapa de plántula es una fase crítica en el crecimiento de especies leñosas (Zheng et al., 2009), porque en esta etapa se experimenta una mayor susceptibilidad al estrés hídrico (Baquedano y Castillo, 2006; Flores-Luna et al., 2012), debido a que los individuos aún no han desarrollado un sistema radicular extenso ni profundo y su acceso al agua del suelo es limitado (Lüttge, 2007; Tyree et al., 2003). Esta susceptibilidad de plántulas causa su vulnerabilidad en su crecimiento y establecimiento (Sánchez-Gómez et al., 2006), incluyendo las plántulas de encino (Alvarado-Rosales et al., 2007).

1.8 Efecto del estrés hídrico en el crecimiento de plántulas

El estrés hídrico puede tener un efecto importante en el crecimiento y el establecimiento de las plántulas. El crecimiento es un proceso complejo que se describe como el balance entre la captura y la pérdida de carbono, nutrientes y agua. En términos absolutos se define como el incremento de biomasa por unidad de tiempo (AGR); también se puede expresar como crecimiento relativo, es decir, el incremento de biomasa por unidad de biomasa, por unidad de tiempo (RGR) (Paine et al., 2012). Ambos parámetros son de gran importancia, debido a que representan la productividad primaria, y son la entrada de energía mayoritaria en los ecosistemas, y, por lo tanto, de la que dependen los demás niveles de la cadena trófica (Himmelsbach et al., 2012; Villar et al., 2014).

La respuesta de las plantas a la sequía se ha clasificado en: escape, resistencia y tolerancia, de acuerdo con Aranda (2014). Algunas especies de plántulas poseen mecanismos de evitación o tolerancia (Pallardy y Rhoads, 1993), que se activan en respuesta al estrés hídrico, y otras plantas que no poseen mecanismos adecuados en respuesta al estrés, experimentan daños irreversibles y mueren (Azcón-Bieto y Talón, 2013). Esto implica que las plantas han desarrollado adaptaciones morfológicas, bioquímicas y fisiológicas que les permiten prevalecer en un ambiente determinado (Trubat et al., 2010). Especies que resisten la sequía poseen una alta resistencia a nivel de epidermis, que minimiza la pérdida de agua, el ajuste en el

patrón de asignación de biomasa de hojas (LWR), tallos (SWR) y raíces (RWR), el crecimiento limitado de hojas, una variación en la relación brote / raíz (Coeficiente alométrico) que es una respuesta común al estrés hídrico (Potters et al., 2007; Shao et al., 2008; Wu et al., 2013). Los componentes morfológicos de las plántulas como: la Tasa de Área Foliar (LAR), que representa la relación entre la Proporción de Peso Foliar (LWR) y el Área Foliar Específica (SLA), indican la producción foliar e indirectamente la eficiencia fotosintética (Antúnez et al., 2001; Zeiger y Taiz, 2006; Trubat et al., 2010).

Las plántulas con una fotosíntesis deficiente pueden mostrar lesiones en las hojas como un gradiente de necrosis en sus márgenes, así como cambios estructurales en las células foliares (retracción y el colapso de la pared celular, proceso denominado citorrrisis) (Vollenweider et al., 2016). Estas alteraciones estructurales originan cambios en los rasgos fisiológicos de las plantas como en la Tasa de Asimilación Neta (NAR), el potencial hídrico de las hojas, el ajuste osmótico y la fijación de carbono, todas a través de modificaciones en la conductancia estomática (Wright et al., 2004), y por lo tanto, en la apertura o cierre de los estomas, lo que repercute en la fijación del carbono. Es decir, la conductancia estomática está en función de la densidad, el tamaño y el grado de apertura de los estomas, por lo tanto, al tener mayor cantidad de estomas abiertos se obtiene una mayor conductancia, esto indica que la tasa de fotosíntesis y la transpiración son potencialmente altas (Lawson y Wang, 2018); conjuntamente los estomas son los responsables de la mayor proporción de la pérdida de agua en las plantas.

Por lo tanto, el proceso de cierre de los estomas ha sido considerado un mecanismo fisiológico para la resistencia de las plantas al estrés hídrico (Chittaranjan, 2011). Este proceso podría iniciar cuando el mesófilo de la hoja comienza a deshidratarse y regularse mediante el ácido abscísico (ABA). El ABA se sintetiza y se transporta desde las raíces, siendo liberado al apoplasto para llegar a las células guarda a través de la corriente transpiratoria (Zhang y Outlaw, 2001).

Esta fitohormona produce una pérdida de iones K^+ (calculada en 4-8 veces de disminución, desde 400-800 mM hasta una concentración final de 100 mM), así

como de aniones Cl^- o malato²⁻ en las células guarda, lo que provoca una salida de agua del citoplasma, dando lugar al cierre parcial de los estomas (Roelfsema y Hedrich, 2002). Cuando las hojas cierran parcialmente sus estomas para evitar la pérdida de agua debido a la poca disponibilidad de esta en el suelo, también implica una disminución en la absorción de CO_2 , y por lo tanto, en una disminución del crecimiento (Quero et al., 2006; Valladares y Sánchez-Gómez, 2006).

Estas adaptaciones morfológicas y fisiológicas que influyen directa o indirectamente en el crecimiento, la reproducción y la supervivencia (Violle et al., 2007) les permiten a las plántulas preservar un cierto nivel de rendimiento en condiciones de estrés (Chiatante et al., 2015), y les permiten hacer frente a las condiciones de sequía para mantener un estado hídrico relativamente alto, por esto es importante profundizar en las respuestas morfológicas y fisiológicas de las plantas en condiciones de estrés hídrico.

1.9 Perturbaciones ambientales en los bosques de encinos

Actualmente, el extenso bosque de encinos se ha transformado en fragmentos forestales donde el área de borde se ha incrementado notablemente, por lo que su biodiversidad se ha visto afectada, ya que los encinos son particularmente sensibles a los cambios causados por la fragmentación (Bonito et al., 2011). La fragmentación provoca condiciones climáticas extremas de campo al estar expuestos a situaciones como temperaturas altas y bajas y precipitaciones distribuidas irregularmente durante el año (Alvarado- Rosales et al., 2007). Esto implica que se requiera de la restauración ecológica; de acuerdo con la Sociedad para la Restauración Ecológica, esta se define como “el proceso para ayudar a la recuperación de un ecosistema que ha sido degradado, dañado o destruido, siendo una herramienta valiosa y necesaria para mantener la diversidad biológica”. Además, se requiere de programas de reforestación para crear sistemas capaces de auto regeneración como: la rehabilitación, la reclamación y la mitigación, y todas estas acciones dependen del grado de deterioro del área deforestada. En estos proyectos de reforestación es importante tener en cuenta algunos factores como: el desempeño

de la especie, que depende del pequeño espacio en donde el futuro árbol se trasplanta, las condiciones micro ambientales, el nivel de perturbación, la selección de plántulas más relacionadas con la tolerancia a la sequía (Bonito et al., 2011) y la edad de la planta; este último es un factor importante para la sobrevivencia y el crecimiento en esas etapas iniciales o primeras etapas de las plantas en el campo.

En los bosques de *Quercus*, los encinos tienen dificultades para regenerarse naturalmente, debido a que el establecimiento de plantaciones forestales en áreas sujetas a sequía estacional está fuertemente limitado por la disponibilidad de agua (Padilla y Pugnaire, 2007; Pérez-Devesa et al., 2008). Sin embargo, los encinos al ser especies nativas pueden mejorar la calidad del agua cuando se usan como amortiguadores a lo largo de arroyos, lagos o humedales. Además, son árboles dominantes en todos los fragmentos de bosque y muestran gran tolerancia a diferentes condiciones de luz. Una vez que han sido establecidos, sus plántulas tienen una sobrevivencia alta dentro y fuera del bosque y en áreas deforestadas, degradadas o muy perturbadas (Williams-Linera, 2012). Por lo cual, se han propuesto como una herramienta para la restauración forestal; incluso juegan un papel particular durante el proceso de la restauración debido a sus características ecológicas y culturales.

Por otro lado, actualmente, los viveros locales manejan pocas especies nativas y las producen en pequeña cantidad. Además, no hay un consenso sobre el conjunto de rasgos de las plantas que determinan el éxito del establecimiento en condiciones limitantes de agua (Cortina et al., 2006). Existe una falta de información básica sobre los requerimientos que faciliten la germinación, establecimiento exitoso y crecimiento de estas especies, lo que limita su uso para la implementación en la restauración. Por lo anterior, este estudio se enfocó al estudio de las fases de germinación (viabilidad de la semilla) y respuesta de plántulas a la sequía de *Quercus laurina*.

2. PREGUNTAS A RESPONDER

Durante el tiempo de almacenamiento de la bellota

¿Cómo influye la temperatura de 4 °C en la generación de ERO y, por lo tanto, en la pérdida de la viabilidad?

En el establecimiento de plántulas

¿Cómo afecta el estrés hídrico el crecimiento de plántulas de encino?

Para responder estas preguntas en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

3. OBJETIVO GENERAL

Identificar los mecanismos de deterioro como la lipoperoxidación, los cambios microestructurales de las bellotas de *Quercus laurina* y la pérdida de la actividad de las enzimas antioxidantes durante cinco meses de almacenamiento en frío, y determinar el efecto del estrés hídrico en el crecimiento de plántulas.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Para evaluar el efecto de almacenamiento en la germinación de las bellotas:

- 1.- Evaluar mensualmente la germinación de bellotas almacenadas a 4 °C de 1 a 5 meses.
- 2.- Cuantificar cada mes la actividad de enzimas antioxidantes de bellotas almacenadas a 4 °C.
- 3.- Caracterizar y cuantificar el perfil de ácidos grasos de bellotas almacenadas a 4 °C durante 5 meses.
- 4.- Determinar los cambios y el grado de deterioro del eje embrionario y su microestructura.

Para evaluar el establecimiento de plántulas bajo condiciones de estrés:

- 1.- Someter en el invernadero plántulas de *Q. laurina* de siete meses de edad a condiciones de estrés hídrico.
- 2.- Valorar el crecimiento de plántulas de *Q. laurina*, bajo condiciones de estrés hídrico, utilizando un análisis de crecimiento clásico (RGR).
- 3.- Evaluar la respuesta fisiológica al estrés en términos de conductancia estomática.

4. METODOLOGÍA

4.1 Material biológico

Del encino laurelillo (*Quercus laurina* Humb et. Bonpl.) se recolectaron bellotas el 1° de enero del 2018, las cuales fueron identificadas como maduras mediante los indicadores de madurez como son el color del pericarpio, la separación entre la cúpula y la bellota y, además, no mostraban perforaciones o indicios de daños. Estas bellotas fueron recolectadas directamente del suelo cercano a los 7 árboles en fructificación que se encontraron aleatoriamente distribuidos en el bosque natural en Ecatzingo, Estado de México, ubicado a 18° 57´ latitud norte y 98° 45´ longitud oeste a 2290 msnm, al extremo sur de la zona oriental del Estado de México; limita al norte con Atlautla, al oriente del volcán Popocatepetl y al sur con el estado de Morelos. El clima es templado semicálido subhúmedo, con lluvias en verano e invierno, una media anual de 1100- 1300 mm de precipitación, la máxima incidencia de lluvia se presenta en los meses de julio, agosto y septiembre. La vegetación es de pino-encino (Prontuario de información geográfica INEGI, 2009). El ejemplar de herbario (0167117) está depositado en el Herbario de la Facultad de Ciencias U.N.A.M.

4.2 Pruebas de viabilidad

Mediante la prueba de flotación (Bonner, 2003) se seleccionaron las bellotas sanas de las dañadas y vanas. Además, se determinó la calidad de 20 bellotas con una

prueba por Rayos X en un equipo Faxitron (MX-20, Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, IL, USA) calibrada a 190 s y 28 Kv de potencia (kVp) para radiografiar con un mejor contraste y claridad (Goodman et al., 2006).

4.3 Condiciones de almacenamiento controlado

Las 5,145 bellotas viables de encino que se mezclaron aleatoriamente y 210 bellotas fueron almacenadas en cada una de las cajas transparentes nutrigo (22 x 14 x 4 cm-Inix, 2222-03) a una temperatura controlada de 4 °C (Gosling, 2002) en un refrigerador (Whirlpool WT4535D, Michigan, USA).

4.4 Prueba de germinación

Para este ensayo, se realizó una prueba de germinación inicial después de las pruebas de viabilidad con 25 bellotas (por triplicado), en las condiciones estandarizadas mencionadas a continuación. Las bellotas de *Q. laurina* fueron procesadas de la siguiente manera: Cada 30 días se tomaron aleatoriamente 25 bellotas almacenadas (por triplicado). Las bellotas se escarificaron manualmente en el ápice con una tijera de disección curva. Posteriormente fueron desinfectadas durante 5 min con una solución de hipoclorito de sodio comercial (NaOCl) al 6 %, después de tres lavados, por agitación en agua destilada estéril, las bellotas se colocaron en un germinador humedecido (Caja de Petri de vidrio 9 cm de diámetro, con papel filtro WHATMAN grado 3, y algodón comercial) con 15 mL de agua destilada estéril. Las cajas se colocaron en una incubadora (Thermo electron Lindberg /Blue MTM., USA), a 27 °C y obscuridad durante 30 días. Para determinar el porcentaje de germinación acumulada, las bellotas se consideraron germinadas cuando la radícula tuvo 1 mm de longitud y se contó el número de bellotas que germinaron, con respecto al total de bellotas utilizadas (Barraza et al., 2016) mediante la siguiente fórmula:

$$\%Germinación = \left(\frac{\text{Número de bellotas germinadas}}{\text{Total de bellotas sembradas}} \right) \times 100$$

4.5 Análisis microestructural por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

a) Preparación de la muestra

Se seleccionaron aleatoriamente 3 ejes embrionarios de bellotas de *Q. laurina* por mes de almacenamiento (Fig. 8) y se realizaron cortes longitudinales en fresco en un microscopio estereoscópico (Stemi DV4, ZEISS, Göttingen Alemania), consecutivamente se preservaron en una solución fijadora de formaldehído (40 %) 10 mL, ácido acético glacial 5 mL, alcohol (96 %) 50 mL y agua 35 mL (FAA) (Ramos-Ordoñez et al., 2016) durante 24 h, posteriormente se realizaron lavados con agua destilada hasta eliminar el exceso del fijador (Lux, 2014).

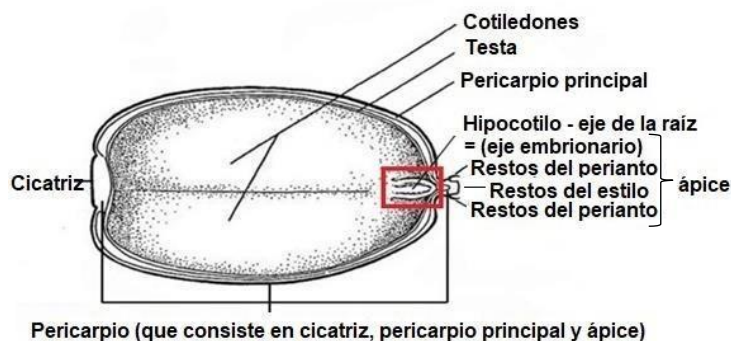


Figura 8. Estructura del fruto de encino, tomada y modificada de Xia et al. (2012).

b) Montaje de las muestras

Posteriormente, las muestras de los ejes embrionarios se colocaron sobre un soporte cilíndrico de aluminio de 1 cm x 2.5 cm de diámetro mediante un material adhesivo conductor de carbón de doble haz. En el laboratorio de Fisiología Vegetal en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), las muestras se montaron de manera que la superficie del eje embrionario se orientara hacia el detector de electrones secundarios y se observaron en un microscopio de barrido JMS -6380 LV (JEOL., Eching, Alemania) a 20 Kv, 10 mm distancia del detector a la muestra (WD), Alto vacío (HV) (Sorrivas De Lozano et al., 2014).

4.6 Perfil de ácidos grasos

a) Extracción y transesterificación de ácidos grasos de bellotas

Para la extracción de ácidos grasos se llevó a cabo por triplicado mediante el siguiente procedimiento: 0.1 g del embrión de la bellota de *Q. laurina* se pulverizaron con nitrógeno líquido con ayuda de un mortero y pistilo, se adicionó 1 mL de cloroformo (CHCl_3): metano (CH_3OH) con una relación 4:2 y se maceró durante 2 min. Transcurrido este tiempo se recuperó la muestra en un tubo de microcentrífuga y posteriormente se agitó en un vortex durante 10 min. Con el propósito de separar las fases y poder recuperar la fracción orgánica del extracto, la muestra se lavó con 0.2 mL de una solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9 %, y se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min. De la fase orgánica se tomó una alícuota de 150 μL , que se evaporó con nitrógeno, para llevar a cabo la reacción de transesterificación se adicionó 0.5 mL de Trifluoruro de boro (BF_3) al 12 % en metanol y se colocó en ebullición en baño maría, durante 20 min. Se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente y se recuperó con 0.5 mL de hexano (C_6H_{14}) grado HPLC, finalmente se adicionó 0.5 mL de agua destilada para lavar la muestra.

La cuantificación y la estimación de las concentraciones de los ácidos grasos, se llevó a cabo mediante el registro del área bajo la curva de estos y se comparó con el patrón interno ácido heptadecanoico ($\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$).

b) Análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Para analizar el perfil de ácidos grasos de las bellotas almacenadas a 4 °C, éste se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases (GC, modelo Agilent 6850 Series II Network GC System, California, USA) acoplado a un espectrofotómetro de masas (MS, 5975 VL MSD de Agilent Technologies., California, USA), en el Laboratorio de Fisiología Vegetal en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la

Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: inyección del modo splitless, temperatura del inyector de 200 °C, se utilizó una rampa de temperatura del horno programada desde 100 °C (al inicio de tres min) hasta 250 °C (manteniendo 4 min) con un aumento de temperatura de 5 °C/min. La columna del cromatógrafo de gases fue del tipo Dimetilpolisiloxano (DB-1) de 30 metros x 0.25 mm y tamaño de la partícula 0.50 µm. Se utilizó helio como gas acarreador a una velocidad de 35 cm s⁻¹. Las condiciones del detector de masas fueron: temperatura de la línea de transparencia de 250 °C, intervalo de 20 a 40 m/z, polaridad positiva, temperatura de la fuente de iones de 200 °C, el tipo de ionización de barrido completo con impacto electrónico (EI) con una energía de ionización de 70 electro- volts (eV) y un rango de 20 a 400 de relación de masa carga (m/z). Se inyectaron 2 µL de la fase orgánica del extracto derivatizado. La identificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención de estándares y patrones de fragmentación obtenidos de bibliotecas de referencia NIST (National Institute of Standards and Technology) (Pichardo-González et al., 2014).

4.7 Estrés oxidativo y actividad enzimática

a) Obtención de los extractos crudos

Se preservaron 10 bellotas viables sin germinar por cada mes de almacenamiento en un ultracongelador a -70 °C (Thermo Scientific REVCO., Ohio, USA), a las cuales se realizó el análisis de las enzimas antioxidantes de la siguiente manera:

Los ensayos para cuantificar la actividad de las enzimas antioxidantes de Catalasa (CAT) y Ascorbato peroxidasa (APX), se realizaron en el mismo extracto crudo, a diferencia de Superóxido dismutasa (SOD) y Glutación reductasa (GR) que se realizaron en extractos crudos independientes. La muestra utilizada fue de 10 ejes embrionarios por extracto, que fueron molidos en un mortero con su pistilo y homogeneizados con un polytron (Omni International Tissue Master 125) en 2 mL de amortiguador de fosfato de potasio (J. T. Baker) 50 mM, pH 7.0 que contenía 2%

polivinilpolipirrolidona (PVPP) (Sigma), 1 mM de EDTA (Sigma) y 0.25 % tritón x-100 (Sigma) durante 5 min. El homogeneizado se centrifugó a 10,000 rpm (~3000 g) durante 10 min a 4°C (Hettich- Zentrifugen 35R) y se recuperaron los sobrenadantes para transferirlos a columnas Amicon Ultra (Merck), con membrana de ultrafiltración (Ultracel) de un volumen de 0.5 mL y 10.000 NMWL (tamaño del poro), y se centrifugaron a 14,000 rpm (~4000 g) (durante 15 min. Posteriormente, para obtener la proteína concentrada se colocaron las columnas en forma inversa en un tubo colector nuevo y se centrifugaron a 1,500 rpm (~500 g) durante 2 min de acuerdo con las especificaciones del proveedor (Pukacka et al., 2011). Los sobrenadantes resultantes se consideraron los extractos crudos. El contenido de proteína en los extractos crudos se midió en un espectrofotómetro (Cary 50 Bio Varian, Ma, EE. UU) por el método de Bradford (1976), utilizando Albumina de Suero Bovino (BSA) (Sigma) 1mg/mL como estándar.

b) Cuantificación de las actividades de CAT, APX, SOD y GR

Catalasa (CAT, EC-1.11.1.6). La actividad fue cuantificada con base en el decremento de la absorbancia a 240 nm (coeficiente de extinción molar, $\epsilon=39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), por el consumo de H_2O_2 , cada 20 s, durante 3 min. La mezcla de reacción se llevó a cabo en 0.5 mL de amortiguador de fosfato de potasio (J.T. Backer) 50 mM, pH 7.0 que contenía 0.1 mL de H_2O_2 (Sigma) 20 mM, de acuerdo con Aebi (1984). Se utilizaron 25 μg de proteína total. La actividad de CAT se expresó como $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Ascorbato peroxidasa (APX, EC-1.11.1.11). La actividad de esta enzima fue cuantificada con base en el decremento de la absorbancia a 290 nm (coeficiente de extinción molar $\epsilon=2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) debido a la oxidación del ácido ascórbico (Sigma), cada 20 s, durante 1 min. La mezcla de reacción se llevó a cabo en 0.5 mL de amortiguador de fosfato de potasio (J. T. Backer) 50 mM, pH 7.0, que contenía 0.00625 mL de ácido ascórbico (ASA) 0.0625 mM y 0.005 ml de H_2O_2 (Sigma) 0.05 mM, de acuerdo con Nakano y Asada (1981). Se utilizaron 25 μg de proteína total. La actividad de APX se expresó como $\mu\text{mol de ASA min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Glutación reductasa (GR, EC 1.6.4.2). La actividad se cuantificó de acuerdo con Jiang y Zhang (2002), con base en la tasa de oxidación de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) a 340 nm ($\epsilon = 6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) cada 20 s, durante 3 min. La mezcla de reacción se llevó a cabo en 0.5 mL de amortiguador de fosfato de potasio (J. T. Backer) 50 mM pH 7.8, que contenía 0.015 mL de NADPH (Sigma) 0.15 mM, 0.025 mL de glutación oxidado (GSSG) (Sigma) 0.25 mM, 0.01 mL de Na₂EDTA (Sigma) 1 mM. La actividad de GR se expresó en $\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Superóxido dismutasa (SOD, EC1.15.1.1). La actividad se cuantificó de acuerdo con Misra y Fridovich (1972), por medio de la autooxidación de la epinefrina a 480 nm (coeficiente de extinción molar $4.02 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) cada 10 s, durante 5 min. La mezcla de reacción se llevó a cabo en 0.5 mL de amortiguador de carbonatos (Sigma) 50 mM, pH 10.2, que contenía 0.1 mL de EDTA (Sigma) 0.5 mM y 0.025 mL de epinefrina (Sigma) 10mg/mL. Se utilizaron 25 μg de proteína total. La actividad de SOD se expresó en $\mu\text{mol adenocromo min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

La actividad de las enzimas se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$Actividad = \frac{m \left(\frac{abs}{min} \right) * Vol\ reacción\ (mL)}{\epsilon \left(\frac{L}{mmol} \right) * 1cm * proteína\ (mg)} = \mu mol\ min^{-1}\ mg^{-1}$$

Donde:

m=pendiente

ϵ = coeficiente de extinción correspondiente a cada enzima

4.8 Estrés hídrico en plántulas de *Quercus laurina*

a) Análisis de la conductancia estomática (*gs*)

La conductancia estomática (*gs*) se midió con un porómetro foliar de estado estacionario (Decagon Devices SC-1, Nebraska, USA), se seleccionaron 4 plántulas al azar del control y de cada uno de los tratamientos, de las cuales se registró la *gs*

de 2 hojas de cada plántula (Fig. 9). Las mediciones se realizaron cada tercer día (Fig. 10) en un horario de 12:30 p.m. para establecer las condiciones máximas de intensidad lumínica (Esperón-Rodríguez y Barradas, 2015).

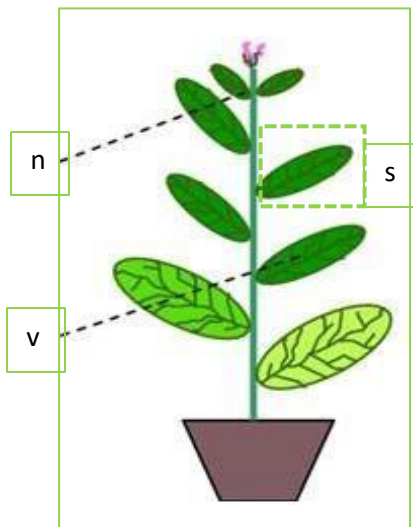


Figura 9. Esquema que representa la distribución de las hojas seleccionadas para el análisis de conductancia estomática en las plántulas de *Quercus laurina*, n: hojas jóvenes, v: hojas maduras y s: hojas seleccionadas; imagen modificada de Ramos-González (2014).

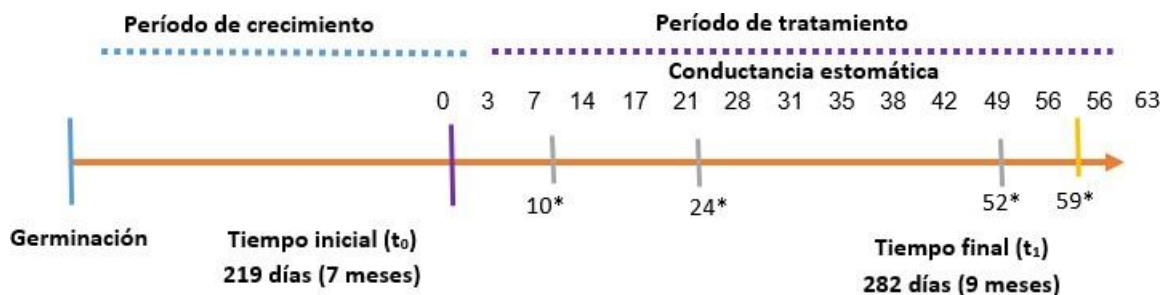


Figura 10. Periodo de crecimiento y de tratamiento con el tiempo inicial (t_0), y tiempo final (t_1), N=8 de cosecha para evaluar el análisis de crecimiento clásico. La conductancia estomática se midió cada tercer día con N=2, control y tratamientos. * Días nublados.

b) Plántulas en invernadero

Se llevó a cabo la siembra de 150 bellotas viables en un sustrato de peat moss y agrolita en una proporción 2:1, se utilizaron bolsas para vivero de 1 Kg (Fig. 11).

A los 7 meses las plántulas se expusieron a un estrés hídrico por un período de 63 días. Se colocaron en el invernadero agrícola del Instituto de Ecología, UNAM (en condiciones ambientales no controladas). Se realizaron mediciones de la intensidad lumínica (μm) con un sensor de luz portátil (LI-250A Light meter, Lincoln, Nebraska), y se registró la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y la humedad relativa (H.R.) cada media hora con un Data logger (WatchDog A-Series Data Logger, Spectrum Technologies, Inc., IL USA).

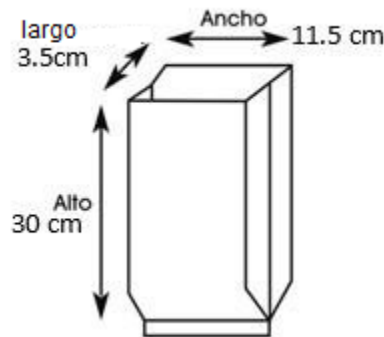


Figura 11. Características de las bolsas para la siembra de bellotas.

Las condiciones de estrés hídrico se establecieron de acuerdo con la capacidad de campo del sustrato, que fue de 600 mL, con lo cual se determinó el estrés moderado de 400 mL y el estrés severo con 200 mL. Estos tratamientos se regaron cada tercer día, y se monitoreo a lo largo del experimento la humedad del sustrato con un medidor de humedad sav a plant II TM para verificar que los tratamientos conservaran los rangos de humedad deseados en cada caso.

El experimento se diseñó de tal forma que se seleccionaron en total 32 plántulas aleatoriamente, para el tiempo inicial ($n=8$) y para el tiempo final de los grupos experimentales ($n=24$) (Fig. 12).

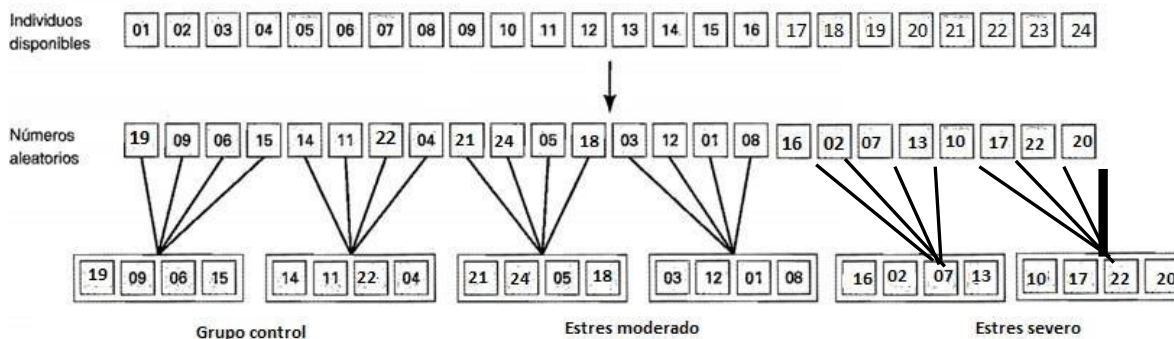


Figura 12. Asignación de las plántulas a los grupos de tratamiento en un diseño aleatorio para la segunda cosecha tomado de Wayne (2009).

Para llevar a cabo el análisis se realizaron dos cosechas, la primera para establecer el tiempo inicial (Tiempo “0”), en el cual se incluyeron 8 plántulas, y la segunda para el tiempo final (Tiempo “1”), que incluyeron 24 plántulas (8 plántulas asignadas al control y 16 plántulas para los tratamientos de estrés moderado y severo).

a) Evaluación de los parámetros del análisis de crecimiento clásico (RGR)

Para evaluar el efecto del estrés hídrico en las plántulas de 7 meses de edad se llevó a cabo el análisis clásico de crecimiento descrito por Chiariello et al. (2000), a través de los parámetros de crecimiento definidos por Evans, (1973) y Hunt, (1990). Estos parámetros comprenden: un aspecto fisiológico que es la tasa de asimilación neta (NAR) y aspectos morfológicos como: proporción del área foliar (LAR) y sus componentes: el Índice de peso foliar (LWR) y área foliar específica (SLA); los parámetros de crecimiento relativo: Biomasa seca total y asignación de biomasa: hoja (LWR), tallo (SWR) y raíz (SWR); tasa de crecimiento absoluto (AGR) y tasa de crecimiento relativo (RGR) (Tabla 1). En cada cosecha se separaron los diferentes órganos (hoja, tallo y raíz) de cada una de las plántulas del tiempo “0” y tiempo “final”. El área foliar de las hojas se calculó mediante un medidor de área foliar portátil (Li-Cor modelo Li-3000 A1, Decagon Devices, Inc., Nebraska, USA) en cm^2 . Posteriormente, se registró el peso fresco de los órganos en una balanza analítica (Adventurer TM OHAUS, Nueva Jersey, USA), y fueron depositadas en

bolsas de papel estraza para su secado en un horno (BINDER, Tuttlingen, Alemania) a 40 °C, durante 15 días para poder registrar su peso seco. Los datos se procesaron y se calcularon los parámetros para el análisis clásico de crecimiento con las fórmulas descritas en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros del análisis de crecimiento clásico (RGR). Evans, (1973) y Hunt, (1990).

Índice de crecimiento	Nombre	Fórmula	Descripción
Biomasa seca total	Biomasa	$W_2 - W_1$	-Representa la suma del peso seco de la parte aérea y subterránea de cada planta.
Tasa de crecimiento absoluto	AGR	$(W_2 - W_1) / (T_1 - T_0)$	-Describe el incremento en tamaño por unidad de tiempo.
Tasa de crecimiento relativo	RGR	$(\ln W_2 - \ln W_1) / (T_1 - T_0)$	-Se define como el incremento en biomasa seca por unidad de biomasa total de la planta, por unidad de tiempo.
Tasa de asimilación neta	NAR	$(W_2 - W_1) (\ln L_{A2} - \ln L_{A1}) / (L_{A2} - L_{A1}) (T_1 - T_0)$	-Parámetro que indica la eficiencia de los órganos de asimilación para generar nuevos tejidos.
Tasa de área foliar	LAR	$(L_{A1}/W_1) + (L_{A2}/W_2) / 2$	-La proporción del área foliar total entre el peso seco total de la planta.
Área foliar específica	SLA	$(L_{A1}/L_{W1}) + (L_{A2}/L_{W2}) / 2$	-Calcula el grosor relativo de las hojas en función del área foliar y el peso seco total de las hojas.
Asignación de biomasa- hoja	LWR	$(L_{W1}/W_1) + (L_{W2}/W_2) / 2$	
Asignación de biomasa-tallo	SWR	$(S_{W1}/W_1) + (S_{W2}/W_2) / 2$	- Biomasa asignada a cada uno de los órganos que conforman a la planta completa (hoja, tallo y raíz).
Asignación de biomasa-raíz	RWR	$(R_{W1}/W_1) + (R_{W2}/W_2) / 2$	
Coefficiente alométrico	R/S	$RW / (SW + LW)$	-índice que permite saber la relación morfológica entre el crecimiento de la raíz y el brote ($x=1$, hay un balance entre raíz y parte aérea; $x<1$, crecimiento hacia la parte aérea; $x>1$, el crecimiento de la raíz es mayor).

Símbolos utilizados: W_1 = Peso seco total inicial de las plantas (g); W_2 = Peso seco total final de las plantas; T_1 = Cosecha del tiempo final; T_0 = Cosecha del tiempo inicial; \ln =logaritmo natural; L_{A1} = Área foliar total inicial; L_{A2} = Área foliar total final; L_{W1} = Peso seco total inicial de las hojas; L_{W2} = Peso seco total final de las hojas; S_{W1} = Peso seco inicial del tallo; S_{W2} = Peso seco final del tallo; R_{W1} = Peso seco inicial de la raíz; R_{W2} = Peso seco final de la raíz; RW = Peso seco de la raíz; SW = Peso seco del tallo; LW = Peso seco de las hojas.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos del porcentaje de germinación (n=3), las actividades de las enzimas antioxidantes(n=3), ácidos grasos (n=3), la conductancia estomática (n=8) y el análisis de crecimiento fueron analizados por un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba de Tukey para comparar las diferencias estadísticamente significativas con $\alpha=0.05$. El paquete de software fue IBM SPSS Statistics 25, 2017.

6. RESULTADOS

6.1 Obtención de bellotas viables

De un total de 17,292 semillas recolectadas y mediante el método de flotación para separar las bellotas viables de las no viables se obtuvieron 6,097 (35.2 %) bellotas no viables, debido a que estaban dañadas o vanas, 905 bellotas perforadas por curculiónidos (*Curculionidae*) (5.2 %) (Fig. 13) y 10,290 viables (59.5 %), las cuales se consideraron para ser utilizadas en las pruebas de laboratorio y de invernadero para los experimentos.



Figura 13. (A) Prueba de viabilidad por el método de flotación. (B) Bellotas perforadas por curculiónidos (*Curculionidae*).

Se realizó una segunda prueba de viabilidad de las bellotas viables, obtenidas en la prueba de flotación anterior. Se utilizó el método de Rayos X para determinar si las 20 bellotas viables (sanas) aún seguían infectadas por curculiónidos, y si fuera así eliminarlas de los grupos de experimentación. Con esta prueba, se lograron seleccionar bellotas viables con sus cotiledones completos y sin curculiónidos, a

diferencia de las bellotas no viables que mostraron los cotiledones incompletos, con cámaras de aire (30 %) y con presencia de curculiónidos (20 %) (Fig. 14).

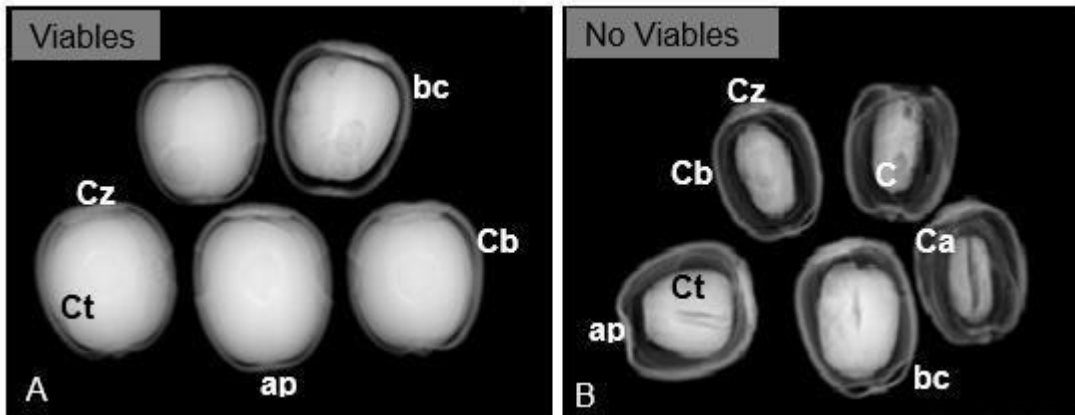


Figura 14. Fotografías digitales de la prueba de viabilidad por Rayos X (MX-20, Faxitron). (A) Bellotas viables con los cotiledones completos y ausencia de curculiónidos; (B) bellotas no viables con los cotiledones incompletos. Cb: contorno de la bellota, Ct:cotiledones, Cz:cicatriz, ap: ápice, bc: borde de la cubierta, Ca: Cámara de aire y C: Curculionido.

6.2 Porcentaje de germinación de las bellotas durante el almacenamiento a 4 °C

Con el objetivo de analizar el porcentaje de germinación inicial de las bellotas viables y monitorear la germinación durante el almacenamiento a 4 °C, se realizaron pruebas de germinación cada mes. La figura 15 muestra la germinación acumulada por intervalos de tiempo (meses), el tiempo inicial mostró una máxima capacidad de germinación del 60 %. Posteriormente se observó que existe una disminución paulatina conforme transcurre el tiempo de almacenamiento. A partir del segundo mes de almacenamiento el porcentaje de germinación disminuyó significativamente a un 30 % (50 % menos de la inicial); conforme transcurrió el tiempo disminuyó hasta un 20 % (83 % menos del porcentaje inicial).

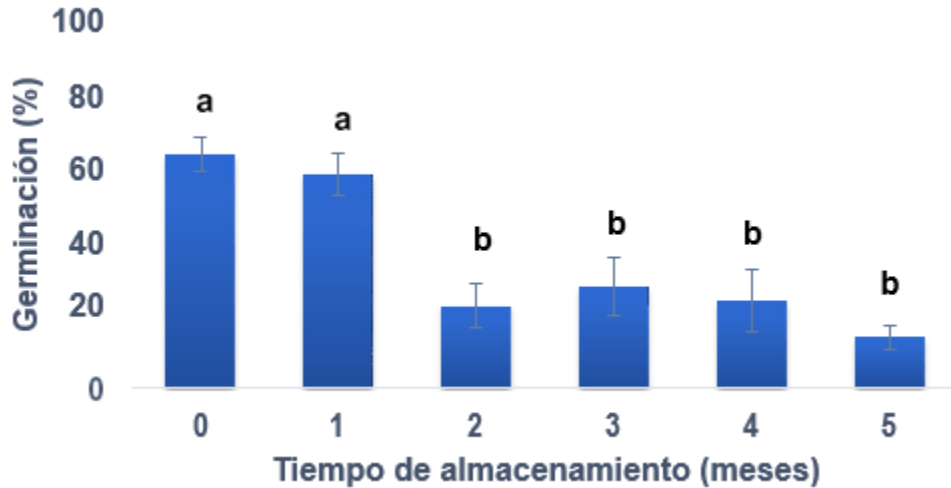


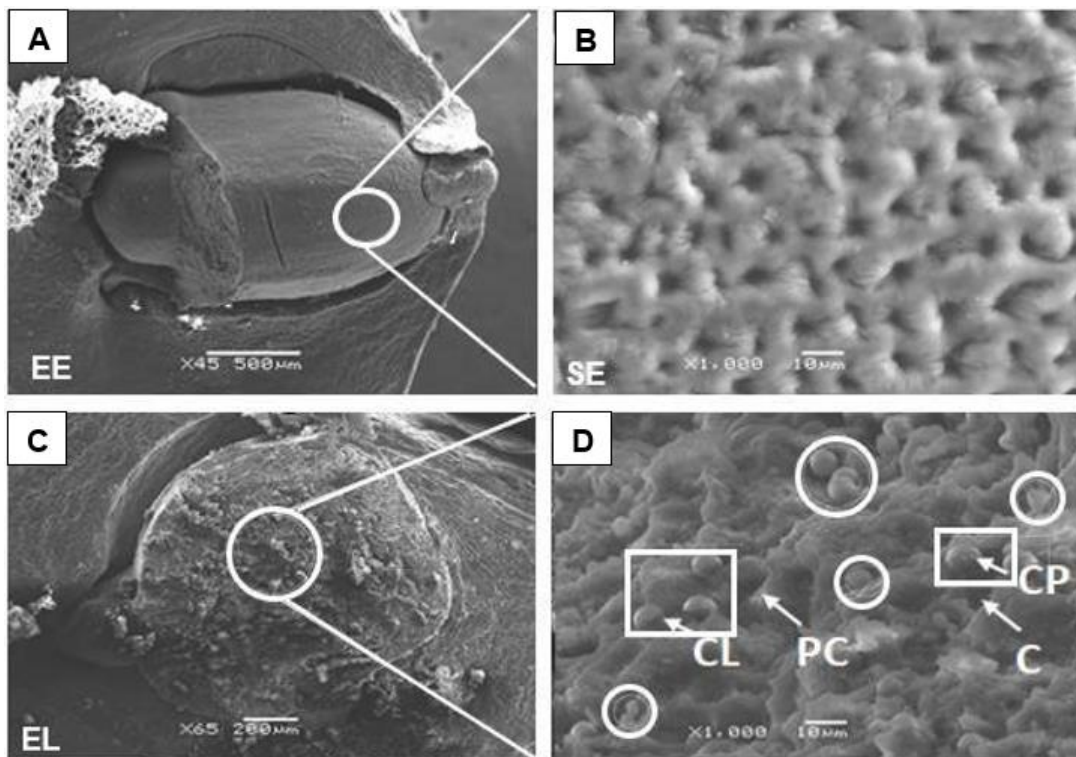
Figura 15. Prueba de germinación en bellotas de encino (*Quercus laurina*) almacenadas durante 5 meses a 4°C. Se muestra el promedio \pm error estándar (e.e.) de tres repeticiones (n=3, p<0.05) (prueba de ANOVA unifactorial seguida de la prueba de Tukey HSD). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

6.3 Microestructura del eje embrionario de la bellota durante el almacenamiento

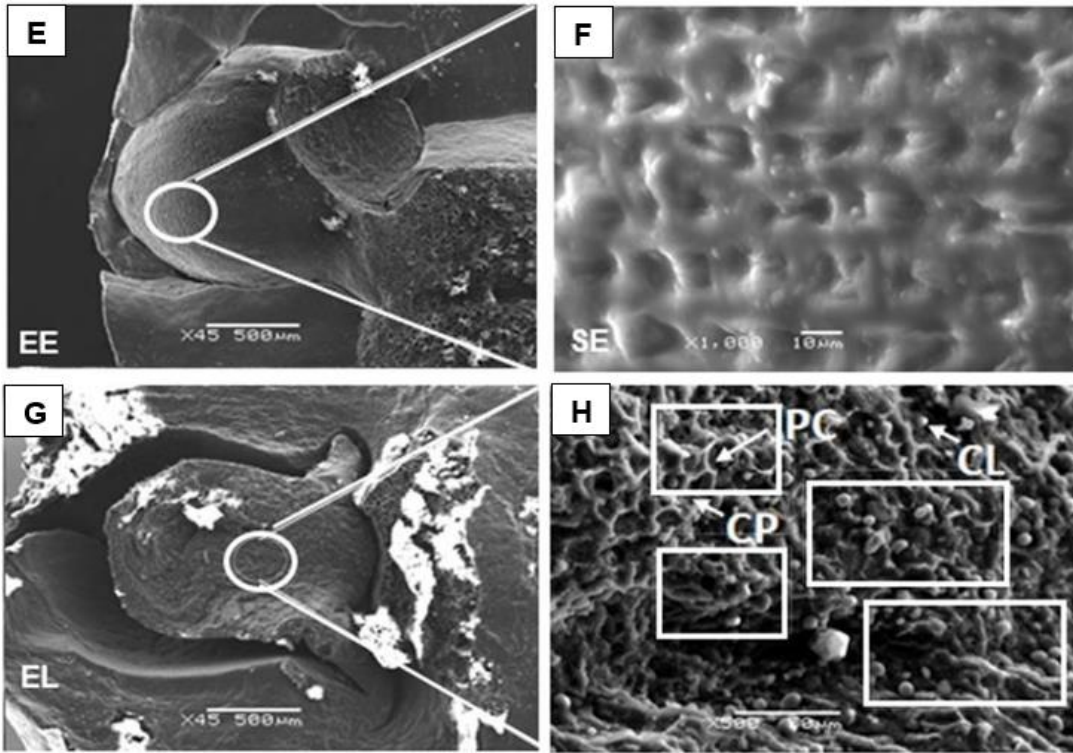
Para examinar el deterioro de la bellota durante los cinco meses de almacenamiento a 4°C se realizó un análisis microestructural del eje embrionario (eje raíz-tallo) (EE) que presenta en su superficie (SE) y en las células embrionarias un tejido homogéneo con una red citoplásmica compleja, y las células embrionarias presentan una pared celular primaria delgada (Fig.16 A, B, E, F, I, J, M, N, P, Q, T, U). Además, en el corte longitudinal del eje embrionario (EL) (Fig. 16 C, G, K, Ñ, R, V) al incidir el haz de electrones secundarios sobre las superficies permitieron observar los orgánulos subcelulares que incluyen cuerpos de proteínas y lípidos (Fig. 16 D, H, L, O, S, W). Las observaciones histológicas realizadas al MEB evidenciaron diferencias anatómicas entre los ejes embrionarios, además se comparó el tiempo inicial del almacenamiento (T0) y los ejes embrionarios a partir del tercer mes de almacenamiento (Fig. 16), observándose una plasmólisis en las células de la superficie del eje embrionario que sugieren una deshidratación. A los cinco meses de almacenamiento, en las células del eje embrionario se observaron

deformaciones, como rupturas de membranas y pérdida de la integridad de las paredes celulares ocasionada por el almacenamiento, cambios que sugieren que el deterioro de la bellota se debió al daño físico de las membranas ocasionado por la lipoperoxidación de los cuerpos lipídicos y deterioro de cuerpos proteicos (Fig. A1). Estos resultados indican que las bellotas presentan un proceso continuo e irreversible de deterioro durante el almacenamiento y que ocasiona la pérdida de su capacidad germinativa o viabilidad.

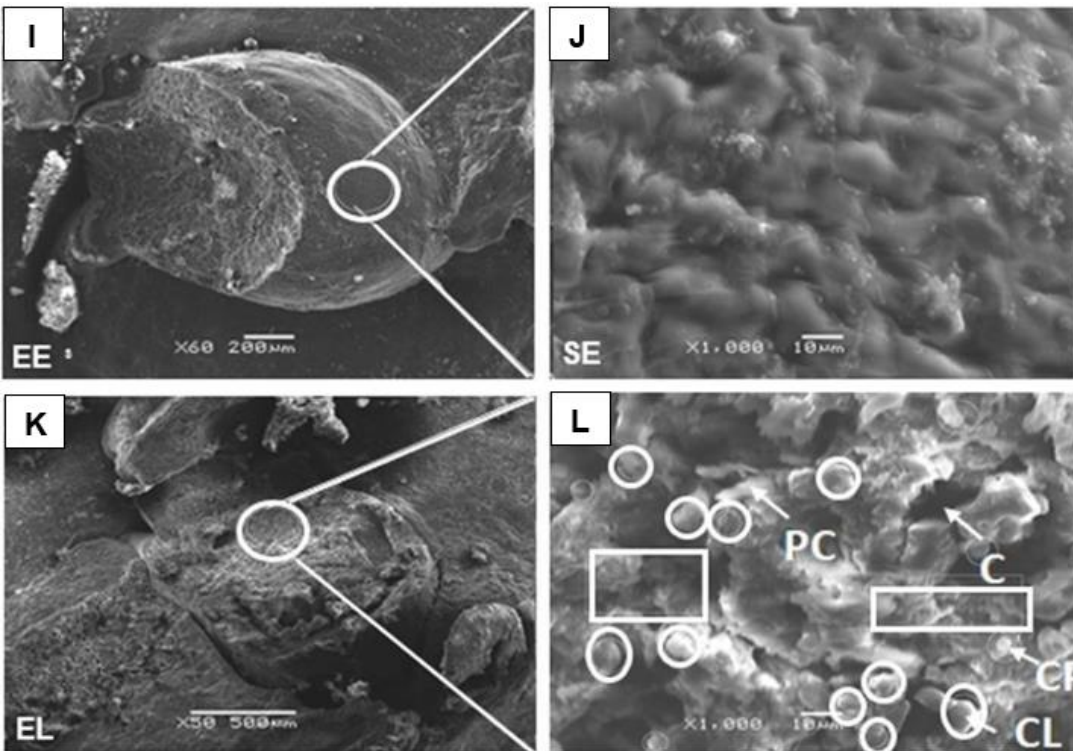
Tiempo inicial del almacenamiento (T0)



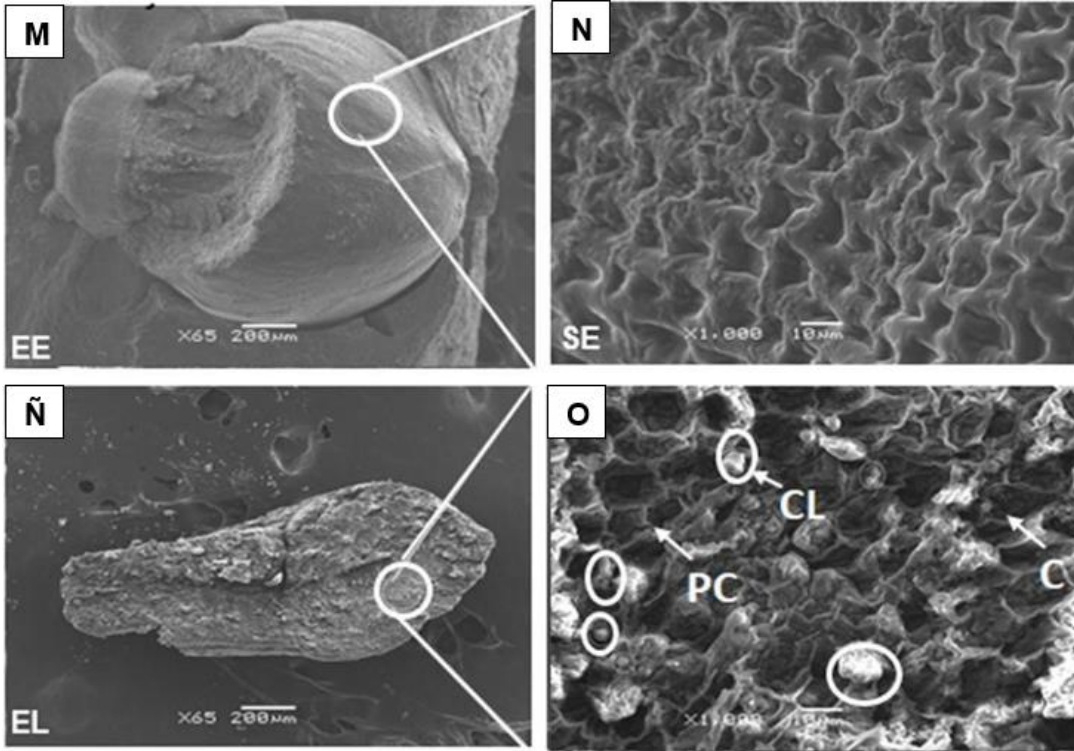
1° Mes de almacenamiento



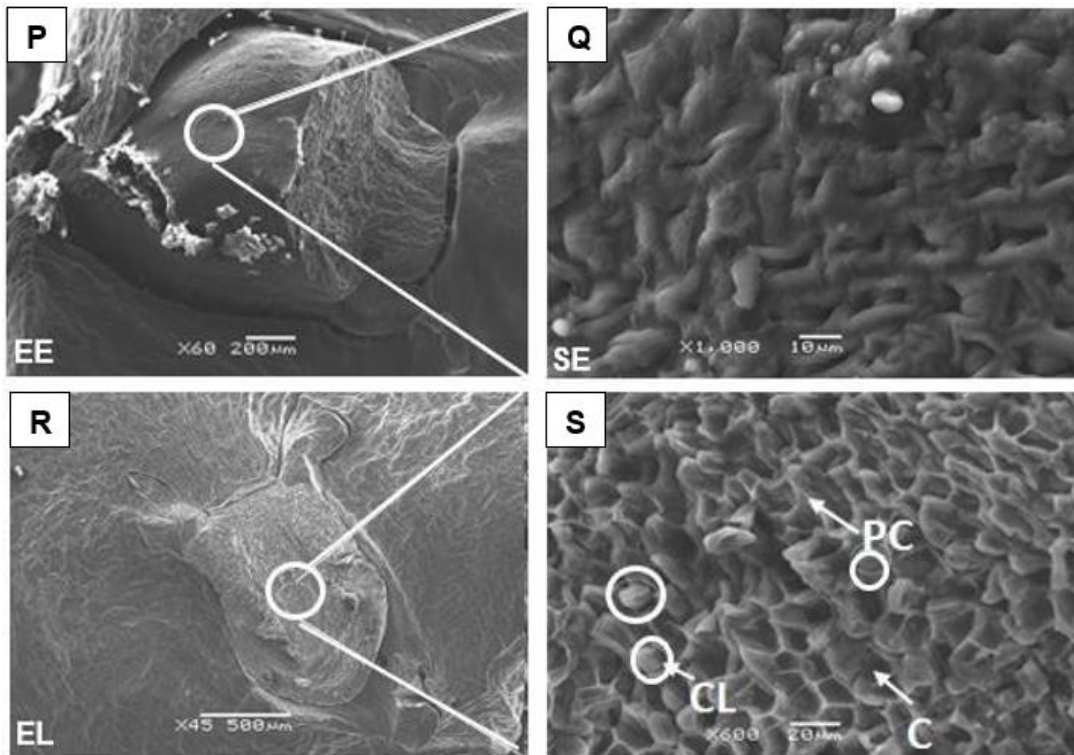
2° Mes de almacenamiento



3° Mes de almacenamiento



4° Mes de almacenamiento



5° Mes de almacenamiento

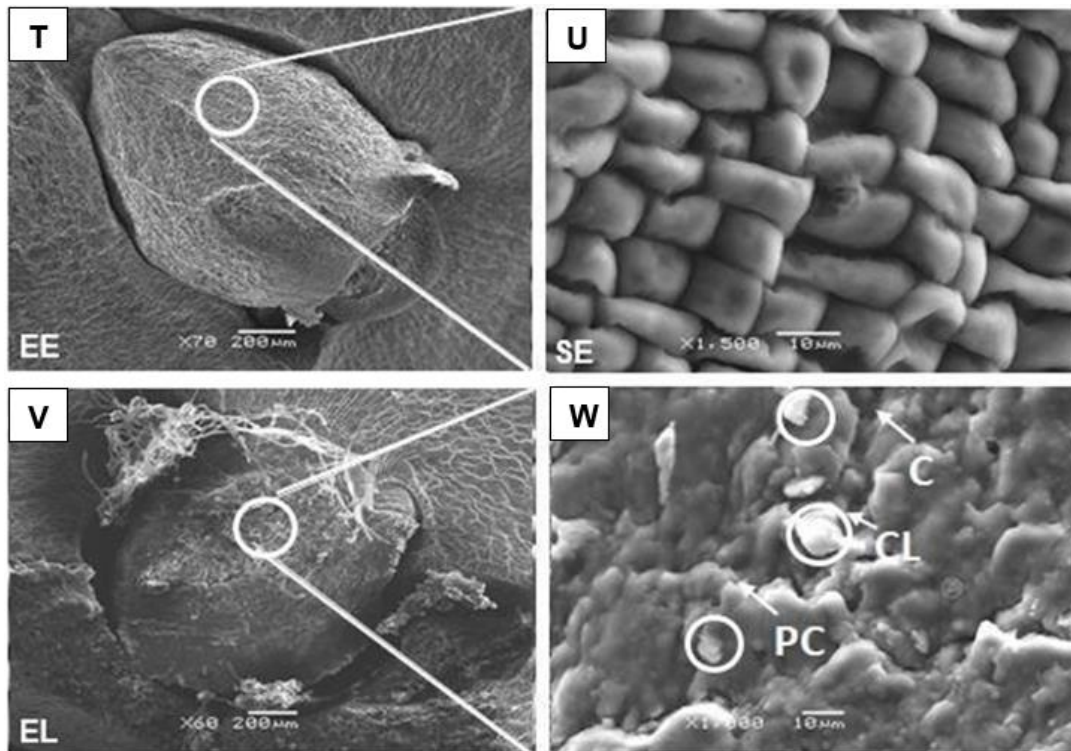


Figura 16. Micrografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) del eje embrionario de semillas de *Quercus laurina* a diferentes tiempos de almacenamiento a 4°C. Se muestra para cada micrografía eje embrionario completo de la bellota (EE) (A, E, I, M, P y T); superficie externa del eje embrionario (SE) (B, F, J, N, Q, y U); corte longitudinal del eje embrionario (EL) (C, G, K, Ñ, R, V); y acercamiento de la zona central del eje embrionario (D, H, L, O, S, W). PC, pared celular; C, citoplasma; CL cuerpos lipídicos; CP, cuerpos proteicos.

6.4 Patrón de la lipoperoxidación de los ácidos grasos insaturados

El efecto del estrés oxidativo en los lípidos presentes en las bellotas, mediante el perfil de ácidos grasos, permitió definir principalmente los siguientes ésteres metílicos de ácidos grasos saturados de las muestras de ácidos grasos: el ácido palmítico ($C_{16}H_{32}O_2$ – ácido hexadecanoico) y el ácido esteárico ($CH_3(CH_2)_{16}COOH$ - ácido octadecanoico), y los ácidos grasos insaturados como: ácido linoleico ($C_{18}H_{32}O_2$ -ácido 9,12 octadecadienoico), y el ácido oleico ($C_{18}H_{34}O_2$ – ácido 9,

octadecanoico), así como el patrón interno: ácido heptadecanoico. La figura 17 muestra el espectro de referencia de los ácidos grasos para las bellotas de *Q. laurina* al T0, se observan los picos de referencia que corresponden a los ácidos grasos saturados e insaturados con su correspondiente tiempo de retención (RT).

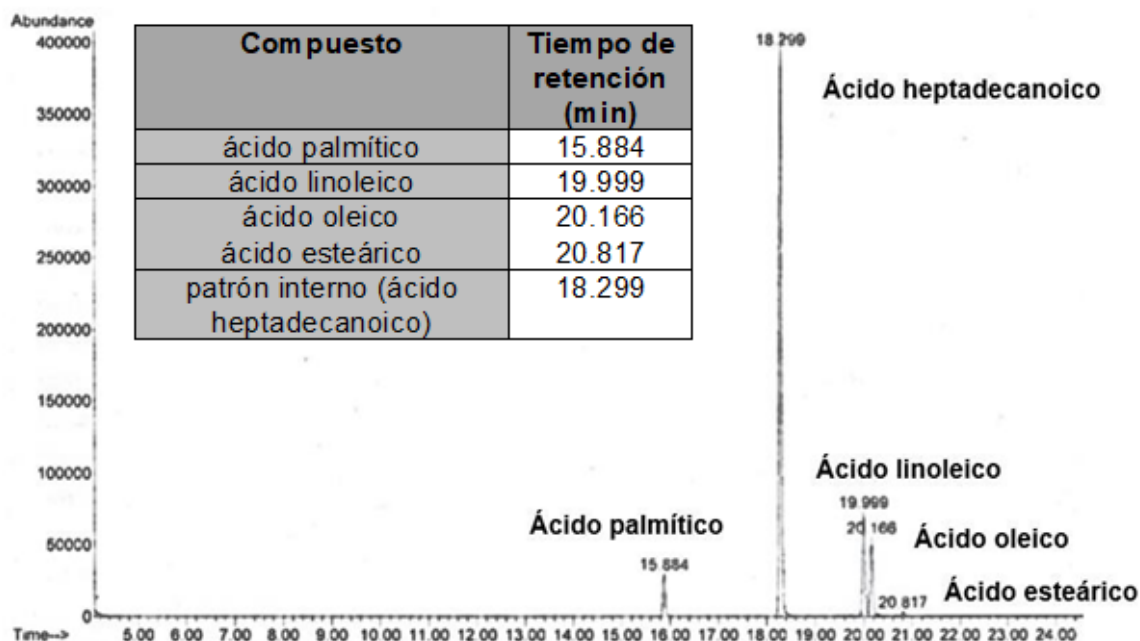
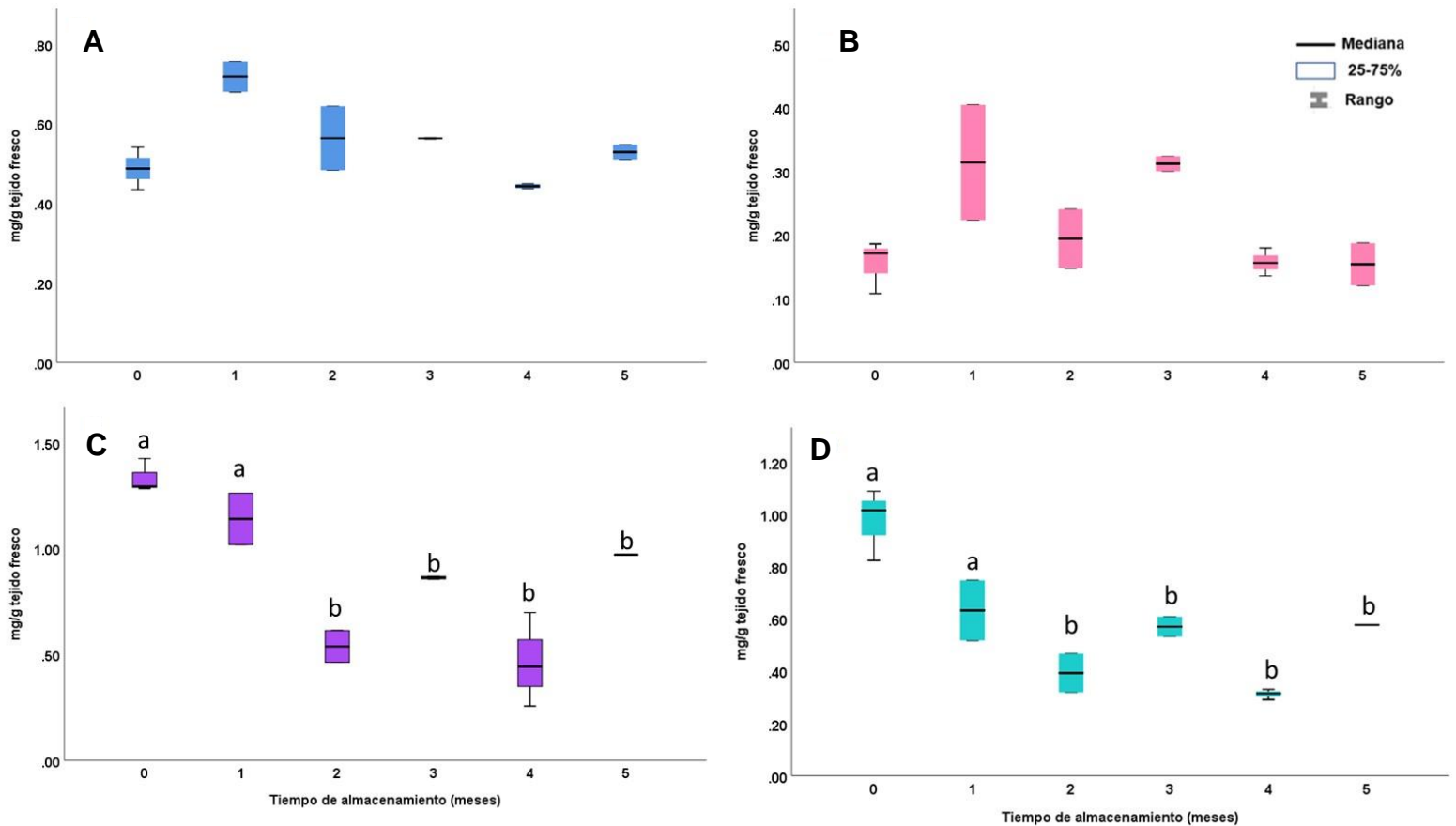


Figura 17. Cromatograma de los ácidos grasos presentes en el extracto crudo del tejido de las bellotas de *Q. laurina*.

Con relación al contenido de los ácidos grasos en las bellotas almacenadas a 4 °C, se observó una disminución en la concentración de los ácidos insaturados, siendo mayor la disminución conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento y las semillas fueron envejeciendo (Fig. 18). El ácido linoleico disminuyó 51.7 % con respecto al T0, a los 5 meses de almacenamiento (de 0.924 a 0.446 mg/g respectivamente). El ácido oleico disminuyó 52.4 % con respecto al T0 a los 5 meses de almacenamiento (de 1.288 a 0.613 mg/g, respectivamente). La concentración de los ácidos grasos saturados durante el almacenamiento fue constante, el ácido

palmitico fluctuó en niveles de 0.487 a 0.528 mg/g, y el ácido esteárico de 0.155 a 0.167 mg/g, de tal manera que no mostraron una diferencia significativa en las bellotas en el tiempo de almacenamiento.



Por otro lado, cuando se relacionaron los datos obtenidos del porcentaje de germinación (Fig. 15) y los datos de los niveles de ácidos grasos (Fig. 18), se

observó que existe una relación positiva estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el descenso de los niveles de ácidos grasos, principalmente los de tipo insaturado $r = 0.95$ con oleico y $r = 0.89$ linoleico y la disminución de la germinación (Fig. 19).

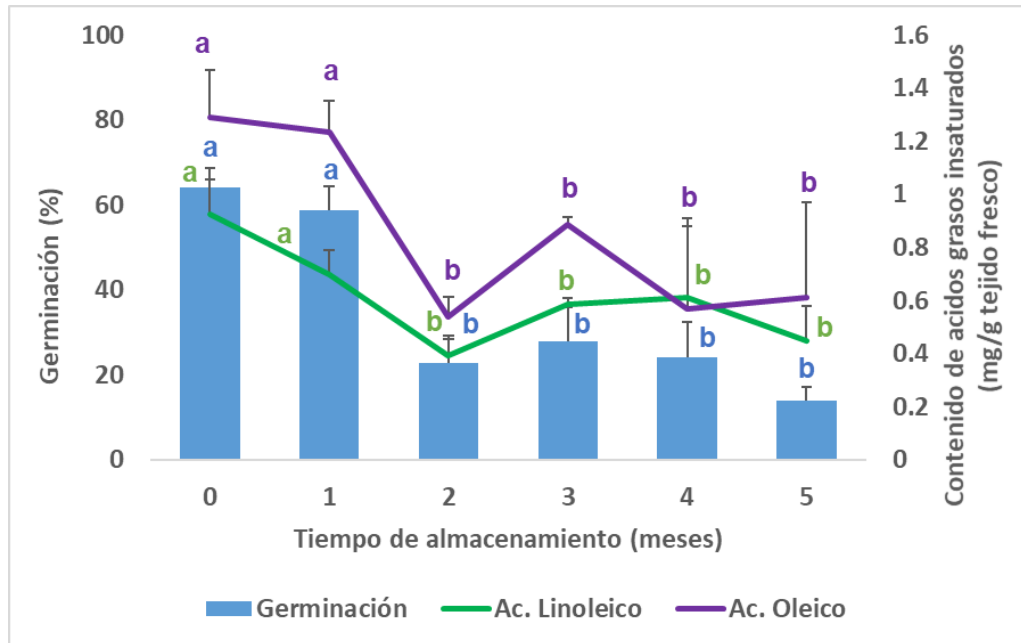


Figura 19. Correlación del contenido de ácidos grasos insaturados y el porcentaje de germinación de bellotas de *Q. laurina*, almacenadas durante 5 meses a 4 °C. Se muestra el promedio de tres replicas \pm e.e. Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas, prueba de ANOVA de un factor seguida de la prueba de Tukey con $p < 0.05$.

6.5 La actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, APX y GR

Los resultados mostraron que la actividad enzimática de SOD disminuyó en un 33.6 % en el segundo mes de almacenamiento en relación con el mes 0. Esta disminución se mantuvo sin ningún cambio significativo en los siguientes meses del almacenamiento (Figura 20 A).

La actividad de CAT disminuyó drásticamente hasta un 73 % en el segundo mes de almacenamiento con relación al mes 0. Al igual que la actividad de SOD, durante los siguientes meses esta disminución se mantuvo y no se observaron cambios significativos en la actividad de CAT (Figura 20 B).

Por el contrario, la actividad de APX aumentó significativamente hasta un 132.5 % y 137.8 % con relación al tiempo inicial en el primer y segundo mes de almacenamiento respectivamente, posteriormente en el tercer y quinto mes de almacenamiento la actividad disminuyó gradualmente hasta un 35.4 % (Figura 20 C).

Asimismo, la actividad de GR aumentó significativamente hasta un 319.7 % en relación con el control a partir del tercer mes de almacenamiento, sin cambios significativos en el cuarto y quinto mes (Figura 20 D).

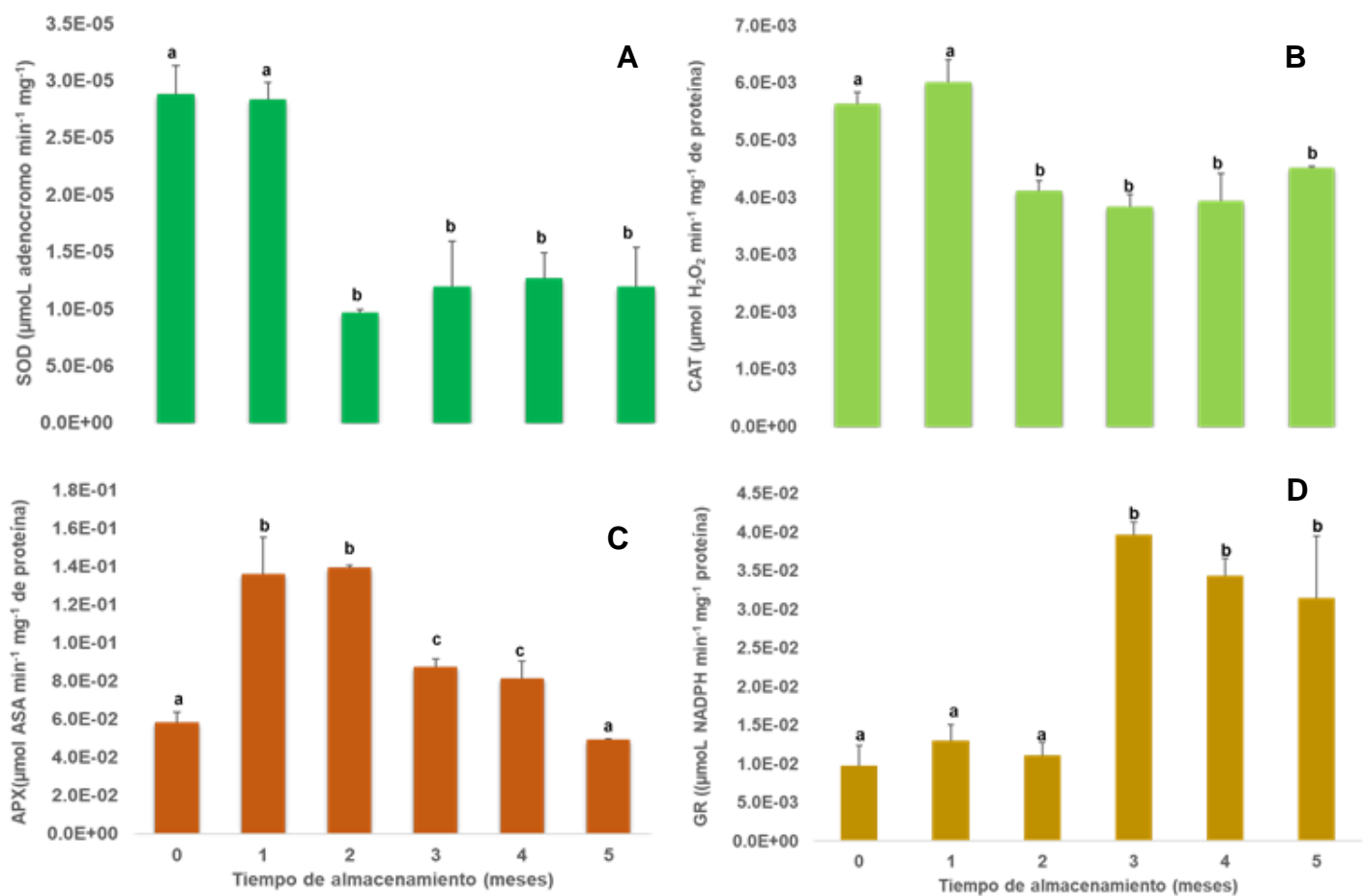


Figura 20. Cambios en las actividades superóxido dismutasa (SOD) (A), catalasa (CAT) (B), ascorbato peroxidasa (APX) (C) y glutatión reductasa (GR) (D) en ejes embrionarios de bellotas de *Q. laurina*, almacenadas durante 5 meses a 4 °C. Se muestra el promedio de tres replicas \pm e.e. Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas, prueba de ANOVA de un factor seguida de la prueba de Tukey con $p < 0.05$.

Además, para asociar la función de las enzimas antioxidantes con respecto a la capacidad de germinación de las bellotas de *Q. laurina* durante el almacenamiento a 4 °C, se analizó la relación entre el porcentaje de germinación mostrado en la figura 15 y la actividad enzimática de cada una de las enzimas antioxidantes mostradas en la Figura 20. Estos análisis mostraron que las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) tienen una correlación positiva ($r=0.96$ y 0.86 , respectivamente) con respecto a la germinación (Figuras 21 A y B). Estos resultados podrían indicar una deficiencia de estas dos enzimas para contrarrestar a las ERO. Sin embargo, en la actividad enzimática de Ascorbato peroxidasa (APX) se observó una correlación positiva estadísticamente significativa ($p<0.05$) con $r= 0.13$ (Figura 21C), y la actividad enzimática de Glutación reductasa (GR) mostró una correlación negativa con $r= -0.6$ con respecto a la germinación (Figura 21D). Este resultado podría indicar que APX no está interviniendo considerablemente en la remoción de ERO, pero Glutación reductasa si podría estar participando en la remoción de las ERO.

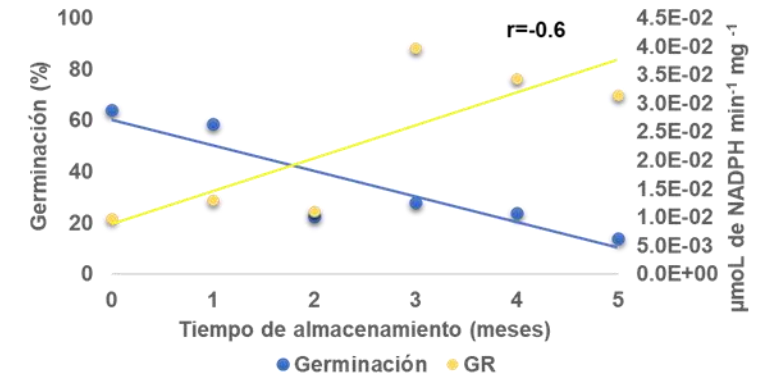
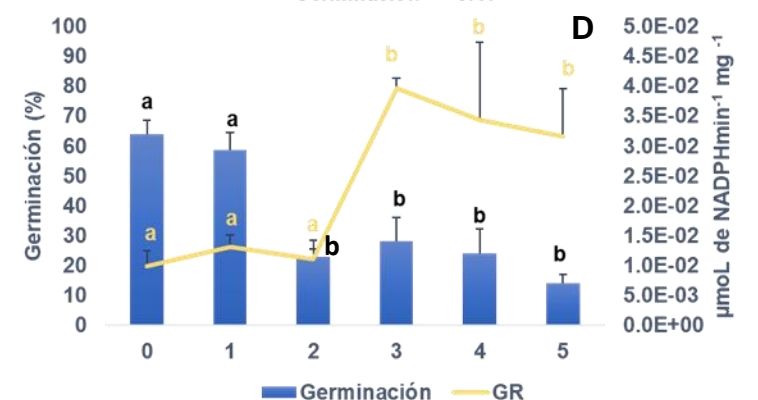
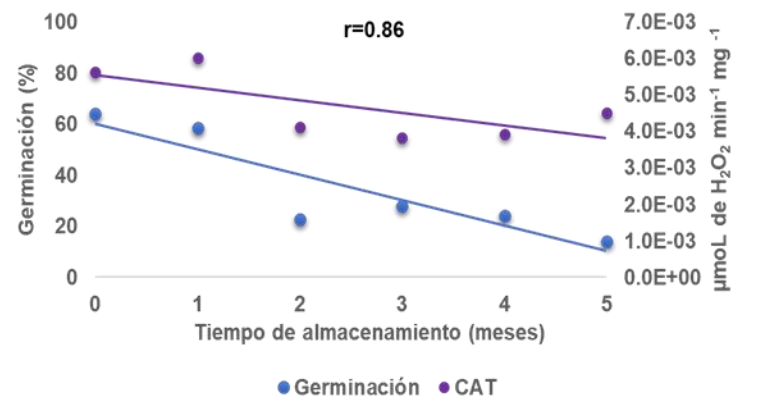
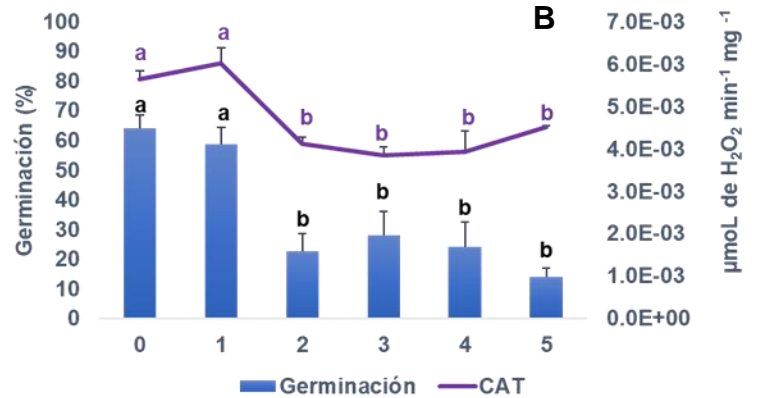
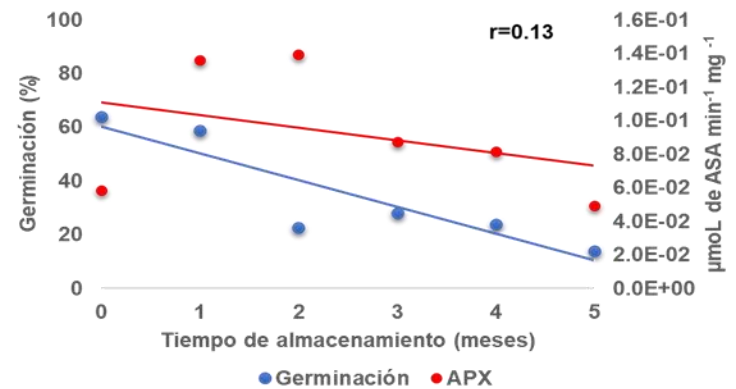
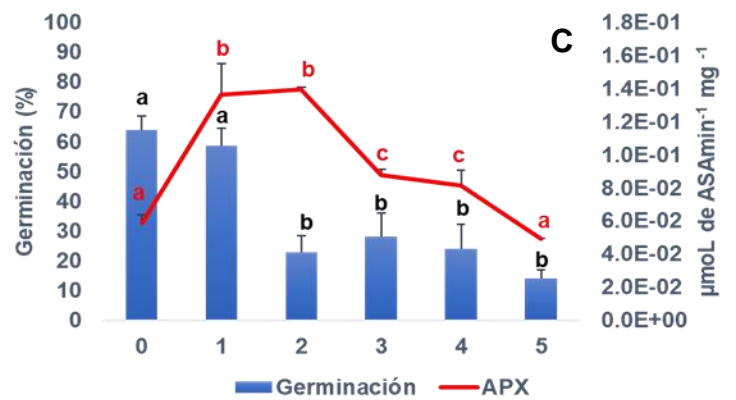
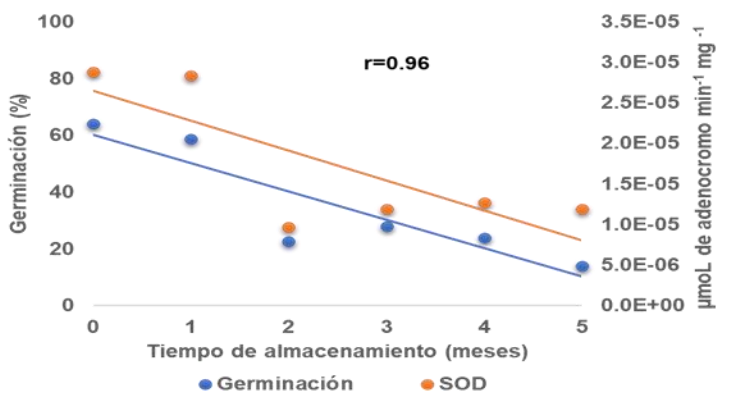
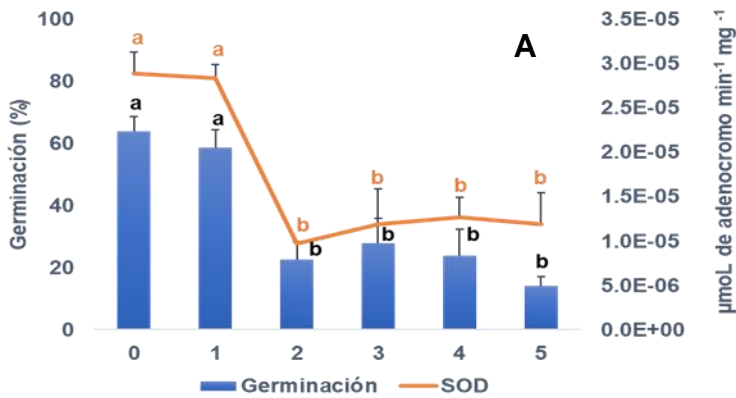


Figura 21. Cambios en las actividades y coeficiente de correlación de las enzimas antioxidantes: Superóxido dismutasa (SOD) (A); Catalasa (CAT) (B); Ascorbato peroxidasa (APX) (C) y Glutación reductasa (GR) (D), con respecto al porcentaje de germinación en ejes embrionarios de bellotas de *Q. laurina*, almacenadas durante 5 meses a 4 °C. Se muestra el promedio de tres replicas \pm e.e. Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas, prueba de ANOVA de un factor Germinación ($F_{(5,12)} = 11.214$; 0.00344) SOD ($F_{(5,12)} = 13.925$; $p = 0.001$), CAT ($F_{(5,12)} = 14.609$; $p = 0.000253$), APX ($F_{(5,12)} = 201.236$; $p = 1.0693 \times 10^{-9}$) y GR ($F_{(5,12)} = 13.552$; $p = 0.001$) seguida de la prueba de Tukey con $p < 0.05$.

6.6 El estrés hídrico y el crecimiento de las plántulas de *Quercus laurina*

a) Conductancia estomática (gs)

La respuesta de la conductancia estomática de las plántulas de encino a diferentes condiciones de estrés hídrico se determinó en hojas maduras y sanas durante los 63 días de tratamiento. Los resultados muestran que en los primeros días de experimentación (0-20 días) no se observaron diferencias significativas en la conductancia estomática, sin embargo, los siguientes días (24 - 35 días) comenzó una disminución de la conductancia estomática de las plántulas expuestas a un estrés hídrico moderado de un 76.7 % y en el severo de 76.8 % con respecto al control, sin mostrar diferencias estadísticas entre el estrés moderado y severo. Posteriormente, en los días consecutivos (38-63 días) se observó que las plántulas control tuvieron valores promedio más altos de conductancia estomática de $705.3 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ comparado con las plántulas de estrés moderado y severo. Las plántulas con estrés moderado mostraron una sensibilidad intermedia al estrés hídrico (entre las plántulas control y las plántulas con estrés severo) con una disminución del 24.7 % en los valores de gs (en promedio $531.6 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), mientras que una fuerte reducción del

44.5% de g_s (en promedio $391.3 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) se observó en las plántulas con estrés severo (Figura 22).

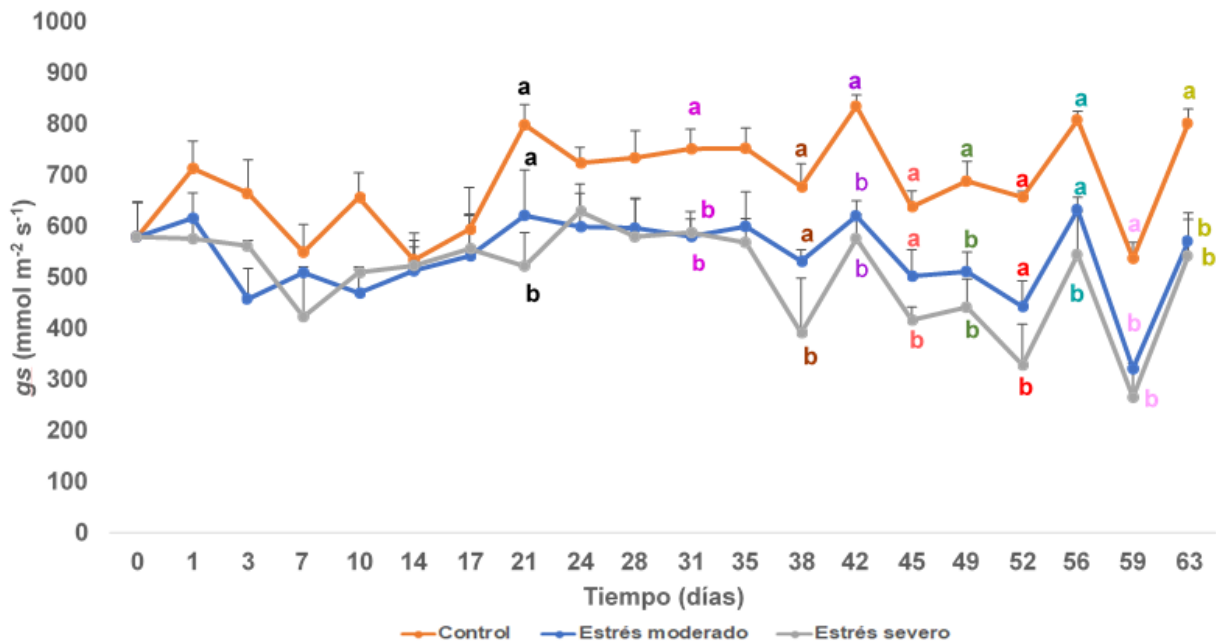


Figura 22. Conductancia estomática (g_s) de las 2 hojas de 4 plántulas de *Q. laurina* de 7 meses, en invernadero sometidas a estrés hídrico durante 63 días. Se muestra el promedio de tres réplicas \pm e.e. Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas, prueba de ANOVA de un factor seguida de la prueba Tukey con $p < 0.05$.

b) El crecimiento de las plántulas de *Q. laurina*

Por otro lado, con el objetivo de evaluar el efecto del estrés hídrico en el crecimiento de las plántulas de *Q. laurina* se realizó un análisis de crecimiento clásico (RGR). Los resultados de este análisis mostraron que la biomasa de las plantas sometidas a estrés moderado y a un estrés severo disminuyó el 34.5 % y el 81.0 % respectivamente, con relación a la biomasa de las plántulas del control (Fig. 23).

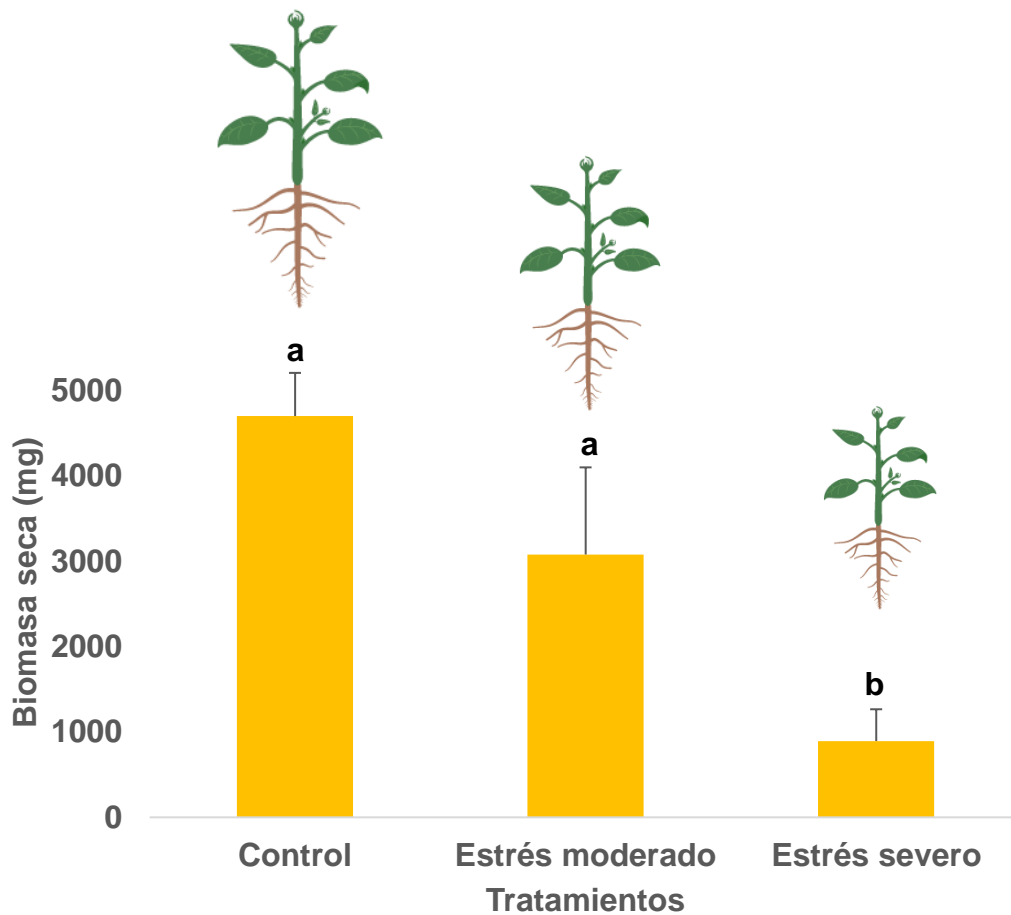


Figura 23. Biomasa seca total de plántulas de *Q. laurina* de 7 meses de edad, bajo diferentes condiciones de estrés hídrico. Se muestra el promedio ($n=8 \pm e.e$). Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas, prueba de ANOVA de un factor ($F_{(2,21)}=12.707$; $p=0.000242$), seguida de una prueba de Tukey con $p<0.05$.

En la tasa absoluta de crecimiento (AGR) se puede observar que las plántulas de los tratamientos disminuyeron su crecimiento con respecto a las plántulas del control (Fig. A2). Las plántulas sometidas a un estrés hídrico moderado tuvieron una disminución del 34.5 % con respecto al control; mientras que las plántulas expuestas a un estrés hídrico severo fueron afectadas, con un crecimiento del 81.0 % con respecto a las plántulas control (Figura 24A). En la figura 24B se observa que los valores de la tasa relativa de crecimiento (RGR) también mostraron diferencias entre

las plántulas expuestas a estrés hídrico (moderado y severo) con respecto al control. Se observó que la tasa del crecimiento de las plántulas sometidas a un estrés moderado fue más lenta con 30.5 % respecto a las plántulas del control; mientras que las plántulas bajo un estrés severo tuvieron una disminución en la tasa de crecimiento de 71.1 % con respecto a las plántulas del control.

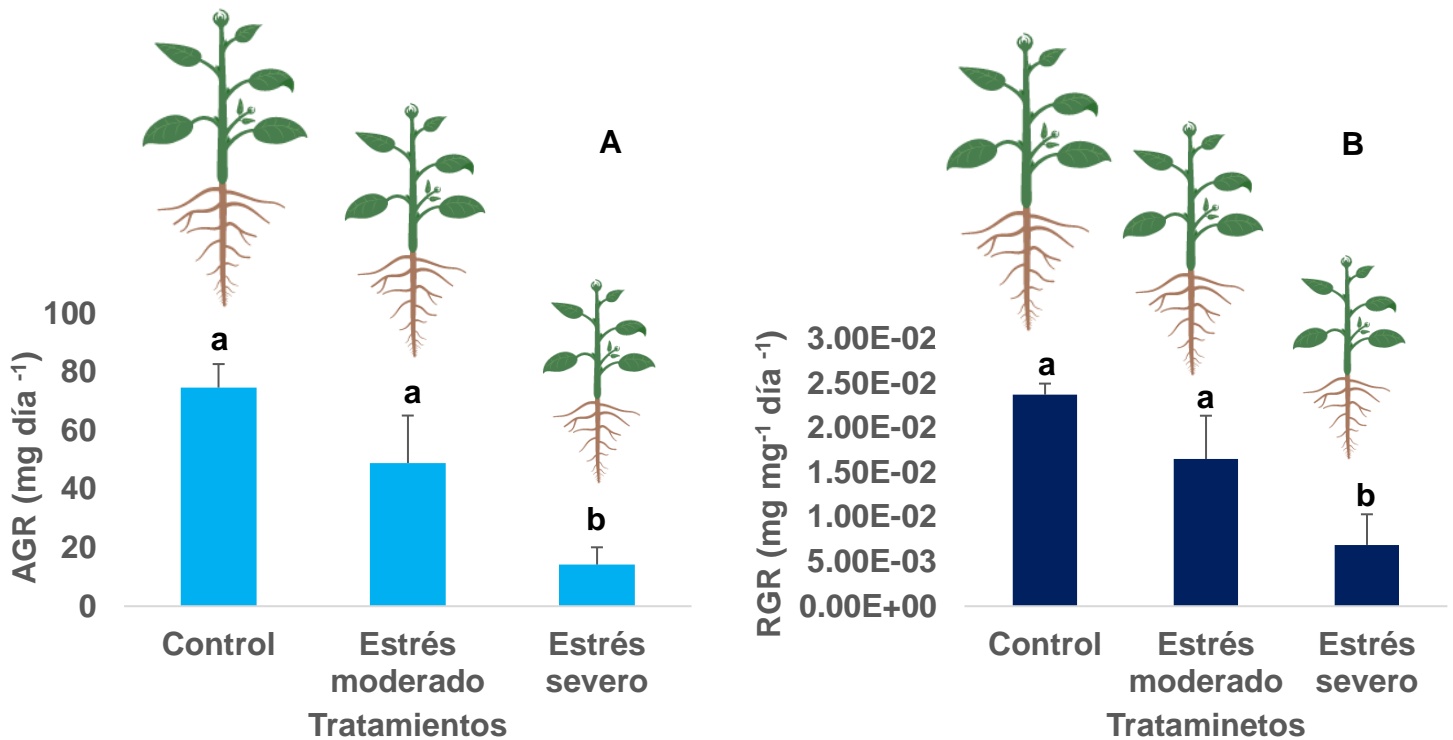


Figura 24. Tasa absoluta de crecimiento (AGR) (A) y Tasa relativa de crecimiento (RGR) (B) de plántulas de *Q. laurina* de 7 meses de edad, bajo diferentes condiciones de estrés hídrico. Se muestra el promedio \pm e.e. (n=8). Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas, prueba de ANOVA de un factor, seguida de la prueba de Tukey con $p < 0.05$.

Con respecto a los componentes de la RGR, la tasa de asimilación neta (NAR), presentó una tendencia a disminuir en 22.5 % en plantas sometidas a un estrés moderado y del 56 % en plántulas bajo un estrés severo con respecto al control

(Figura 25A). Mostrando diferencias significativas en la producción de biomasa total por unidad de área foliar $p < 0.05$. Además, los valores promedio de área foliar específica (SLA), que indican cuanta superficie fotosintética se produce por gramo de biomasa invertida en la hoja no presentaron diferencias significativas; las plántulas sometidas a estrés hídrico moderado ($189.7 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$) y severo ($195.3 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$) presentaron valores similares a las plántulas del control ($190.8 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$), esto indica que el grosor de las hojas permaneció estable (Fig. 25B). Así mismo, los valores de la proporción de área foliar (LAR) no mostraron diferencias significativas entre las plantas de los diferentes tratamientos. Las plántulas bajo un estrés moderado y severo presentaron la misma proporción de área fotosintética por biomasa total que las plántulas del control (Fig. 25C).

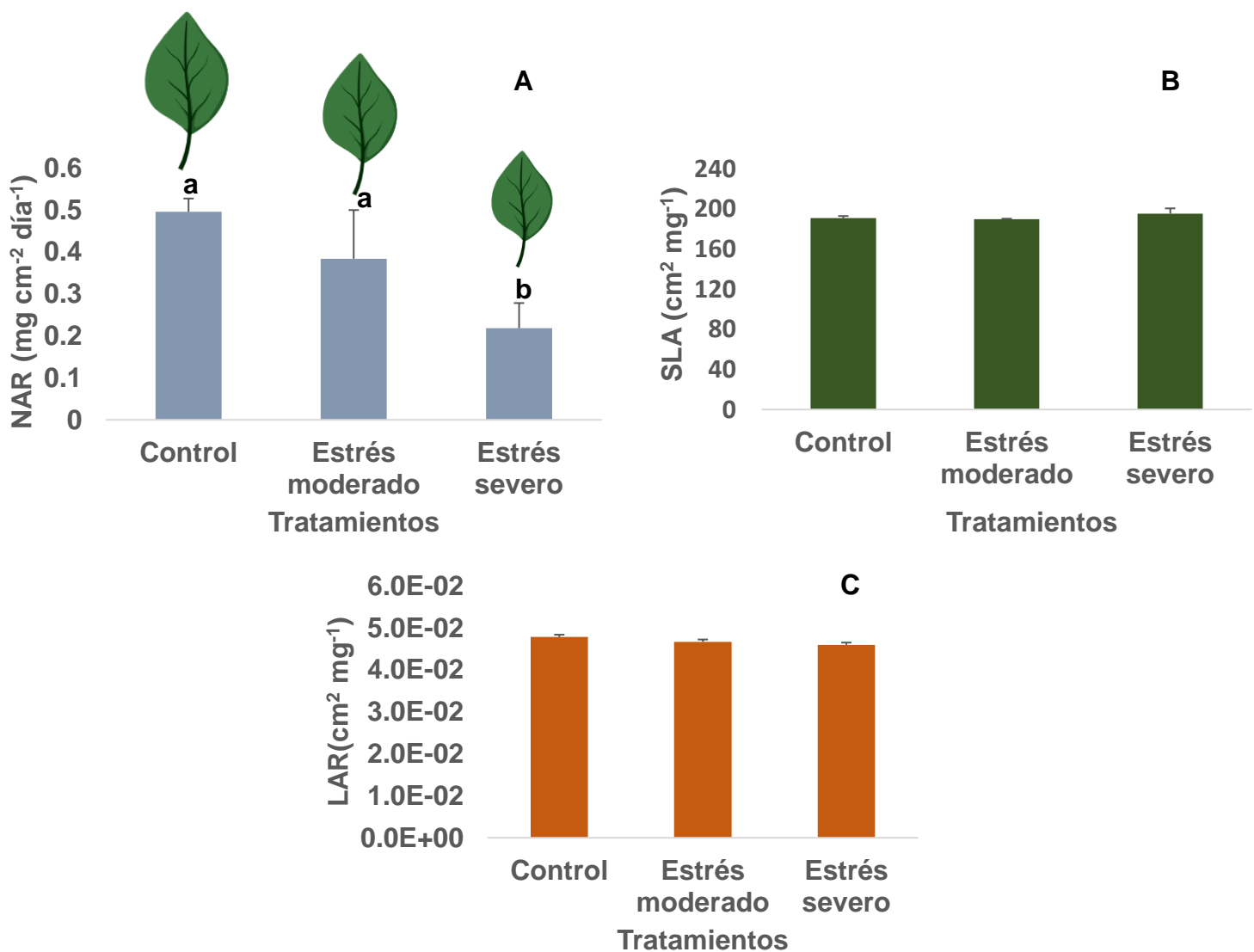


Figura 25. Componentes de la tasa relativa de crecimiento de plántulas de siete meses de edad de *Q. laurina*, en condiciones de invernadero, bajo diferentes condiciones de estrés hídrico. Tasa de asimilación neta -NAR- (A), Área foliar específica -SLA- (B), Proporción de área foliar -LAR- (C). Los datos representan promedio \pm e.e. (n=8). Letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas, prueba de ANOVA de un factor con $p > 0.05$, no significativa.

En la asignación de biomasa a las diferentes partes de las plantas, se observó que las plántulas en todos los tratamientos tuvieron valores similares de asignación de biomasa. Por lo tanto, no fueron cambios estadísticamente significativos. En las plántulas bajo un estrés moderado y severo tuvieron una asignación de biomasa similar en raíz (RWR), tallo (SWR) y hojas (LWR) con respecto al control. Con relación al coeficiente alométrico (R/S), los valores de las plántulas bajo un estrés hídrico y el control fueron menores a 1, lo que indica que las plántulas destinan una mayor cantidad de recursos a la parte aérea de la plántula (tallo y hojas) (estos valores se presentan sobre cada columna de asignación de biomasa de la Fig. 26).

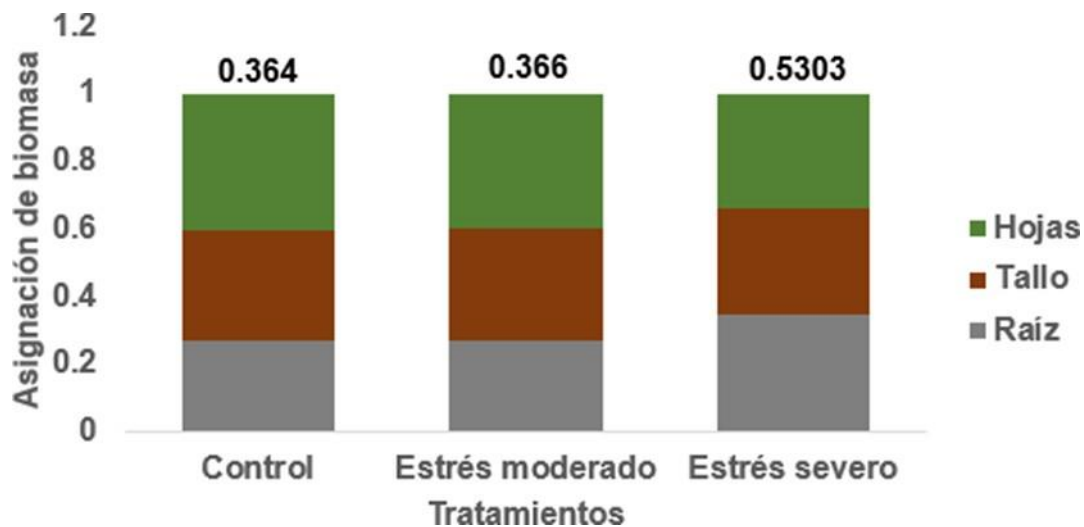


Figura 26. Asignación de biomasa a raíz (RWR), tallo (SWR), hojas (LWR) de plántulas de siete meses de edad de *Q. laurina*, en condiciones de invernadero, bajo diferentes condiciones de estrés hídrico. El valor numérico sobre cada barra corresponde al coeficiente alométrico R/S. Los datos representan promedio \pm e.e. (n=8). Prueba de ANOVA de un factor con $p > 0.05$, no significativa.

7. DISCUSIÓN

7.1 El número de bellotas viables de *Q. laurina* disminuye por la infestación de insectos previo al almacenamiento

En este estudio se observó que el número de bellotas viables de *Q. laurina* disminuye por la infestación de insectos previo al almacenamiento. Las bellotas de *Q. laurina* que perdieron su viabilidad representaron un 66 %, y el 25.2 % fueron parasitadas por curculiónidos (Curculionidae) antes de su almacenamiento; esto indica que se pierde el 91.2 % de las bellotas recolectadas para el proceso de almacenamiento. Este porcentaje es similar comparado con otras especies como las bellotas de *Q. polymorpha* en donde el 70 % de las bellotas estaban parasitadas por insectos adultos, y el 20 % perdió su viabilidad debido a factores fisiológicos o infestación por hongos (González-Salvatierra et al., 2013). Además, en *Q. candicans*, se ha reportado que hasta el 21.6 % de las bellotas son infestadas por insectos (Díaz-Fleischer et al., 2010). Inclusive, se ha sugerido que el parasitismo por curculiónidos en encinos de México ocurre cuando las bellotas todavía se encuentran en el árbol madre (González-Salvatierra et al., 2013). Sin embargo, aún las bellotas que se sumergieron en la prueba de flotación pueden ser inviables debido a otros factores: como la desecación o carencia de embrión. Estas bellotas inviables no se pueden identificar como tales en el momento de la recolecta, puesto que el daño no es evidente sino hasta varios meses más tarde (González-Salvatierra et al., 2013). Por este motivo, en el presente trabajo las bellotas fueron inspeccionadas con la técnica de rayos X para evaluar si presentaban algún daño, y así utilizar bellotas sanas y viables para los experimentos. Los resultados de esta técnica mostraron que las bellotas estaban infectadas por curculiónidos, debido a que los cotiledones y los embriones habían sido consumidos por los parásitos (Figura 14). Comparado con los resultados obtenidos en el trabajo de Díaz-Fleischer et al. (2010), en los cuales se reporta que las bellotas de *Q. candicans* mostraban un daño por las larvas de los insectos, donde el 36.1 % representa al orden Coleóptera (curculiónidos) y el 31.5 % a Lepidóptera, a diferencia de *Q. agrifolia* en donde el 70 % y el 30 % representa a los curculiónidos y a los lepidópteros,

respectivamente. Estos estudios podrían corroborar que las bellotas infestadas por insectos, o dañadas por factores fisiológicos pueden ser una causa importante en la pérdida de bellotas viables en la recolecta, lo cual impide obtener una muestra sana de bellotas tanto para su almacenamiento, como para programas de reforestación.

7.2 La característica de recalcitrancia en la especie de *Q. laurina* puede contribuir a la disminución de la germinación.

De acuerdo con Jöet et al., (2013), los porcentajes de germinación y el desarrollo normal de las plántulas de *Q. ilex* estuvieron estrechamente relacionados con el contenido de agua de las semillas, debido a que la especie estudiada manifestó pérdida de viabilidad al aumentar la desecación. Lo que muestra que la desecación *in situ* es una causa importante de mortalidad. Estos resultados establecen que la sensibilidad a la desecación de semillas es un rasgo funcional clave que puede influir en el éxito del reclutamiento de semillas recalcitrantes templadas. Esto es común en encinos, como lo constatan Morgan y Brohaker (1986) al exponer que la desecación provocó una disminución de la germinación en bellotas de *Q. virginiana*. Y en semillas maduras recién desprendidas en *Q. rubra* y *Q. robur* reportado por Pritchard (1991); Finch-Savage (1992); Finch-Savage y Blake (1994). Sin embargo, las especies responden de distinta forma ante la pérdida de humedad.

Como lo reportó Zavala (2004) mediante los resultados de la prueba de germinación de bellotas sometidas a desecación, cuyos resultados mostraron que la variación en el contenido de humedad de las bellotas tuvo efectos en la variación del porcentaje de germinación de las mismas en las especies *Q. crassifolia* y *Q. microphylla*, *Q. glabrescens*, *Q. rugosa*, *Q. gresggii*, *Q. desertícola* y *Q. laurina*, y que mostraron una correlación positiva en más del 80 % entre ambas variables, específicamente, en el caso de *Q. laurina* que tuvo una $R^2 = 0.8019$, debido a que la germinación de la bellota disminuyó hasta en un 76 % después de 4 semanas de almacenamiento a 20 °C, considerándola como moderadamente sensible a la desecación. Estos datos muestran que la resistencia a la desecación no depende del subgénero, como tampoco del tiempo involucrado en el desarrollo de las bellotas

(anuales o bianuales). Sino que, puede deberse a particularidades específicas de cada especie. Estos datos incrementan la gama de características con acentuada variabilidad en encinos mexicanos. Los resultados obtenidos en este estudio con *Q. laurina* mostraron que existe una disminución de la germinación de las bellotas hasta en un 40 % después de dos meses de almacenamiento a 4 °C; estos resultados sugieren que la bellota, incluso a bajas temperaturas podrían tener una pérdida de humedad y contribuir a la pérdida de su viabilidad, dificultando así su almacenamiento. Esto lleva a pensar que la germinación depende notablemente del contenido de humedad de la bellota, y podría dificultar la regeneración natural de *Q. laurina*. Los resultados de este estudio podrían contribuir con información para fines de conservación de material genético *in situ* o *ex situ* (Aguirre-Bolaños et al., 2017).

7.3 El almacenamiento a 4° C de las bellotas de *Q. laurina* no preservó la germinación ni la viabilidad

La germinación de las bellotas y el establecimiento de plántulas son etapas importantes durante el ciclo de vida de los encinos, y ambas están influenciadas directamente por la longevidad de estas, lo cual es un factor crucial para la conservación de los recursos fitogenéticos (Zhou et al., 2020). De hecho, el almacenamiento a largo plazo de semillas en un ambiente con bajo contenido de humedad es el método más utilizado para la conservación *ex situ* de los recursos fitogenéticos en bancos de semillas. Sin embargo, existen otros factores que influyen en la preservación de estos recursos. Dentro de los factores ambientales que se han estudiado, y que intervienen en el almacenamiento de las bellotas, está la temperatura, considerado como el factor clave que influye en su longevidad, generalmente las bellotas suelen almacenarse a una baja temperatura (4 - 5 °C). Sin embargo, aún almacenando las bellotas a estas temperaturas las especies de *Q. polymorpha* (González-Salvatierra et al., 2013) y *Q. ilex* (Pasquini et al., 2012) disminuyen su germinación hasta un 16.5 % y 18.3 % después de 1 año y 10 meses de almacenamiento, respectivamente. En comparación con nuestros resultados, en los que la germinación de bellotas de *Q. laurina* fue de 20 % a los dos meses de almacenamiento a 4 °C, estos hallazgos muestran que *Q. laurina* parece tener

menor capacidad para mantener la viabilidad en comparación con otras especies de encinos, por lo tanto, se puede decir que *Q. laurina* tiene bellotas más susceptibles a perder su viabilidad conforme pasa el tiempo si son almacenadas incluso a bajas temperaturas. Lo que sugiere que hay otro factor, además de la temperatura, el cual podría estar involucrado en la pérdida de viabilidad de las bellotas, y que puede estar relacionado con un metabolismo activo, debido a las altas tasas de respiración de las bellotas durante el almacenamiento. Aunado a esto los mecanismos subyacentes a la longevidad podrían estar asociados con un desbalance entre la producción y la eliminación de ERO (Lee et al., 2019; Waterworth et al., 2016), y que inevitablemente exponen a las bellotas al daño oxidativo mediado por ERO. Incluso las bellotas pueden perder su capacidad de germinación debido a factores ambientales, por ejemplo, la pérdida excesiva de agua o la desecación del embrión (Závala-Chávez, 2004). Por otro lado, Pammenter et al. (1998) han reportado que si las semillas recalcitrantes se mantienen con un alto contenido de agua durante el almacenamiento, el vigor de germinación no alcanza los mismos niveles de las semillas ortodoxas. Por lo cual, el estrés oxidativo ha sido implicado como un importante contribuyente al deterioro y a la longevidad de la semilla. Se ha documentado que esto depende del delicado equilibrio entre la producción de ERO y la capacidad antioxidante (Bailly et al., 2008), dando como resultado la pérdida de viabilidad durante el secado de semillas recalcitrantes, que se acompaña de una pérdida del potencial antioxidante celular y una progresiva acumulación de ERO (Bailly, 2004).

Las ERO generalmente se consideran moléculas tóxicas, siendo las membranas plasmáticas los principales sitios de lesión, debido a la reacción de los radicales libres que promueven la degradación de los fosfolípidos (lipoperoxidación) (Mira et al., 2015) y la pérdida de la integridad estructural de las membranas. En la etapa de deshidratación, el proceso de la desintegración de la membrana puede comenzar en los ejes embrionarios (Pasquini et al., 2012).

Por lo tanto, la tolerancia a la desecación podría estar relacionada con la capacidad de eliminar estos compuestos para evitar daños perjudiciales, como ha sido

mostrado en otros estudios, en los que la adquisición y la pérdida de tolerancia a la desecación están estrechamente relacionadas con la capacidad de las células para eliminar ERO (Bailly, 2004).

En este estudio, la evaluación de la actividad de las principales enzimas antioxidantes mostró que la actividad enzimática de la Superóxido dismutasa (SOD) en los ejes embrionarios de las bellotas de *Q. laurina*, almacenadas a 4 °C, disminuyó significativamente en un 66.4 % a los dos meses de almacenamiento. Esto sugiere que cuando se pierde agua de las células de los ejes embrionarios durante la deshidratación lenta de las bellotas de *Q. laurina*, SOD no ayuda a la bellota a eliminar el radical superóxido formado (Pasquini et al., 2012). Asimismo, el radical superóxido que no es contrarrestado adecuadamente genera peróxido de hidrógeno, el cual debería ser contrarrestado por la enzima catalasa (CAT), pero la actividad enzimática de CAT también disminuye drásticamente en un 73 % después de dos meses de almacenamiento. Esta inhibición de la actividad de la SOD como de la CAT, sugiere que hay un incremento de superóxido y que podría promover el desequilibrio entre los procesos pro-oxidativos y antioxidantes, y contribuir a generar un estrés oxidativo seguido de la muerte celular programada (Bailly, 2004). Este comportamiento podría ser una evidencia de una mayor producción de ERO en bellotas sometidas a un metabolismo respiratorio desequilibrado que está involucrado en las reacciones químicas que forman parte de la regulación y la interacción entre las rutas metabólicas, y puede tener como consecuencia alteraciones en la síntesis de los azúcares necesarios durante el proceso de germinación, además de cambios en el contenido lipídico y una deficiencia en la síntesis de compuestos intermedios (piruvato, malato, Acetil-CoA, entre otros) que son precursores biosintéticos en las rutas metabólicas. Por otro lado, las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión juegan un papel esencial en la eliminación efectiva de ERO (Ribas-Carbó et al., 2014; Noctor et al., 2012; Yin et al., 2014). Asimismo, la actividad de APX, que también contribuye a la eliminación del H₂O₂, disminuyó hasta un 35.4 %, podría sugerir que los niveles de H₂O₂ pueden ser altos en la bellota, lo cual puede generar el radical OH·. Además, es importante mencionar que la actividad de APX aumento del mes 0 al mes 1, y se mantuvo constante hasta el

segundo mes. Posteriormente, se observó la disminución de la actividad de la enzima durante los meses 3, 4 y 5. Este comportamiento indica que esta enzima es la primera en responder al estrés oxidativo, debido a su alta afinidad al peróxido de hidrógeno, lo cual hace que su actividad aumente cuando la concentración de peróxido no es muy elevada (durante los primeros meses de almacenamiento). Pero cuando la concentración de peróxido aumenta, la actividad de la enzima disminuye.

El radical $\text{OH}\cdot$ puede ser perjudicial a nivel celular debido a que es muy reactivo, de rápida difusión y reacciona con los ácidos grasos insaturados causando lipoperoxidación (Rajjou et al., 2008). Como se observó en los ejes embrionarios de las bellotas de *Q. laurina*, donde la concentración de los ácidos grasos insaturados oleico y linoleico disminuyeron en un 51.7 % y 52.4 %, respectivamente, a los cinco meses de almacenamiento a 4 °C, y esta disminución podría contribuir a la pérdida de viabilidad y a reducir la longevidad de las bellotas (Pammenter y Berjak, 2000). Estos resultados sugieren que niveles bajos de ácidos grasos insaturados se relacionan con la disminución del porcentaje de germinación. La disminución en los ácidos grasos insaturados puede ser explicada por la lipoperoxidación causada por la formación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) durante el almacenamiento. Aunado a esto, el cambio en el perfil lipídico de las bellotas de *Q. laurina* mostró que se pueden provocar daños celulares durante el almacenamiento, los cuales pueden relacionarse con las alteraciones microestructurales como el colapso de las células embrionarias y la degradación de los cuerpos proteicos y oleosos (componentes estructurales de las bellotas). Estos cambios podrían iniciar diferentes procesos deletéreos debido a la deshidratación lenta de las bellotas durante el almacenamiento, y provocar una deshidratación homogénea celular, estos resultados podrían considerarse como una causa importante en la pérdida de viabilidad en las bellotas (Berjak y Pammenter, 2008). De esta forma las alteraciones en la morfología de la bellota se pueden relacionar con la pérdida de la capacidad germinativa y la viabilidad (Aguirre-Bolaños et al., 2017).

Además, los resultados obtenidos de la actividad de GR, la cual es una enzima que también contribuye al control de la producción de H_2O_2 , mostraron un aumento del

319.7 % en el tercer mes de almacenamiento de las bellotas de *Q. laurina*. A pesar de que GR se considera una enzima antioxidante en el ciclo del ascorbato-glutati3n, tambi3n se ha reportado que la GSH interviene en los procesos oxidativos y que prevalece durante la desecaci3n a largo plazo o en el envejecimiento. Kranner y Birtic (2005) han reportado que cuando la mayor parte del GSH es convertido en GSSG, el potencial de reducci3n (GSSG/2GSH) incrementa y se convierte en una se1al que inicia la muerte celular programada, lo que favorece la eliminaci3n de las c3lulas da1adas, pero si este proceso ocurre repetidamente, todo el organismo pierde viabilidad (M3ndez-Ferreira et al., 2013). Los resultados obtenidos corroboran un papel cr3tico de las enzimas antioxidantes en la prevenci3n del da1o por ERO.

Es importante mencionar que las actividades de SOD, CAT, APX y GR muestran una temporalidad en el proceso oxidativo. Se sabe que estas enzimas act3an de forma espacial y temporal en las c3lulas vegetales, cuando se da la producci3n de ERO, la cual ocurre principalmente en las mitocondrias, durante el transporte de electrones en la cadena respiratoria, en los cloroplastos por los fotosistemas, y en los peroxisomas durante el proceso de fotorrespiraci3n y la oxidaci3n de 1cidos grasos, o bien, en el citoplasma de las c3lulas (De Gara et al., 2010). En el caso de las semillas, la formaci3n de ERO se da durante el proceso de germinaci3n: En la primera fase (I), al iniciarse la imbibici3n de la semilla y se reinicia el metabolismo activo de las mismas. En la segunda y tercera fases (II y III) durante el proceso de reactivaci3n de la respiraci3n en las mitocondrias y en los peroxisomas que participan en la oxidaci3n de 1cidos grasos para la obtenci3n de energ3a metab3lica (Nonogaki et al., 2010). Durante estas dos fases se pueden generar o acumular EROs como el an3n super3xido que se convierte en per3xido de hidr3geno por la dismutaci3n llevada a cabo por la actividad de la SOD, tanto en los peroxisomas como en las mitocondrias (Demidchik, 2014). Este per3xido posteriormente es reducido a agua, por la actividad de la CAT y por diferentes sistemas antioxidantes como el ciclo ascorbato – glutati3n (Mhamdi et al., 2010), o bien, por la actividad de la APX. En este sentido, la actividad de las enzimas SOD, CAT y APX de los ejes embrionarios de las bellotas podr3an actuar como primera l3nea de defensa, y esto

podría explicar por qué sus actividades enzimáticas aumentaron en los primeros meses de almacenamiento (Fig. 21 A y C). Sin embargo, durante los posteriores meses de almacenamiento, el H₂O₂ aumenta significativamente, y es cuando la actividad enzimática de GR aumenta (Fig. 21 D), para ayudar a contrarrestar este radical (Szarca - Andrés et al., 2012).

Sin embargo, no se deben descartar otros mecanismos de protección como: la estructura física de la cubierta de la bellota, factores genéticos y factores fitohormonales, entre otros (Zhou et al., 2020). También hay que considerar que en esta investigación se encontró que la germinación de las bellotas de *Q. laurina* almacenadas a una temperatura de 4 °C se vio afectada por el estrés oxidativo ocasionado durante el almacenamiento, debido a que disminuyó en los primeros dos meses de almacenamiento. Esta disminución se relaciona con la pérdida de viabilidad en este mismo periodo, que puede ser resultado de la acumulación de ERO en los ejes embrionarios, puesto que la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y APX disminuye durante los primeros meses de almacenamiento, aunque la actividad de la enzima GR aumenta. Aun así, las ERO producen daño. En consecuencia, se produce un deterioro de los ácidos grasos insaturados que son una fuente importante de energía para la bellota y además, una alteración en la estructura anatómica y embrionaria lo que conlleva a una significativa pérdida de viabilidad en los ejes embrionarios de las bellotas.

7.4 Efecto del estrés hídrico en plántulas de *Q. laurina*

El estrés hídrico tuvo un efecto inhibitorio en el crecimiento de las plántulas de *Quercus laurina* en condiciones de invernadero. Con respecto al análisis de crecimiento clásico (RGR) y la evaluación de la conductancia estomática, las plántulas de *Q. laurina* mostraron un mecanismo de respuesta al estrés hídrico moderado y severo. Estas respuestas se manifestaron en la disminución del crecimiento, mediante la disminución de los parámetros fisiológicos (*gs* y NAR), pero sin modificar o adaptar sus parámetros morfológicos (LAR y R/S).

El análisis de los parámetros de crecimiento clásico realizado en las plántulas de *Q. laurina* bajo estrés hídrico, mostró que la tasa absoluta de crecimiento (AGR)

disminuyó en plántulas bajo estrés hídrico severo después de 63 días de tratamiento. Un análisis más detallado, mostró que la tasa relativa de crecimiento (RGR) disminuyó un 73.9 %. Comparando estos resultados con investigaciones realizadas en otras especies de *Quercus*, como *Q. virgiliana*, *Q. trojana* (Chiatante et al., 2015) y *Q. variabilis* (Wu et al., 2013), estos trabajos muestran una reducción en el crecimiento en condiciones de sequía, y una disminución de la conductancia estomática, y como consecuencia una disminución gradual de la fotosíntesis, y, por lo tanto, del crecimiento de las plántulas (Chiatante et al., 2015). Por otra parte, en cuanto a los parámetros morfológicos, como SLA y LAR, no se observaron diferencias entre las plántulas sometidas a los tratamientos de estrés hídrico. Lo que sugiere, que en el tiempo corto en que sufrieron estrés, hubo respuestas fisiológicas como el cierre de estomas con posibles consecuencias en la ganancia de carbono, pero no a nivel morfológico.

Estos datos coinciden con otros estudios en especies como *Q. ilex*, *Q. suber*, *Q. canariensis* y *Q. pyrenaica*, en los cuales no se encontraron diferencias significativas con respecto a SLA bajo un estrés hídrico severo (sin riego), debido a que cuando hay un fuerte descenso en la disponibilidad de agua, no es de esperar que se produzcan cambios estructurales inmediatos, ya que estos, a nivel foliar solo son posibles cuando las hojas están en expansión (Quero et al., 2008) y, si este parámetro es reducido se necesitarían períodos más largos de sequía que el impuesto en este trabajo, para crear una respuesta al estrés hídrico en los rasgos foliares estructurales. En cuanto a LAR se ha reportado que un tamaño de hoja más pequeño o la pérdida de hojas en respuesta a la sequía, es una característica que mejora la resistencia a la sequía, ya que se reduce la transpiración y el daño fotoquímico, ayudando de esta manera a mantener una tasa mínima de fotosíntesis bajo déficit hídrico (Dickson y Tomlinson, 1996).

Con respecto a la Tasa de Asimilación Neta (NAR, parámetro fisiológico) se observó que la eficiencia de las hojas para generar nuevos tejidos disminuyó un 22.5 % en las plántulas bajo un estrés hídrico moderado, y 56 % en plántulas bajo un estrés hídrico severo con respecto a las plántulas control. Este parámetro se vio afectado

por la respuesta fisiológica de los estomas de las plántulas al estrés hídrico, los cuales tienden a cerrarse parcialmente para evitar la pérdida de agua por transpiración, pero al mismo tiempo limitan la asimilación de CO₂, como se ha reportado por Baquedano y Castillo (2006) en *Q. ilex* y *Q. coccifera*. Pero, en nuestros resultados el comportamiento de los estomas inducido por el estrés hídrico moderado y severo en las plántulas de *Q. laurina*, disminuyó en un 24.7 % y 44.5 %, respectivamente con respecto a las plántulas control. Esto sugiere que la especie está regulando su pérdida de agua, disminuyendo la apertura estomática y permitiendo cierta fijación de carbono a pesar del estrés hídrico (Aranda et al., 2014). Este mecanismo del cierre parcial de los estomas raramente consigue evitar cierto grado de desecación en los tejidos de los encinos (Mediavilla y Escudero, 2004). Además, supone en sí mismo, un compromiso frente a la fijación de carbono al disminuir la disponibilidad de CO₂ en los cloroplastos (Cano et al., 2013). Esto podría sugerir que las plántulas de *Q. laurina*, podrían no tolerar el estrés hídrico prolongado. Por otro lado, la distribución de la biomasa para cada órgano: raíz (RWR), tallo (SWR) y hojas (LWR), fue homogénea tanto en las plántulas control como en las plántulas sometidas a estrés hídrico; estos resultados difieren con lo reportado por Baquedano y Castillo (2006) en plántulas de *Q. coccifera* y *Q. ilex*, los autores reportan que la asignación de biomasa de la hoja y tallo disminuyeron en un 80-90 % en las plantas con estrés hídrico severo (-0.4 MPa), y fue redistribuida la biomasa hacia la raíz, para una mayor captura del recurso limitante, maximizando así la tasa de crecimiento.

Con respecto al coeficiente alométrico (R/S), las plántulas de *Q. laurina* destinaron una mayor cantidad de recursos a la parte aérea de las plántulas. Sin embargo, se ha reportado en plántulas de *Q. ilex* (Chiatante et al., 2015), *Q. variabilis* (Wu et al., 2013) y *Q. coccifera* (Baquedano y Castillo, 2006) que, en condiciones de estrés hídrico, estas especies invierten o aumentan una proporción de biomasa significativa para ser asignada a las raíces o a la raíz principal, al tiempo que se reduce la inversión de biomasa en el tallo y las hojas, lo que les permitió adaptarse al estrés progresivo de la sequía, al aumentar la relación entre la longitud total de la raíz y la altura de la plántula. Estos resultados indican que un sistema de raíces

vigoroso puede maximizar la absorción de agua, para garantizar la supervivencia y el crecimiento de las plántulas (Wu et al., 2013). Sin embargo, esta asignación de recursos hacia la raíz no se presenta en *Q. laurina*. Esto puede deberse a un umbral crítico de la duración del estrés por sequía, por encima del cual hay una reducción dramática del crecimiento de las raíces como se ha reportado en *Q. pubescens* o un crecimiento lento como se ha reportado en *Q. variabilis* (Wu et al., 2013), lo que podría indicar que la actividad del meristemo de la raíz podría haber sido afectado durante el estrés hídrico (Chiatante et al., 2006). Por lo tanto, este estudio muestra que la disminución en RGR de las plántulas de *Q. laurina* bajo estrés hídrico se asoció con la disminución de su aspecto fisiológico NAR, y este a su vez, se relaciona con el aspecto morfológico LAR que permaneció estable y el cual está determinado por sus componentes SLA y LWR. Esto sugiere que los mecanismos de respuesta al estrés hídrico a nivel morfológico de las hojas, tallos y raíces analizadas mediante estos componentes, podrían ser parámetros importantes para determinar los mecanismos de tolerancia o evitación de las plántulas de *Q. laurina* en condiciones de estrés hídrico. Sin embargo, el único atributo asociado constantemente para tolerar el estrés hídrico fue la conductancia estomática baja y, por lo tanto, no podemos generalizar que las plántulas de *Q. laurina* eviten o toleren el estrés hídrico.

Finalmente, los resultados de este estudio mostraron que las bellotas de *Q. laurina* solo se pueden almacenar a 4 °C durante dos meses, un tiempo muy corto, lo cual no es conveniente para la preservación de este germoplasma. Por otro lado, las plántulas de *Q. laurina* no parecen tolerar periodos cortos (63 días) de sequía, ya que responden con un cierre parcial estomático y disminución del crecimiento. Esto sugiere que tanto las bellotas como las plántulas de esta especie requieren ciertos cuidados para ser utilizadas para la reforestación o rehabilitación de zonas perturbadas, como sería la siembra de semillas recolectadas recientemente y riego adecuado hasta el establecimiento de las plántulas.

8. CONCLUSIONES

En este trabajo, se encontró que las bellotas de *Q. laurina* fueron deterioradas rápidamente por el efecto del almacenamiento a 4 °C, evidenciado por la pérdida de viabilidad, la reducción de los ácidos grasos insaturados y el daño microestructural causado por un deficiente sistema antioxidante.

Las plántulas de *Q. laurina*, modulan su respuesta estomática en condiciones de estrés hídrico, pero en este periodo no se observaron otros mecanismos que les permitan minimizar el impacto del estrés hídrico en condiciones de invernadero.

9. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo señalan que las bellotas de *Q. laurina*, pierden viabilidad rápidamente cuando se almacenan a 4 °C, esto sugiere que deben controlarse otros factores ambientales además de la temperatura, como por ejemplo la humedad relativa para su almacenamiento.

A pesar de encontrar una disminución de los ácidos grasos insaturados se hace necesario medir, específicamente, los niveles de peroxidación de lípidos.

En cuanto a las plántulas de *Q. laurina*, que fueron sometidas a un estrés hídrico no se observaron mecanismos para tolerar el estrés hídrico, bajo las condiciones estudiadas. Se sugiere prolongar el tiempo del tratamiento de estrés hídrico e incluir otros parámetros como el control de la temperatura y de la luz, que también afectan el crecimiento de las plántulas, para determinar un comportamiento multifactorial en respuesta al estrés hídrico.

10. ANEXO 1

Histoquímica del eje embrionario de *Q. laurina*

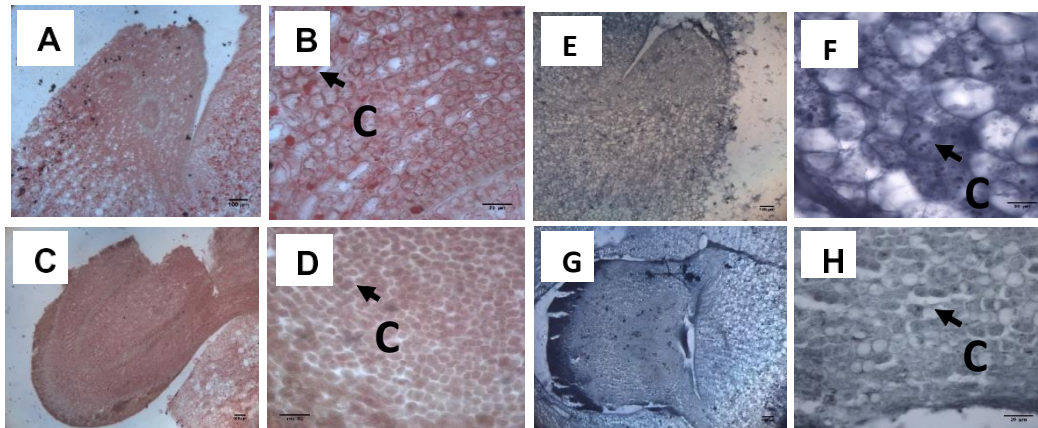


Figura A1. Micrografía de microscopía óptica del eje embrionario de bellotas de *Q. laurina*, a diferentes tiempos de almacenamiento a 4 °C (A y B) Tiempo inicial de almacenamiento; (C y D) Tiempo final del almacenamiento; gotas de los cuerpos lipídicos (C), teñidos con rojo "O". (E y F) Tiempo inicial del almacenamiento; (G y H) Tiempo final del almacenamiento; los cuerpos proteicos en azul intenso (C), teñidos con azul negro de naftol.



Figura A 2. Fotografías de plántulas de *Q. laurina* de siete meses de edad. Sometidas a estrés hídrico durante 63 días en condiciones de invernadero. A) Control, B) Estrés moderado y C) Estrés severo.

11. REFERENCIAS

- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, 105: 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Aguirre-Bolaños, M., Benítez-Flores, J. C., González-Valle, M. R., Hernández-Portilla, L. B., Quintanar-Zúñiga, R. E., y Flores-Ortiz, C. M. (2017). Efecto del almacenamiento prolongado sobre la viabilidad y perfil de ácidos grasos en semillas de *Encyclia adenocarpa* (Lex.) Schltr. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(2), 151–160.
- Akcan, T., Gökce, R., Asensio M., Estéves, M. y Morcuende D. (2017). Acorn (*Quercus spp.*) as a novel source of oleic acid and tocopherols for livestock and humans: discrimination of selected species from Mediterranean forest. *Journal of Food Science and Technology*.54(10):3050-3057. DOI 10.1007/s13197-017-2740-3
- Alvarado-Rosales D., Saavedra-Romero L. de L, Almaráz-Sánchez B., Trejo-Ramírez O., Davidson J. M., Kliejunas J. T., Oak S., O'Brien J.G., Orozco-Torres F. y Quiroz- Reygadas D. (2007). Agentes asociados y su papel en la declinación y muerte de encinos (*Quercus*, Fagaceae) en el Centro-Oeste de México. *Polibotánica*, 23: 1–21.
- Antúnez, I., Retasoma, E. C. y Villar R. (2001). Relative growth rate in phylogenetically related deciduous and evergreen woody species. *Oecologia* 128:172-180.
- Aranda, I. (2014). Características funcionales que influyen en la respuesta a la sequía de las especies del género *Quercus*: variación inter- e intra-específica. *Ecosistemas*, 23(2), 27– 36. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2014.23-2.05>
- Arizaga, S., Martínez-Cruz, J., Salcedo-Cabrales, M. y Bello-González, M. Á. (2009). Manual de la biodiversidad de encinos michoacanos. En Instituto Nacional de Ecología. http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/consultaPublicacion.html?id_pub=603
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2013). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. En McGrawHill. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Aroca, M. J., Serrada, R. y Calderón - Guerrero, C. (2005). Influencia del contenido de humedad y del tiempo de almacenaje sobre la capacidad germinativa en bellotas de encina (*Quercus ilex subsp. ballota* L.) sometidas a congelación. Resultados preliminares. *Sectores Forestales*. IV Congreso Forestal Español.

- Baskin, J.M. y Baskin, C.C. (1998). *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. San Diego, California. Academic Press. 666 p.p.
- Bradford, K. J. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72 (1-2):248-254.
- Bradford, K.J. (2004). *Seed Production and Quality*. University of California. Florida.
- Bailly, C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, 14(2), 93–107. <https://doi.org/10.1079/ssr2004159>
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., y Corbineau, F. (2008). From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus- Biologies*, 331(10), 806–814. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.07.022>
- Baquedano, F. J., y Castillo, F. J. (2006). Comparative ecophysiological effects of drought on seedlings of the Mediterranean water-saver *Pinus halepensis* and water-spenders *Quercus coccifera* and *Quercus ilex*. *Trees - Structure and Function*, 20(6), 689–700. <https://doi.org/10.1007/s00468-006-0084-0>
- Barraza, A. F. Benavides B. O. y Torres, M., F. (2016). Calidad fisiológica y energía de germinación de semillas de balsamina (*Momordica charantia* L.). *Revista de Ciencias Agrícolas*, 33 (1), 43. <https://doi.org/10.22267/rcia.163301.5>
- Berjak, P. y Pammenter, N.W. (2001) Seed recalcitrance – current perspectives. *South African Journal of Botany*, 67, 79–89.
- Berjak, P. y Pammenter, N. W. (2008). From *Avicennia* to *Zizania*: Seed recalcitrance in perspective. *Annals of Botany*, 101(2), 213–228. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm168>
- Benavides-Mendoza, A. (2004). Estrategias para el uso de los mecanismos naturales de tolerancia al estrés en plantas. En R. Foroughbakhch Pournavad, T. E. Torres Zepeda y M. A. Alvarado Vázquez (Ed.) *Tópicos selectos de Botánica* (p.p. 245) Monterrey, Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Bonito A., Varone L. y Gratani, L. (2011). Relationship between acorn size and seedling morphological and physiological traits of *Quercus ilex* L. from different climates. *Photosynthetica*, 49(1), 75–86. <https://doi.org/10.1007/s11099-011-0014-2>
- Bonner, F. (2003). *Collection and care of acorns: a practical guide for seed collectors and nursery managers*. US Department of Agriculture, Forest, Version 1., 28. [papers2://publication/uuid/2E47F671-3663-481C-A3F9-0533E89F771D](https://publication/uuid/2E47F671-3663-481C-A3F9-0533E89F771D)

- Cano, F. J., Sánchez-Gómez, D., Rodríguez-Calcerrada, J., Warren C. R., Gil L. y Aranda, I. (2013). Effects of drought on mesophyll conductance and photosynthetic limitations at different tree canopy layers. *Plant, Cell and Environment*, 36 (11), 1961– 1980. <https://doi.org/10.1111/pce.12103>
- Charef, M., Yousfi, M., Saidi, M. y Stocker, P. (2008). Determination of the Fatty Acid Composition of Acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* Seeds Growing in Algeria. *Journal of the American Oil Chemists´ Society*. 85:921-924.
- Chiariello, N. R., Mooney H. A. y Williams, K. (2000). Growth, carbon allocation and cost of plant tissues. *Plant Physiological Ecology*, 327–365. https://doi.org/10.1007/978-94-010-9013-1_15
- Chiatante, D., Di Lorio, A., Sciandra, S., Scippa, G. S. y Mazzoleni S. (2006). Effect of drought and fire on root development in *Quercus pubescens* Willd. And *Fraxinus ornus* L. seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 53:190-197.
- Chiatante, D., Lorio A. Di Sciandra, S., Scippa, G. S. y Mazzoleni, S. (2015). Effect of drought and fire on root development in *Quercus pubescens* Willd. and *Fraxinus ornus* L. seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 56(2), 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.01.014>
- Chittaranjan, K. (2011). *Wild Krop relatives: Genomic and Breeding Resources*. (1ª ed.). U.S.A. Springer.
- Cortina, J., Maestre, F. T., Vallejo, R., Baeza M. J., Valdecantos, A. y Pérez-Devesa, M. (2006). Ecosystem structure, function, and restoration success: Are they related? *Journal for Nature Conservation*, 14(3–4), 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2006.04.004>
- Chiatante, D., Tognetti, R., Scippa, G.S., Congiu, T., Baesso, B., Terzagui, M. y Montagnoli, A. (2015). Interspecific variation in functional traits of oak seedlings under artificial drought and fire conditions. *Journal of Plant Research*. <https://doi.org/10.1007/s10265-015-0729-4>
- Christensen, C. M. (1978). Moisture and seed decay. En: Koslowski, T. T. (Yl.) *Water deficits and plant growth*. p.p. 199-219. Academic Press, New York.
- Chin, H. F., Hor, L. y Moho Lassim, M. B. (1984). Identification of recalcitrant seeds. *Seed Science. and Technology* 12:429-436.
- De la Paz Pérez-Olvera, C., Dávalos Sotelo, R. y Guerrero Cuacuil, E. (2000). Aprovechamiento de la madera de encino en México. *Madera y Bosques*, 6(1), 3–13. <https://doi.org/10.21829/myb.2000.611338>

- De La Paz Pérez-Olvera C. y Dávalos-Sotelo R. (2008). Algunas características anatómicas y tecnológicas de la madera de 24 especies de *Quercus* (encinos) de México. *Madera Bosques*, 14(3) 43–80. <https://doi.org/10.21829/myb.2008.1431206>
- Demidchik, V. (2014). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany* 2834:1-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>
- De Gara, L., Locato, V., Dipierro, S. y De Pinto, M. C. (2010). Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. *Respiratory Physiology and Neurobiology* 173S: S13-S19. Doi:10.1016/j.resp.2010.02.007
- Díaz-Fleischer, F., Hernández-Arellano, V., Sánchez-Velásquez, L., Cano-Medina, T., Cervantes-Alday, R. y 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.
- Díaz Pontones D., y Reyes Jaramillo, I. (2009). Producción y almacenamiento de bellotas de *Quercus hintonii* *Warburg* (Fagaceae) de la Depresión del Balsas, México. *Polibotánica*, 27, 131–143.
- Dickson, R. y Tomlinson, P. (1996). Oak growth, development and carbon metabolism in response to water stress. *Annales des Sciences Forestières*, 53(2–3), 181–196. <https://doi.org/10.1051/forest:19960202>
- Doria, J. (2010). Generalidades Sobre Las Semillas: Su Producción, Conservación y Almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31(1), 74–85
- Esperón-Rodríguez, M. y Barradas, V. L. (2015). Ecophysiological vulnerability to climate change: water stress responses in four tree species from the central mountain region of Veracruz, Mexico. *Regional Environmental Change*, 15(1), 93–108. <https://doi.org/10.1007/s10113-014-0624-x>
- Evans, G. C. (1973). The Quantitative. Analysis of Plant Growth. *Annals of Applied Biology*, 73(3), 357.
- Flores-Luna, W., Estrada-Medina, H., Jiménez-Osornio, J. y Pinzón-López, L. (2012). Effect of Water Stress on Growth and Water use Efficiency of Tree Seedlings of Three Deciduous Species. *Terra Latinoamericana*, 30(4), 343–353.
- Finch-Savage, W.E. (1992). Embryo water status and survival in the recalcitrant species *Quercus robur* L.: evidence for a critical moisture content, *Journal of Experimental Botany* (43):663- 669.

- Finch-Savage, W.E. y Blake P.S. (1994). Indeterminate development in desiccation-sensitive seeds of *Quercus robur* L. *Seed Science Research*. (4): 127-133.
- Garrido-Pertierra, A. y Teijón-Rivera J. M. (2006). *Fundamentos de Bioquímica Estructural*. Editorial Tebar, S. L. Alfaomega. California, USA. 443 p.p.
- Gil-Pelegrín, E., Peguero-Pina, J. J. y Sancho-Knapik, D. (2017). *Oaks Physiological Ecology. Exploring the Functional Diversity of Genus Quercus L.* Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-69099-5>
- González-Salvatierra, C., Badano, E. I., Flores, J. y Rodas, J. P. (2013). Germinación, infestación y viabilidad en bellotas de *Quercus polymorpha* (Schltld. & 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>
- Goodman, R. C., Jacobs, D. F. y Karrfalt, R. P. (2006). Assessing Viability of Northern Red Oak Acorns with X-rays: Application for Seed Managers. *Native Plants Journal*, 7(3), 279–283. <https://doi.org/10.2979/npj.2006.7.3.279>
- Gosling, P. (2002). Handling and storing acorns y chestnuts and sycamore fruits. *Practice Note - Forestry Commission, No.12*.
- Haber, F. y Weiss, J. (1932). On the catalysis of hydroperoxide. *Naturwissenschaften* 20: 948–950
- Halliwell, B. y Gutteridge, JMC. (2007). *Free Radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon.
- Himmelsbach, W., Treviño-Garza, E. J., González-Rodríguez, H., González-Tagle, M. A., Gómez Meza, M. V., Aguirre Calderón, O. A., Estrada Castellón, E. y Mitlöchner, R. (2012). Acclimatation of three co-occurring tree species to water stress and their role as site indicators in mixed pine-oak forests in the Sierra Madre Oriental, Mexico. *European Journal of Forest Research*, 131(2), 355–367. <https://doi.org/10.1007/s10342-011-0507-3>
- Hunt R. (1990). *Basic Growth Analysis Plant Growth Analysis for Bennigers*. Springer- Verlag. London. 112 p.p.
- Jiang, M. y Zhang, J. (2002). Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany*, 53(379), 2401–2410. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf090>

- Jöet, T., Ourciva, J.M. y Dussert S. (2013). Ecological significance of seed desiccation sensitivity in *Quercus ilex*. *Annals of Botany*. 111(4):693-701. Doi: 10.1093/aob/mct025
- Johnson, P. S., Shifley S. R. y R. Rogers (2002). *The Ecology and Silviculture of Oaks*. CABI Publishing, New York.
- Kermodé, A.R. y Finch-Savage, B.E. (2002) Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. *Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying*. Black M. y Pritchard H.W. (Eds), pp. 149– 184. CAB International, Wallingford.
- Königsberg, F. M., (2008). *Radicales libres y estrés oxidativo: Aplicaciones médicas*. Ciudad de México. Editorial Manual Moderno.
- Kranner, I. y Birtić, S. (2005). A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integrative and Comparative Biology*, 45(5), 734–740. <https://doi.org/10.1093/icb/45.5.734>
- Lawson, T. Y Wang, Y. (2018). *Coordination Between Photosynthesis*. W. W. Adams III, I. Terashima (Eds.), *The Leaf: A Platform for Performing Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and Respiration*. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature.
- Lee, J. S., Velasco-Punzalan, M., Pacleb, M., Valdez, R., Kretzschmar, T., McNally, K. L., Ismail, A. M., Cruz, P. C. S., Sackville Hamilton, N. R. y Hay, F. R. (2019). Variation in seed longevity among diverse Indica rice varieties. *Annals of botany*, 124(3), 447– 460. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz093>
- Luna-José, A., Montalvo-Espinosa, L., y Rendón-Aguilar, B. (2003). Los usos no leñosos de los encinos en México. *Botanical Sciences*, 117(72), 107. <https://doi.org/10.17129/botsci.1671>
- Lüttge, U. (2007). *Physiological Ecology of Tropical Plants*. En: *Journal of Chemical Information and Modeling*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Lux, A. (2014). *Microscopia electrónica, ultraestructura y citología vegetal*. Universidad Autónoma de Nuevo León., 1, 1–43.
- Madhava Rao, K.V., Raghavendra, A. S. y Janardhan Reddy, K. (2006). *Physiological and Molecular Biology Stress Tolerance in Plants*. (1ª ed.). Netherlands, Springer.

- Manos, S. P., Zhou, Z. K. y Cannon, C. H. (2001). Systematics of Fagaceae: Phylogenetic Tests of Reproductive Trait Evolution. *International Journal of Plant Science*, 162(6): 1361–1379.
- Martínez-Nuñez M., Vera Hernández, P. F., Ruiz Rivas, M., Villalobos López, M. A., Arroyo Becerra, A., Luna Suárez S. y Rosas Cárdenas F. de F. (2018). Resistencia y tolerancia a estrés abiótico: Mecanismos sofisticados de adaptación de las plantas ante distintas condiciones de estrés. *Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional* 21–25.
- Mediavilla, S. y Escudero, A. (2004). Stomatal responses to drought of mature trees and seedlings of two co-occurring Mediterranean oaks. *Forest Ecology and Management*, 187(2–3), 281–294. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2003.07.006>
- Méndez-Ferreira, G. D., Covarrubias, A. y Beltrán, E. (2013). Procesos moleculares involucrados en la protección de las semillas a la desecación. 15(2), 42–48.
- Mira, S., Estrelles, E. y González-Benito, M. E. (2015). Effect of water content and temperature on seed longevity of seven Brassicaceae species after 5 years of storage. *Plant Biology*, 17(1), 153–162. <https://doi.org/10.1111/plb.12183>
- Misra, H. P. y Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247(10), 3170–3175.
- Mhamdi, A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F., y Noctor G. (2010). Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress – mimic models. *Journal of Experimental Botany*. 61(15):4197-4220. [doi:10.1093/jxb/erq282](https://doi.org/10.1093/jxb/erq282)
- Møller, I. M., Jensen, P. E., y Hansson, A. (2007). Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58(1), 459–481. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946>
- Moreno, L.. P. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión *Plant responses to water deficit stress. A review. Agronomía Colombiana*, 27(2), 179–191.
- Morgan, D. L. y D. S. Brohaker (1986). “Dehydration Effect on Germination of Live oak Seeds”, *Journal of Environmental Horticulture*. Núm. 4.
- Munns, R., y Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>

- Nakano, Y. y Asada, K. (1981). Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(May), 867–880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Nicot, N., Hausman, J. F., Hoffmann, L. y Evers, D. (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 56 (421): 2907–2914. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri285>
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G. y Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: An integrated overview. *Plant, Cell and Environment*, 35(2), 454–484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x>
- Nonogaki, H., Bassel, G. W. y Bewley, J. D. (2010). Germination-still a mystery. *Plant Science*, 179(6), 574–581. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.02.010>
- Oldfield, S. y Eastwood, A. (2007). *The Red List of Oaks*. Published by Fauna and Flora International, Cambridge, UK. 29 p.p.
- Özcan, T. (2007). Characterization of Turkish Quercus L. Taxa Based on Fatty Acid Compositions of the Acorns. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84:653-662.
- Papoti, V. T., Kizaki, N., Skaltsi, A., Karayannakidis P. D. (2018). The phytochemical rich potential of acorn (*Quercus aegilops*) products and by products. *Food Science and Biotechnology*, 27(3):819-828.
- Padilla, F. M. y Pugnaire, F. I. (2007). Rooting depth and soil moisture control Mediterranean woody seedling survival during drought. *Functional Ecology*, 21(3), 489–495. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2007.01267.x>
- Paine, C. E. T., Marthens, T. R., Vogt, D. R., Purves, D., Rees, M., Hector, A., & Turnbull, L. A. (2012). How to fit nonlinear plant growth models and calculate growth rates: An update for ecologists. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(2), 245–256. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00155.x>
- Pallardy, S. G. y Rhoads, J. L. (1993). Morphological adaptations to drought in seedlings of deciduous angiosperms. *Canadian Journal of Forest Research*, 23, 1766–1774.
- Pammenter, N. W., Greggains, V., Kioko, J. I., Wesley-Smith, J., Berjak, P. y Finch-Savage, W. E. (1998). Effects of differential drying rates on viability retention of

recalcitrant seeds of *Ekebergia capensis*. *Seed Science Research*, 8(4), 463–471. <https://doi.org/10.1017/s0960258500004438>

- Pammenter N.W. y Berjak P. (2000). Evolutionary and ecological aspects of recalcitrant seed biology. *Seed Science Research*, (10):301-306.
- Pasquini, S., Mizzau, M., Petrusa, E., Braidot, E., Patui, S., Gorian, F., Lambardi, M. y Vianello, 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(5), 1963–1974. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-0996-9>
- Pérez-Devesa, M., Cortina, J., Vilagrosa, A. y Vallejo, R. (2008). Shrubland management to promote *Quercus suber* L. establishment. *Forest Ecology and Management*, 255(3–4), 374– 382. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.09.074>
- Pichardo-González, J. M., Ayala-Garay, Ó. J., González-Hernández, V. A. y Flores-Ortiz, C. M. (2014). Fatty acids and physiological quality of tomatillo (*Physalis philadelphica* lam.) Seed during natural ageing. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 74(4), 391–396. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392014000400003>
- Pritchard, H.W. (1991). Water potential and embryonic axes viability in recalcitrant seeds of *Quercus rubra*, *Annals of Botany*, (67):43-49
- Pritchard, H. W. (2004). (a) Classification of seed storage ‘types’ for *ex situ* conservation in relation to temperature and moisture. E. O. Guerrant, K. Havens, and M. Maunder [eds.], En *Ex situ* plant conservation: supporting species survival in the wild, 139–161. Island Press, Washington, D.C., USA.
- Pritchard, H. W., Daws, M. I., Fletcher, B. J., Gaméne, C. S., Msanga, H. P. y Homondi, W. (2004). b) Ecological correlates of seed desiccation tolerance in tropical African dryland trees. *American Journal of Botany*. 91(6):863-870.
- Potters, G., Pasternak, T. P., Guisez, Y., Palme, K. J. y Jansen, M. A. K. (2007). Stress- induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science*, 12(3), 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.01.004>
- Pukacka, S., Malec, M. y Ratajczak, E. (2011). ROS production and antioxidative system activity in embryonic axes of *Quercus robur* seeds under different desiccation rate conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(6), 2219–2227. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0761-5>
- Quero J. S., Villar, R., Marañón, T. y Zamora, R. (2006). Interactions of drought and shade effects on seedlings of four *Quercus* species: Physiological and structural leaf

responses. *New Phytologist*, 170(4), 819–834. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01713.x>

- Quero, José L., Villar, R., Marañón, T., Murillo, A. y Zamora, R. (2008). Respuesta plástica a la luz y al agua en cuatro especies mediterráneas del género *Quercus* (Fagaceae). *Revista Chilena de Historia Natural*, 81(3), 373–385. <https://doi.org/10.4067/s0716-078x2008000300006>
- Rajjou, L., Lovigny, Y., Groot, S. P. C., Belghazi, M., Job, C. y Job, D. (2008). Proteome- wide characterization of seed aging in *Arabidopsis*: A comparison between artificial and natural aging protocols. *Plant Physiology*, 148(1), 620–641. <https://doi.org/10.1104/pp.108.123141>
- Ramos-González, P. L. (2014). Identificación y caracterización biológica y molecular de una nueva especie de begomovirus bipartito: *Tomato mottle Taino virus*. En Tesis Doctoral Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Departamento de Plantas (Número May) 137 p.p.
- Ramos-Ordoñez, M. F., Del Coro Arizmendi, M., Flores-Enríquez, V., & Márquez-Guzmán, J. (2016). Extracción y morfología del embrión de *Bursera bipinnata* (Burseraceae). *Acta Botanica Mexicana*, 117, 27. <https://doi.org/10.21829/abm117.2016.1165>
- Rivera Cabrera, F. Buentello Volante, B., Días de León, F. y Pérez - Flores L. J. (2008). Las especies reactivas de oxígeno en plantas. M.F. Konigsberg (Ed.). Radicales libres y estrés oxidativo: Aplicaciones médicas. Editorial Manual Moderno. Ciudad de México.
- Ribas-Carbó, M., Flórez- Sarasa, I. D. y González-Meler, M. A. (2014). Desarrollo y germinación de las semillas. En J. Azcón-Bieto, M. y Talón (Eds.), *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (pp. 537-558) Madrid, España: McGrawHill
- Romero - Rangel, S., Rojas - Senteno, S. y Rubio - Licona L. E. (2014). Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo 181. Morelia, Michoacán. Universidad Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 1-167.
- Romero Rangel, S., Rojas Zenteno, E. C. y Rubio Licona, L. E. (2015). Encinos de México: (*Quercus*, Fagaceae); 100 especies. Guía ilustrada. Ciudad de México. Universidad Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 288 p.p.

- Rodríguez-Trejo, D. A., y Pompa-García, M. (2016). Tamaño, color de nuez y sombra afectan la germinación de *Quercus deserticola*. *Madera Bosques*, 22(2), 67–75. <https://doi.org/10.21829/myb.2016.2221325>
- Roelfsema, M. R. G. y Hedrich, R. (2002). Studying guard cells in the intact plant: Modulation of stomatal movement by apoplastic factors. *New Phytologist*, 153(3), 425–431. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.Documedoc.doc.x>
- Roberts, E. H. (1973). Predicting the storage life of seeds. *Seed Science y Technology* 1: 499-514. Stanwood, P. C. y L. N. Bass. 1981. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. *Seed Science y Technology* 9: 423-437.
- Rubio Licona, L., Romero-Rangel, S., Rojas-Zenteno, C., Durán Díaz, Á., y Gutiérrez Guzmán, J. (2011). Variación del tamaño de frutos y semillas en siete especies de encino (*Quercus*, Fagaceae). *Polibotánica*, 32, 135–151.
- Rzedowski, J. (2006). Resumen histórico de los estudios sobre la vegetación de México. En *Vegetación de México* (Vol. 19, Número 1, pp. 12–19).
- Santa Cruz-García, N. y Espejel-Rodríguez, A. (2004). Los encinos (*Quercus*) de Tlaxcala, México. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Sabás-Rosales, J. L., Sosa-Ramírez, J. y Luna-Ruiz, J. D. J. (2015). Diversidad, distribución y caracterización básica del hábitat de los encinos (*Quercus*: Fagaceae) del estado de San Luis Potosí, México. *Botanical Sciences*, 93(4), 881–897. <https://doi.org/10.17129/botsci.205>
- Sánchez-Gómez, D., Valladares, F., Zavala, M. A. y Sánchez-gómez, D. (2006). Performance of seedlings of Mediterranean woody species under experimental gradients of irradiance and water availability, trade-off and evidence for niche differentiation.pdf. *New phytologist*, 170, 795–806.
- Shao, H. B., Chu, L. Y., Jaleel, C. A. y Zhao, C. X. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus - Biologies*, 331(3), 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.01.002>
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., y Pessaraki, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Sorrivás, De Lozano, A., Alfonsina, V., María, M. y Yañez, J. (2014). Título: Principios y práctica de la Microscopía Electrónica.

- Szarca A., Tomasskovics B. y Bánhegyi G. (2012). The ascorbate – glutathione – α -tocopherol Triad in Abiotic Stress Response. *International Journal of Molecular Sciences*. 13:4458-4483. doi:10.3390/ijms13044458
- Trubat, R., Cortina, J. y Vilagrosa, A. (2010). Nursery fertilization affects seedling traits but not field performance in *Quercus suber L.* *Journal of Arid Environments*, 74(4), 491–497. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.10.007>
- Tyree, M. T., Engelbrecht, B. M. J., Vargas, G. y Kursar, T. A. (2003). Desiccation tolerance of five tropical seedlings in Panama. Relationship to a field assessment of drought performance. *Plant Physiology*, 132(3), 1439–1447. <https://doi.org/10.1104/pp.102.018937>
- Vaca, C.E., Wilhelm J.Y. Harms- Ringdahl. (1988). Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutation Research*, 195,137-149.
- Valencia-A., S. (2004). Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Botanical Sciences*, 75:3-53. <https://doi.org/10.17129/botsci.1692>
- Valencia-A., S. (2010). Notes on the genus *Quercus* in Mexico. *International oaks*, 21, 100–120. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Valencia-A., S., y Gual-Díaz, M. (2014). La familia fagaceae en el bosque mesófilo de montaña de México. En *Botanical Sciences* 92 (2), pp. 193–204). <https://doi.org/10.17129/botsci.45>
- Valladares F. y Sánchez-Gómez. (2006). Ecophysiological Traits Associated with Drought in Mediterranean Tree Seedlings: Individual Responses versus Interspecific Trends in Eleven Species. 8, 688–697. <https://doi.org/10.1055/s-2006-924107>
- Vázquez- Yanes, C. y Toledo, J. R. (1989). El almacenamiento de semillas en la conservación de especies vegetales. *Problemas y aplicaciones*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* (49):61-69. Doi: 10.17129/botsci.1366
- Villar R., López - Iglesias., Ruis-Benito P., De la Riva E. G. y Zavala M. A. (2014). Crecimiento de plántulas y árboles de seis especies de *Quercus*. *Ecosistemas*, 23(2), 64– 72. <https://doi.org/10.7818/re.2014.23-2.00>
- Violle, C., Navas, M.-L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I. y Garnier, E. (2007). Let the concept of trait be functional! *Oikos*, 116(5), 882–892. <https://doi.org/10.1111/j.2007.0030-1299.15559.x>
- Vollenweider, P., Menard, T., Arend, M., Kuster, T. M. y Günthardt-Goerg, M. S. (2016). Structural changes associated with drought stress symptoms in foliage of

Central European oaks. *Trees - Structure and Function*, 30(3), 883–900.
<https://doi.org/10.1007/s00468-015-1329-6>

- Waterworth, W. M., Footitt, S., Bray, C. M., Finch-Savage, W. E. y West, C. E. (2016). DNA damage checkpoint kinase ATM regulates germination and maintains genome stability in seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(34), 9647–9652.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1608829113>
- Wayne D., (2009). *Biostatistic: a foundation for analysis in the health sciences*. (4^a ed.). Limusa Wiley. 720 p.p.
- Williams-Linera, G. (2007). *El bosque de niebla del centro de Veracruz*. (1^a ed). Xalapa, Veracruz, México : Instituto de Ecología : Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 204 p.p.
- Wright, I. J., Reich, P. B., Westoby, M., Ackerly, D. D., Baruch, Z., Bongers, F., Cavender-Bares, J., Chapin, T., Cornellssen, J. H. C., Diemer, M., Flexas, J., Garnier, E., Groom, P. K., Gulias, J., Hikosaka, K., Lamont, B. B., Lee, T., Lee, W., Lusk, C., Villar, R. et al., (2004). The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*, 428(6985), 821– 827. <https://doi.org/10.1038/nature02403>
- Wu, M., Zhang, W. H., Ma, C. y Zhou, J. Y. (2013). Changes in morphological, physiological, and biochemical responses to different levels of drought stress in chinese cork oak (*Quercus variabilis Bl.*) seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology*, 60(5), 681–692. <https://doi.org/10.1134/S1021443713030151>
- Xia, K., Daws, M. I., Stuppy, W., Zhou, Z. K. y Pritchard, H. W. (2012). Rates of Water Loss and Uptake in Recalcitrant Fruits of *Quercus* Species Are Determined by Pericarp Anatomy. *PLoS ONE*, 7(10), 1–11.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047368>
- Yin, G., Xin, X., Song, C., Chen, X., Zhang, J., Wu, S., Li, R., Liu, X. y Lu, X. (2014). Activity levels and expression of antioxidant enzymes in the ascorbate-glutathione cycle in artificially aged rice seed. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.006>
- Zavala - Chávez, F. (2001). *Introducción a la ecología de la regeneración natural de encinos*. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Texcoco, Estado de México. 94 p.p.
- Zavala – Chávez, F. (2003). *Identificación de Encinos de México*. Universidad Autónoma de Chapingo, División de Ciencias Forestales, Texcoco. 150 p.p.

- Zavala- Chávez F. (2004). Deseccación de bellotas y su relación con la viabilidad y germinación. Ciencias Naturales y Agropecuarias. División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo. 177-185.
- Zeiger, E. y Taiz L. (2006). Fisiología Vegetal/ Plant Physiology 1338 p.p. https://books.google.com.co/books/about/Fisiologia_vegetal_Plant_Physiology.html?id=H_1CmwEACAAJ&pgis=1
- Zhang, S. Q. y Outlaw, W. H. (2001). Abscisic acid introduced into the transpiration stream accumulates in the guard-cell apoplast and causes stomatal closure. *Plant, Cell and Environment*, 24(10), 1045–1054. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00755.x>
- Zheng, Y. L., Sun, W. B., Zhou, Y. y Coombs, D. (2009). Variation in seed and seedling traits among natural populations of *Trigonobalanus doichangensis* (A. Camus) Forman (Fagaceae), a rare and endangered plant in southwest China. *New Forests*, 37(3), 285–294. <https://doi.org/10.1007/s11056-008-9124-5>
- Zhou, W., Chen, F., Luo, X., Dai, Y., Yang, Y., Zheng, C., Yang, W. y Shu, K. (2020). A matter of life and death: Molecular, physiological, and environmental regulation of seed longevity. *Plant Cell and Environment*, 43(2), 293–302. <https://doi.org/10.1111/pce.13666>
- Zonia, L. y Munnik, T. (2007). Life under pressure: hydrostatic pressure in cell growth and function. *Trends in Plant Science*, 12(3), 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.01.006>

