

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
INSTITUTO DE HORTICULTURA**

**Calidad poscosecha en cuatro especies de árboles
de navidad, y RAPD asociados a resistencia a
alta intensidad luminosa y manejo aséptico de
semilla *in vitro* en *Abies religiosa***

TESIS

Que como requisito parcial

Para obtener el Título de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta:

JOSÉ GUADALUPE ALVAREZ MOCTEZUMA

Diciembre, 2006

Chapingo. Texcoco. Estado de México.



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

Calidad poscosecha en cuatro especies de árboles de navidad, y RAPD asociados a resistencia a alta intensidad luminosa y manejo aséptico de semilla *in vitro* en *Abies religiosa*

Tesis realizada por **José Guadalupe Álvarez Moctezuma** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:



Dr. Jaime Sahagún Castellanos

ASESOR:



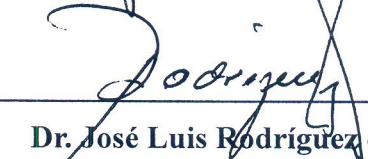
Dra. María Teresa Colinas León

ASESOR:



Dr. Juan Porfirio Legaría Solano

ASESOR:



Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESOR:



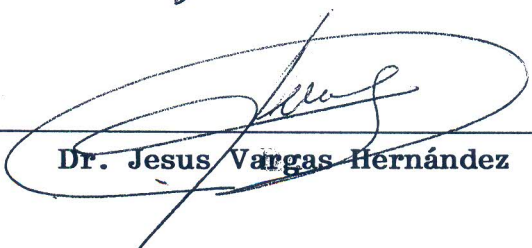
Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

ASESOR:



Dr. Aureliano Peña Lomelí

LECTOR EXTERNO:



Dr. Jesus Vargas Hernández

AGRADECIMIENTOS

A la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo económico, a través de financiamiento del proyecto de investigación CONAFOR-2002-C01-6181 “Tecnologías para la restauración de los bosques en declinación del Distrito Federal”

Al Ing. Luciano Zárate Durante (Agros Navidad S.A. de C. V.) y Lic. Pedro Ernesto del Castillo (Ciclo Verde) por los árboles de navidad proporcionados.

Al vivero forestal "San Luis Tláhuac" (Xochimilco) por el apoyo brindado.

A quienes conforman el Comité Asesor: Dr. Jaime Sahagún Castellanos, Dra. María Teresa Colinas León, Dr. Juan Porfirio Legaria Solano, Dr. José Luis Rodríguez de la O, Dr. José Oscar Mascorro Gallardo y Dr. Aureliano Peña Lomelí por sus valiosas aportaciones.

Al Dr. Irán Alia Tejacal, por su apoyo en la toma de datos de calidad poscosecha.

Al personal de los laboratorios de Usos Múltiples, Genética Molecular y Cultivo de Células, Tejidos y Órganos Vegetales del Departamento de Fitotecnia (Universidad Autónoma Chapingo).

Al Sr. Juan Sánchez Martínez, técnico del Laboratorio de Genética Forestal, por su valiosa colaboración.

A la Sra. Enriqueta Velázquez Bravo, secretaria del Área de Ecología y Silvicultura, por su apoyo logístico.

Al Arq. Armando S. Alavid Pérez, por su apoyo incondicional.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor nació en Cerro Azul, Veracruz. Realizó estudios en la Escuela Nacional de Maestros y ejerció como profesor de educación primaria durante tres años.

La licenciatura fue estudiada en el Departamento de Fitotecnia (Universidad Autónoma Chapingo). La Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural fue realizada en el Colegio de la Frontera Sur (San Cristóbal de Las Casas, Chiapas).

El autor trabajó durante trece años como profesor-investigador de tiempo completo en la Escuela de Biología de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

Desde hace cuatro años el autor trabaja como profesor-investigador de tiempo completo en la División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Agradecimientos.....	iv
Datos Biográficos.....	v
Resumen General.....	viii
General Abstract.....	xi
Introducción General.....	1
Interspecific differences in postharvest quality on Mexican Christmas trees.....	4
Abstract.....	5
Introduction.....	5
Materials and Methods.....	7
Results and Discussion.....	10
Conclusions.....	22
Acknowledgment.....	24
References.....	24
Tratamientos de poscosecha en árboles de navidad montano-tropicales.....	26
Resumen.....	27
Abstract.....	28
Introducción.....	29
Materiales y Métodos.....	31
Resultados.....	34
Discusión.....	37
Conclusiones.....	41
Agradecimientos.....	42
Referencias citadas.....	42
Optimización de un método de extracción de ADN genómico para <i>Abies religiosa</i>	44
Resumen.....	45
Abstract.....	45
Introducción.....	45
Materiales y Métodos.....	46
Resultados y Discusión.....	48

Conclusiones.....	51
Agradecimientos.....	51
Referencias.....	51
Perfiles de RAPD asociados a la resistencia a alta intensidad luminosa en brinzales de <i>Abies religiosa</i>	55
Resumen.....	56
Abstract.....	57
Introducción.....	58
Materiales y Métodos.....	60
Resultados y Discusión.....	62
Conclusiones.....	65
Agradecimientos.....	66
Referencias citadas.....	66
Desinfección y selección de inóculo <i>in vitro</i> de <i>Abies religiosa</i>	74
Resumen.....	75
Abstract.....	75
Introducción.....	75
Materiales y Métodos.....	76
Resultados.....	77
Discusión.....	77
Conclusiones.....	79
Agradecimientos.....	80
Referencias.....	81
Conclusiones generales.....	83

RESUMEN GENERAL

En México se requieren 1'700,000 árboles de navidad por año. Esto ocupa más de 200 productores; genera muchos empleos indirectos en navidad; es la actividad forestal más rentable, y como se basa en especies nativas, permite conservar los recursos genéticos.

No hay estudios comparativos de calidad en poscosecha en especies mexicanas. El objetivo fue identificar en las especies mexicanas más cultivadas la mejor en calidad poscosecha. *Pseudotsuga menziesii* mostró valores más cercanos a un idiotipo en más variables. Muchas correlaciones fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$), pero algunas presentaron encrucijadas: por ejemplo, al seleccionar la especie más ligera, también se selecciona la del metabolismo más rápido (*P. menziesii*). Muchas variables son explicadas por una sola variable. Ninguna de las especies fue perfecta, por lo tanto, se requiere mejoramiento genético. La mejor procedencia fue Tlaxcala.

El principal problema a afrontar en el manejo en poscosecha de árboles de navidad es la pérdida de agua. El objetivo fue evaluar la efectividad de varios tratamientos para alargar la vida en poscosecha de árboles de navidad de las especies más utilizadas en México cultivados en altitudes considerables en una región tropical. El mejor tratamiento fue la inmersión sostenida de la base del tronco en agua; este tratamiento redujo la cantidad de hojas que se cayeron; mantuvo las humedades total del árbol y de la ramilla en particular; y exhibió un menor cambio de croma, matiz y luminosidad de hojas jóvenes y adultas. La especie y procedencia que presentaron una mejor respuesta fueron *P. menziesii* y Tlaxcala, respectivamente; en éstas se detectó una menor cantidad de hojas caídas; croma, matiz y luminosidad de hojas jóvenes y adultas exhibieron un menor cambio con respecto a sus valores iniciales.

Se probaron dos protocolos convencionales y dos productos comerciales de extracción de ADN vegetal en *Abies religiosa*. Las extracciones se hicieron de tejido vegetal fresco y seco, con el objetivo de identificar el mejor método de purificación de ADN para esta especie y determinar el efecto del almacenamiento en seco de sus hojas en la extracción de ADN. El mejor método de extracción se obtuvo con la aplicación de Nucleon Phytopure Plant DNA Extraction® (AMERSHAM BIOSCIENCES) con mercaptoetanol. Los demás métodos produjeron ADN impuro. Sin embargo, este método sólo fue efectivo para aislar ADN de tejido fresco.

No es posible realizar plantaciones de *A. religiosa* sin cobertura, porque es una especie tolerante a la sombra y sus brinzales son susceptibles a alta intensidad luminosa. No obstante, esta especie exhibe variación intraespecífica natural en la resistencia a la exposición a alta intensidad lumínica. Para determinar si esta variación tiene una base genética se planeó una investigación cuyo objetivo fue detectar perfiles de RAPDs asociados a la resistencia a alta intensidad luminosa en brinzales de *A. religiosa*. Se extrajo ADN de 15 brinzales resistentes y 15 susceptibles a alta intensidad luminosa (mediante gradientes de sombra), y se evaluaron 35 iniciadores. Se tomaron datos de las variables siguientes: supervivencia a alta intensidad luminosa, número de acículas, apertura estomatal, número de estomas y altura del brinjal. 24 % de los brinzales sobrevivieron a alta intensidad luminosa. Con base en el análisis estadístico, se sugiere que la supervivencia, altura, número de hojas y apertura estomatal son controladas genéticamente. La supervivencia a alta intensidad luminosa está determinada principalmente por la apertura estomatal.

Los bosques de *A. religiosa* en el Ajusco, México están en declinación. Se requiere restablecer poblaciones a partir de algunos árboles supervivientes en laderas afectadas. Para

lograrlo es necesario incrementar dichas poblaciones, por lo que para la germinación *in vitro* se probaron desinfectantes (H_2O_2 , CH_3OH , NaOCl) y evaluaron inóculos para establecimiento. El mejor desinfectante fue la inmersión de la semilla en H_2O_2 , y los mejores inóculos fueron la semilla completa y primeras hojas.

GENERAL ABSTRACT

Mexico requires 1.7 million Christmas trees per year; especially from species of the *Cupressus*, *Pinus*, *Pseudotsuga* and *Abies* genera. There are more than 200 Mexican producers of Christmas trees. Christmas tree production generates employment during their cultivation and the holiday season. Land areas used for Christmas tree plantations cannot be used for other purposes due to high steep slopes. Mexican plantations of Christmas trees use native species, allowing preservation of natural forest and associated species' genetic resources. It is the most profitable forest activity.

There are no comparative studies in postharvest quality of Mexican Christmas trees. The objective of this study was to identify the best postharvest performing Mexican cultivated species. The four studied species displayed undesirable characteristics. Genetic improvement is thus required. *Pseudotsuga menziesii*, showed values valuable for ideotype breeding in most variables. The best provenance was Tlaxcala. Several correlations between variables showed trade-offs in selecting the best species.

The principal problem to confront in postharvest-management of Christmas trees is water lost. This problem prompted a study whose aim was the evaluation of the effect of treatments to increase postharvest life of the most high altitude cultivated Christmas tree species in tropical regions of Mexico. The best treatment was the immersion of the trunk basis into water which decreased the number of abscised leaves, preserved total and twig humidity, and caused the lowest change in chroma, hue, and lightness of young and mature leaves. The species and provenance that showed the best performance were *P. menziesii* and Tlaxcala, respectively; both showed the least abscised leaf number; and chroma, hue, and luminosity of young and mature leaves shows the least change with respect to initial values.

Two conventional laboratory protocols and two commercial DNA extraction protocols for plants in *Abies religiosa* were tested. Extractions were done in fresh and dry tissue leaves to identify the best extraction DNA method for this species and to determine the effect of dry storage leaves in DNA extraction. The best method for DNA extraction was the one based on Nucleon Phytopure Plant DNA Extraction® (AMERSHAM BIOSCIENCES) add mercaptoethanol. Other methods show contaminants. This method was effective only for the DNA isolation from fresh tissue.

Abies religiosa plantations are not possible without tree covering because this species is shade tolerant, and their seedlings are susceptible to high intensity light. Nevertheless, *A. religiosa* shows natural intraspecific variation in resistance to high intensity light. The aim was to detect RAPD profiles associated to resistance for high intensity light on *A. religiosa* seedlings. DNA from 15 resistant and 15 susceptible seedlings to high intensity light (throughout shadow gradients) were isolated, and 35 primers were evaluated. Variable registered were: seedling survival to high intensity light, leaf number, stomata aperture, stomata number, and plant height. 24% seedlings survived to high intensity light. It is suggested that survival, height, leaf number, and stomata aperture are genetically controlled variables. Seedling survival (to high intensity light) is mainly determined by stomata aperture.

Abies religiosa forests in Ajusco, Mexico are in declination. It is required to restore populations using some survivor trees from affected slope. For *in vitro* germination, disinfectants were proved (H_2O_2 , CH_3OH , $NaOCl$) and explants for their establishment were evaluated. The best disinfectant was to dip seed in H_2O_2 , and the best explants were whole seed and first leaves.

INTRODUCCIÓN GENERAL

México demanda 1'700,000 árboles de navidad por año; particularmente de especies de los géneros *Cupressus*, *Pinus*, *Pseudotsuga* y *Abies* (SEMARNAT, 2003). Hay más de 200 productores mexicanos de árboles de navidad, muchos ejidatarios y muchos en asociaciones (CONAFOR, 2003). La producción y comercialización de árboles de navidad genera muchos empleos indirectos durante la estación navideña particularmente en áreas urbanas, compensando así la menor actividad en las zonas rurales. Los suelos típicamente usados para las plantaciones de árboles de navidad no pueden ser utilizados para actividad agrícola y/o pecuaria, debido a la alta inclinación de la pendiente. Las plantaciones mexicanas de árboles de navidad usan especies nativas, lo cual permite conservar los recursos genéticos forestales y sus especies asociadas. Es la actividad forestal más rentable¹. Los precios de los árboles de navidad en México son mayores que en E.U.A. y Canadá., por ejemplo, en Diciembre del 2003, un árbol de 1.80 m de *Pseudotsuga menziesii* se vendió de \$ 35.00 a \$ 45.00 dólares en México y de \$ 12.00 a \$ 15.00 dólares en E.U.A.

México importa anualmente más de 300,000 árboles de navidad de E.U.A. y Canadá (SEMARNAT, 2003). Los consumidores argumentan que los árboles de México tienen menor calidad (menos tiempo de vida de anaquel, amarillamiento, marchitamiento, abscisión, morfología, entre otras).

La calidad poscosecha depende de la especie. Las especies de los árboles de navidad tienen diferente capacidad de retención de agua (Chastagner y Riley, 2003), secado en poscosecha (Seiler *et al.*, 1988; Hinesley y Snelling, 1995, 1997), flamabilidad (Van Wagner, 1963; Ahrens y Stephens, 1975; White *et al.*, 1977), estado hídrico (Chastagner,

¹ Jorge Torres, com. pers., 2005.

1986; Chastagner y Hinesley, 2000; Ahrens y Stephens, 1975), tiempo de almacenamiento, color de hojas, pérdida de hojas, tiempo de secado, absorción de agua, marchitez de tallos (Chastagner, 2002), densidad (USDA, 1989), abscisión de acículas, color del follaje, pérdida de la fragancia y flexibilidad de ramas (Hinesley, 1984). Aunque hay mucha información de las características de poscosecha de algunas especies, tales como *Abies fraseri*, se requiere información de otras (Bates, 2002). Por lo tanto, se requiere una selección interespecífica de caracteres de importancia en poscosecha.

Por otro lado, no se ha evaluado la efectividad de los tratamientos poscosecha en poblaciones de las especies más utilizadas en la producción de árboles de navidad en México (*Pinus ayacahuite* y *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca*). Sólo se han evaluado poblaciones boreales de *P. menziesii* (Simpson, 1984). Los marcadores moleculares han mostrado baja variación intrapoblacional y alta variación interpoblacional en *P. menziesii* (Li y Adams, 1989; Viard *et al.*, 2001). En México, *P. menziesii* muestra una alta discontinuidad en la distribución (Hermann y Lavender, 2001). Entonces, es necesario evaluar poblaciones mexicanas de esta especie en función de su respuesta específica a tratamientos poscosecha.

Además, hay poca información sobre protocolos de extracción que permitan obtener ADN de buena cantidad y calidad en plantas leñosas. Las especies leñosas, principalmente coníferas, presentan altas cantidades de polisacáridos u otros metabolitos secundarios como polifenoles, terpenos y resinas, mismos que dificultan la extracción del ADN e impiden su análisis (Doulis *et al.*, 2000). El aislamiento y purificación de ADN es de crucial importancia, pues la pureza y el alto peso molecular de ADN es un requerimiento absoluto para un análisis exitoso de huellas genómicas y para la aplicación de otras técnicas biológicas moleculares. Las impurezas del ADN pueden alterar las reacciones enzimáticas,

la electroforesis y la cuantificación.

Es importante señalar que no es posible realizar plantaciones sin cobertura de *A. religiosa*, porque es una especie tolerante a la sombra y sus brinzales son susceptibles a alta intensidad luminosa. No obstante, *A. religiosa* exhibe variación intraespecífica natural en la resistencia a la exposición a alta intensidad lumínica. Además, existe variación interespecífica a la resistencia de las plántulas a altas intensidades lumínicas. Entonces, hay alta probabilidad de encontrar una base genética que respalde la variación intraespecífica.

Por último, los bosques de *A. religiosa* del Ajusco son amenazados por factores crecientes que los han conducido a un proceso de declinación (Alvarez *et al.*, 1998). Se requiere restablecer las poblaciones originales, a partir de la escasa semilla de los árboles supervivientes en las laderas más afectadas. Las técnicas *in vitro* asegurarán la reproducción del material.

Con base en lo anterior, los objetivos de la presente investigación fueron: a) identificar la especie con mejor calidad poscosecha; b) evaluar la efectividad de varios tratamientos para alargar la vida poscosecha en árboles de navidad; c) establecer un método de purificación de ADN genómico; d) detectar perfiles de RAPDs asociados a la resistencia a alta intensidad luminosa en brinzales de *A. religiosa*; y e) evaluar las condiciones *in vitro* que permitan el establecimiento aséptico de semillas y seleccionar el inóculo más adecuado para la producción de plántulas en *A. religiosa*.

Interspecific differences in postharvest quality on Mexican Christmas trees²

² Álvarez-Moctezuma J. G., I. Alia-Tejacal, M. T. Colinas-León and J. Sahagún-Castellanos. Accepted by *Silvae Genetica* 2006.

Abstract

There are no comparative studies in postharvest quality of Mexican Christmas trees. The objective of this study was to identify the best postharvest performing Mexican cultivated species. The experiment was done in the 2004-2005 season with six replications (trees) of *Abies religiosa*, *Cupressus lindleyi*, *Pinus ayacahuite*, and *Pseudotsuga menziesii*; from two provenances (Tlaxcala and Veracruz) for the last two species. Cultural management was similar. Each tree was placed under dry conditions according to a completely randomized design. Secondary branches, twig diameter and density, initial and final weight, biomass allocation, areas and volumes, total and twig moisture content, foliage density, color, chlorophyll a/b ratio, CO₂ and ethylene production were evaluated. Analyses of variance, comparisons of means, correlation, and simple regression were performed. The four studied species displayed undesirable characteristics. Genetic improvement is required. *P. menziesii* showed values nearer ideotype breeding in more variables. The best provenance was Tlaxcala. Several correlations between variables showed trade-offs in selecting the best species.

Introduction

Mexico consumes 1.7 million Christmas trees per year; especially from species of the *Cupressus*, *Pinus*, *Pseudotsuga* and *Abies* genera (SEMARNAT, 2003). There are more than 200 Mexican producers of Christmas trees (CONAFOR, 2003). Christmas tree production generates employment during their cultivation and the holiday season. Land areas used for Christmas tree plantations cannot be used for other purposes due to high steep slopes. Mexican plantations of Christmas trees use native species, allowing preservation of natural forest and associated species' genetic resources. It is the most

profitable forest activity³. Prices of Christmas trees are higher in Mexico than in USA and Canada; for example, in December of 2003, the price of a 1.80 m *P. menziesii* tree was \$ US 35 to 45 in Mexico and \$ US 12 to 15 in USA.

Mexico imports more than 300,000 Christmas trees annually from USA and Canada (SEMARNAT, 2003). Consumers also argue that Mexican trees show lower quality (less postharvest life, yellowing, wilting, abscission, morphology, and so on).

Christmas tree species have different water retention (Chastagner and Riley, 2003), postharvest drying (Seiler *et al.*, 1988; Hinesley and Snelling, 1995, 1997), flammability (White *et al.*, 1997), hydric stage (Chastagner, 1986; Chastagner and Hinesley, 2002), storage time, leaf color, needle loss, drying time, water absorption, stem wilting (Chastagner, 2002), density (USDA, 2002), aroma loss, and branch flexibility (Hinesley, 1984). Although there is a considerable amount of information on postharvest characteristics of some species, information from others species is required (Bates, 2002).

Postharvest evaluations have been conducted in species of *Abies* (14), *Pinus* (5), *Picea* (3), *Chamaecyparis* (1), *XCupressocyparis* (1), *Cupressus* (1), *Juniperus* (1), and *Pseudotsuga* (1) genera (Chastagner, 1986, 2002; Chastagner and Hinesley, 2002; Chastagner and Riley, 2003; Elizalde, 1979; Hinesley, 1984; Hinesley and Chastagner, 2002; Hinesley and Snelling, 1991, 1995, 1997; Mitcham *et al.*, 1988; Montano and Proebsting, 1985; Seiler *et al.*, 1988). But, there are no studies in several Mexican species.

The objective of this paper was to identify the species with better postharvest quality, among *Abies religiosa*, *Cupressus lindleyi*, *Pinus ayacahuite* and *Pseudotsuga menziesii*; which are cultivated as Christmas trees in Mexico.

³ Jorge Torres Pérez, com. pers., 2005.

Materials and Methods

Trees used in this study were harvested in the same day in Christmas tree plantations planted in 1994 (*A. religiosa*, *P. menziesii*), 1995 (*P. ayacahuite*) and 1996 (*C. lindleyi*) and had a similar cultural handling up to harvest. Field packed trees were transported to The Laboratory of Floriculture (*Universidad Autónoma Chapingo*). The experiment was conducted between November 2004 and March 2005.

Trees (between 1.5 and 1.8 m tall) were placed in stands (50 x 50 cm dry wood-support). Laboratory environmental conditions were: $16.5 \pm 4.5^{\circ}$ C, 60 ± 25 % HR and 11.5 ± 0.5 hours of natural light ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); during 85 d.

Trees from two provenances were evaluated. a) Tlaxcala (T) is located at $19^{\circ} 27'$ N latitude and $97^{\circ} 55'$ W longitude; sub-humid and semi-cold climate with summer rain; warmest months: April and May; mean annual precipitation: 1141 mm; temporary streams; protected slopes from strong winds; usually deep soils (Mexico, 2005). b) Veracruz (V) is at $20^{\circ} 32'$ N latitude and $98^{\circ} 29'$ W longitude; very rough topography; humid and semi-cold climate, summer rain; mean annual precipitation: 1380 mm (Domínguez, 1986).

The experimental unit was a tree; and six replications were used. The 36 experimental units were arranged in a completely randomized design (six rows and six columns in laboratory). The six treatments (taxa and provenances) were: *A. religiosa* (ArV) and *C. lindleyi* (CIV) from Veracruz, *P. ayacahuite* var. *veitchii* from Tlaxcala (PaT) and Veracruz (PaV), *P. menziesii* var. *glauca* from Tlaxcala (PmT) and Veracruz (PmV).

Trunk diameter was taken at 1.5 m height (from the top to the base) with diameter tape. Trunk area (T_A) was calculated with the formula $T_A = \pi r^2$. Trunk volume (K_V) (from the top to 1.5 m) was calculated using the formula $K_V = 1.5T_A$. Largest (D) and smallest canopy

diameters (d) at 1.5 m (from the top to the base) were determined with measure tape TOOL0007 (SUNSCOPE®). Basal area (B_A) was calculated as: $B_A = \pi[(D+d)/4]^2$. Tree volume (T_V) (from the top to 1.5 m) was calculated as $T_V = 1.5B_A/3$.

Total initial weight (stand included) (TIW) a day after cutting (abbreviated as dac) was determined using a mechanical balance (TORINO®). Stand (SW), total final (stand included) (TFW), trunk (TW) and secondary stem weights (SSW) were quantified (85 dac) with the balance. Abscised leaves and twig weight (ALTW) were measured with an electronic balance (Scout II, OHAUS®). Intact final twig weight was determined (85 dac) with an electronic balance (Explorer Pro, OHAUS®); after three weeks in an oven (95° C) (FELISA®), the final dry weight of twigs was evaluated. Initial tree ($TIW = TIW - SW$), final tree ($FTW = FTW + ALTW - SW$) and not abscised leaves and twigs weights ($NALTW = FTW - TW - SSW$) were also determined. Relative weights were calculated based on FTW.

Foliage density (area) (m^{-1}) was evaluated using a plant canopy analyzer (LAI-2000) with a 45° view cap. Lightness, chroma, and hue were evaluated in young (<50 % of maximum length) and mature marked leaves at 3, 10, 17, 30, 47, 66 and 81 dac with a portable sphere spectrophotometer SP62 (X-RITE®). Changes considering the initial data (3 dac) were calculated. Days to maximum change were registered.

Diameter (D, mm) and volume (V, mm^3) of twigs were determined with a caliper and by the water displacement method with a 500 mL graduated cylinder. Twig density (85 dac) ($kg \cdot dm^{-3}$) was calculated by dividing weight by volume.

Young and mature leaves were collected (0.8 g $\pm$ 0.2 g) (Explorer Pro, OHAUS®) at 4, 11, 18, 34, 48, 60, and 85 dac. Chlorophyll was extracted according to Witham *et al.*

(1971); 1:10 [sample: 80 % (v/v) cold acetone] the material was grounded with tissue homogenizer T25 B51 (IKA WORKS®) and centrifuged (1600 g, 15 min) with an ultracentrifuge RC-5B (SORVALL®). Absorbance with spectrophotometer Spectronic 21D (MILTON ROY®) was evaluated. Chlorophyll concentration ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ of tissue) was calculated: $\text{Chlorophyll_a} = [(12.25 * \text{Absorbance}_{645}) - (2.79 * \text{Absorbance}_{663})] * (D / 1000W)$; $\text{Chlorophyll_b} = [(21.5 * \text{Absorbance}_{663}) - (5.1 * \text{Absorbance}_{645})] * (D / 1000W)$; where W: weight (g) and D: Dilution (110 or 160) (Lichtenthaler, 1987). Chlorophyll a/b ratio and days to maximum chlorophyll a/b ratio were also determined.

Two approximately 10 g twig samples (young and mature) (electronic balance, Scout II, OHAUS®) of each tree at 4, 11, 18, 34, 48, 60, and 85 dac were collected. Each twig sample was kept in a 50 mL hermetic plastic container with a rubber hose. A day later, a 10 mL air sample was collected and put into a vacuum tube (Vacutainer®). Ethylene and CO_2 concentrations were measured (percentage) with a gas chromatograph Hewlett 5840 Packard Series II. The CO_2 production was evaluated as follows: $\text{CO}_2 (\text{mLKg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}) = \% \text{CO}_2 / 1,000 * V / W * 1 / T$; where V: volume of empty space (mL), W: weight (kg), and T: time in hours. The calculation of ethylene production was according to the formula: $\text{Ethylene production } (\mu\text{L}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}) = \% \text{ Ethylene} / 10,000 * V / W * 1 / T$. For both gases, days to maximum production were determined.

Tree water loss (TWL) (85 dac) was calculated with the formulae: $\text{TWL (Kg)} = \text{TIW} - \text{TFW}$, and $\text{TWL (\%)} = (\text{TIW} - \text{TFW}) / \text{TIW}$. Approximately 10 g of twig (per tree) were collected 85 dac (electronic balance, Scout II, OHAUS®); this twig was: a) hydrated during 24 hours; b) dripped (excess humidity was eliminated with absorbent paper), c) weighed; d) dried (twig was put into an oven (FELISA®) during two weeks), and e) weighed again.

Twig moisture content was calculated with the formula: $H (\%) = [(Wet\ weight - Dry\ weight)/Dry\ weight] \times 100$.

One way analyses of variance with six treatments (four taxa and two provenances) and six replications per treatment were performed. Relative data were transformed (square root) (prior to analysis of variance) and when many data were zero, 0.01 was added (prior to transformation). Comparison of averages was made using Fisher Least Significant Difference (LSD). Multiple correlations were calculated using Excel®. When a correlation was significant ($P=0.01$) a simple linear regression analysis was made (Excel).

Results and Discussion

There were statistical differences among taxa averages for most studied variables (ANOVA, $P<0.05$). *P. menziesii* showed data closer to the tree ideotype in more variables (Figs. 1-10, Table 1). The smallest "trunk volume" was displayed by PmV, whereas the minor "initial weight/volume" corresponded to PmT (LSD, $P\leq 0.05$) (Table 1). Smaller cut-tree weight reduces transport cost.

C. lindleyi was the only species with cones (LSD, $P\leq 0.05$). Precocious reproduction would help a forest breeding program. A short breeding cycle species (eight years) could allow a faster selection program. In addition, *C. lindleyi* cones are small (less than 5 cm diameter) and spread along all tree, so that consumers may not consider them a bad characteristic. In Mexico *C. lindleyi* Christmas trees with cones are actually sold.

Biomass allocation

The best biomass allocation was shown by *C. lindleyi*, with the lowest percentage of trunk and secondary stems (30 %), and twigs and leaves with the highest weight percentage (70 %) (LSD, $P\leq 0.05$) (Fig. 1). Biomass allocation is important for aesthetics and trash handling, since a Christmas cut-tree with light stem and branches is easier to compost.

Table 1. Comparison[‡] of means of 13 variables of four species with two provenances[¶].

Variable	ArV	CIV	PaV	PaT	PmV	PmT
Trunk volume (dm ³)	1.39b	1.01b	1.20b	3.06c	0.34a	1.41b
Tree volume (m ³)	0.37c	0.41c	0.56b	0.61b	0.40c	0.69a
Weigh / Volume (Kg/m ³)	28.5d	26.7cd	19.6b	19.3b	25.5c	15.5a
Foliage density (m ⁻¹)	4.33cd	10.34a	6.37c	4.12d	5.97cd	8.22b
Twig diameter (mm)	3.50b	4.28cd	4.76d	4.25c	2.62a	3.32ab
Twig density (Kg/dm ³)	0.55c	0.56c	0.67d	0.45b	0.35a	0.32a
Moisture loss (%)	63.4bc	68.3c	53.4b	30.8a	89.0d	67.4c
Hue Y (Grade)	109bc	101d	110b	109bc	114a	106c
Lightness Y (%)	48c	55a	50c	44d	53b	56a
Chroma Y (Grade)	17b	5c	25a	25a	16b	18b
Hue M (Grade)	116b	114c	116b	117b	117b	129a
Lightness M (%)	38b	44a	35c	36bc	43a	42a
Chroma M (Grade)	11b	11b	17a	16a	11b	7c

[‡] Means, in row, with same letter are not statistically different (LSD, P=0.05).

[¶] *Abies religiosa* (Ar), *Cupressus lindleyi* (Cl), *Pinus ayacahuite* (Pa), *Pseudotsuga menziesii* (Pm).

Provenances: Veracruz (V), Tlaxcala (T). M: Mature leaf, Y: Young leaf.

Foliage

The highest "foliage density" was showed by CIV, the smallest "twig diameter" by PmV, and the lowest "twig density" by PmT and PmV (LSD, $P \leq 0.05$) (Table 1). An ideal Christmas tree must have a great biomass dedicated to leaves. The foliage density is an important attribute in postharvest evaluation of cut Christmas trees for aesthetic reasons (USDA, 2002).

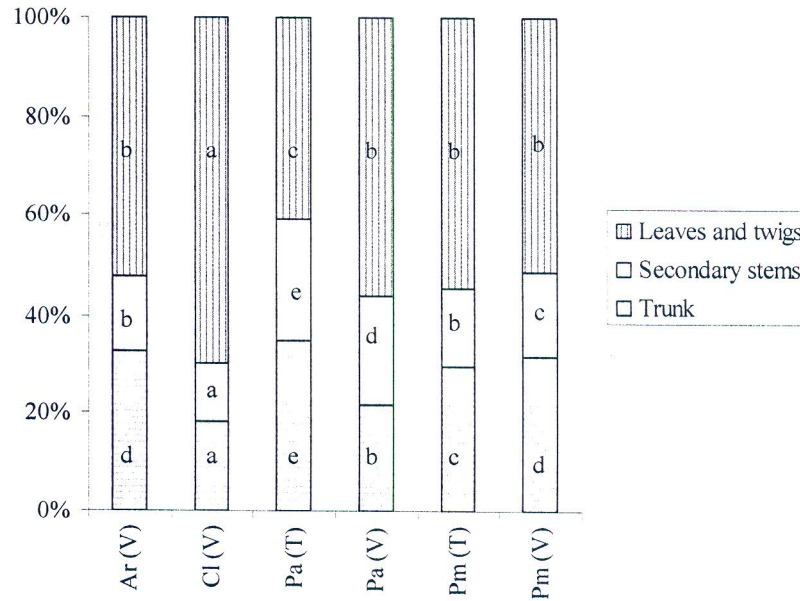


Figure 1. Biomass allocation (85 days). Means, in column, with same letter show no statistical differences (LSD, $P=0.05$). *Abies religiosa* (Ar), *Cupressus lindleyi* (Cl), *Pinus ayacahuite* (Pa), *Pseudotsuga menziesii* (Pm). Provenances: Veracruz (V), Tlaxcala (T).

The lowest "leaf and twig abscission" corresponded to ArV. ClV showed the highest "leaf and twig abscission" (0.05 Kg), because its dry twigs are fragile and are easily shed; whereas in the remaining species mainly leaves are shed (LSD, $p<0.05$) (Fig. 2). Christmas tree species have shown different degree of leaf abscission (Hinesley, 1984; Chastagner, 2002).

The Tlaxcala provenance showed the lowest "leaf and twig abscission". Due to lower precipitation and larger evaporation (SICLIM, 1990), this population probably has developed local drought tolerance adaptations, which is advantageous in postharvest handling. In *Abies concolor*, seed source influences needle retention (Bates *et al.*, 2004), which suggests that leaf retention is a highly hereditary characteristic (Hinesley and

Snelling, 1997; Parker and Pallardy, 1985; Nielsen and Chastagner, 2005). Twig and leaf retention is a character which could be genetically improved to generate more desirable Christmas trees in terms of house cleaning.

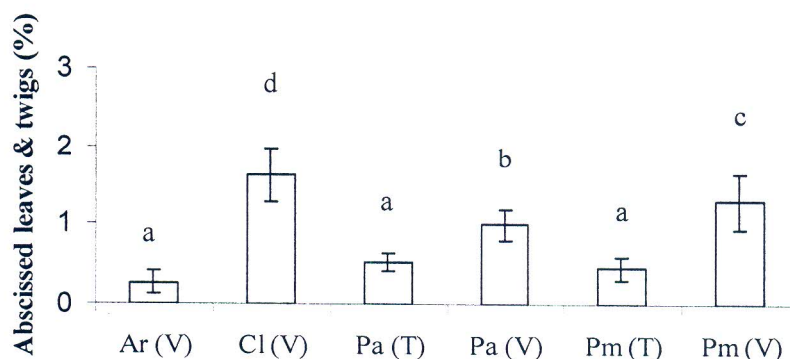


Figure 2. Abscised leaves and twigs (85 days). Means with same letter are not statistically different (LSD, $P=0.05$). *Abies religiosa* (Ar), *Cupressus lindleyi* (Cl), *Pinus ayacahuite* (Pa), *Pseudotsuga menziesii* (Pm). Provenances: Veracruz (V), Tlaxcala (T).

Water loss

The lowest "cut-tree water loss" and "twig water loss" were observed in PaT (85 dac) (LSD, $P \leq 0.05$) (Table 1). Christmas tree species have differential capacity to retain water (Chastagner and Riley, 2003). Cut Christmas tree freshness is a strong function of foliage moisture content (Hinesley, 1984; Chastagner, 1986; Chastagner and Hinesley, 2002). Species vary in drying rate after they are cut (Seiler *et al.*, 1988); for example, *Abies fraseri* dried slowly and had long postharvest life (Hinesley and Snelling, 1995); however, in this study, *A. religiosa* lost water quickly. In addition, a dry cut-tree surrounded by electrical cable is an *ad hoc* fuel to initiate fire. A dry Christmas cut-tree can be consumed by the fire in less than 30 s (RFD, 2000).

P. menziesii did not show leaf or twig epinasty. The longest "period for downward

bending of leaf" was observed in *C. lindleyi* (>85 days); followed by *P. ayacahuite* (15 days), and the worst one was *A. religiosa* (6 days); no differences could be observed between provenances (LSD, $P \leq 0.05$).

Color

Christmas tree ideotype should include: a) long period with constant color values, b) great lightness values (60-80 %) are preferred, because consumers chosen luminosity trees than dark trees, c) leaves with high hue values (108-130 grades) are preferred (meaning greener leaves), in opposition, low hue values (95-108 grades) means yellower leaves; and d) high chroma values (10-25°) are preferred, because means colorful leaves, in opposition, low chroma values (1-10°) means pale leaves.

Taxa with greater number of favorable color characteristics were CIV (9 variables), PaV and PmT (8 variables). PmT displayed more variables with desirable values compared to the initial color (3 variables). The taxa with more favorable characteristics for young leaves were CIV and PaV (5 variables), and CIV, PaV and PmT for mature leaves (Table 1). It is recognized that foliage color is an important variable in postharvest Christmas trees (Hinesley, 1984; Chastagner, 2002). Foliage color varies between *P. menziesii* populations; green for boreal populations and glaucous for austral ones (Domínguez, 1986; Hermann and Lavender 1990). But a meticulous research on this particular matter has not been reported. In this work we detected differences in color components among populations and species.

Taxa that presented more favorable characteristics for hue were CIV, PaV, PmT and PmV (two variables). Taxa that showed more favorable characteristics for chroma were PaT and PaV (four variables). Taxa CIV and PmT showed greater number of characteristics with better values for lightness (four favorable variables). (Table 1).

Chlorophyll, CO₂, and ethylene

In all taxa, "chlorophyll a/b ratio" was constant during 50 days, which can be explained because trunk and branches are important reserves. Thereafter, it was different and the greatest value corresponded to PmV and the worst one to CIV. The "maximum ratio change" was for PmV and the best for CIV. The longest "period for maximum ratio change" was for PaV and the worst one was for PaT (LSD, $P \leq 0.05$) (Fig. 3a).

The lowest average in "CO₂ production" was shown by PmV and the worst by CIV. PmV produced the highest amount of CO₂ and CIV the lowest. The largest "period for maximum CO₂ production" was displayed by PaV; and the worst one by PaT (LSD, $P \leq 0.05$) (Fig. 3b). Similar data for CO₂ production have been obtained in *P. menziesii* mature trees (McDowell, 2005). A low respiration rate is important because a cut-tree produces a low amount of metabolites.

The lowest average in "ethylene production" was displayed by PmV and the highest one by CIV. The "maximum ethylene production" was observed in PmV and the lowest one by CIV. The largest "period to maximum ethylene production" was shown by PaV and the shortest one by PaT (LSD, $P \leq 0.05$) (Fig. 3c). Similar results in ethylene production had been obtained in *Pinus sylvestris* plantlets (Ievinsh and Dace, 1998) and wood (Ingemarsson *et al.*, 1991). In this research, the maximum values appeared from 48 to 60 days; previous works, with plantlets, reported maximums between seven and 15 days (Ievinsh and Dace, 1998). In *Citrus* leaves, the precocity of climacteric peak in ethylene production is a function of maturity stage (Katz *et al.*, 2005). Differences of ethylene production, between cut and uncured petals, have been observed (Van Doorn, 2004).

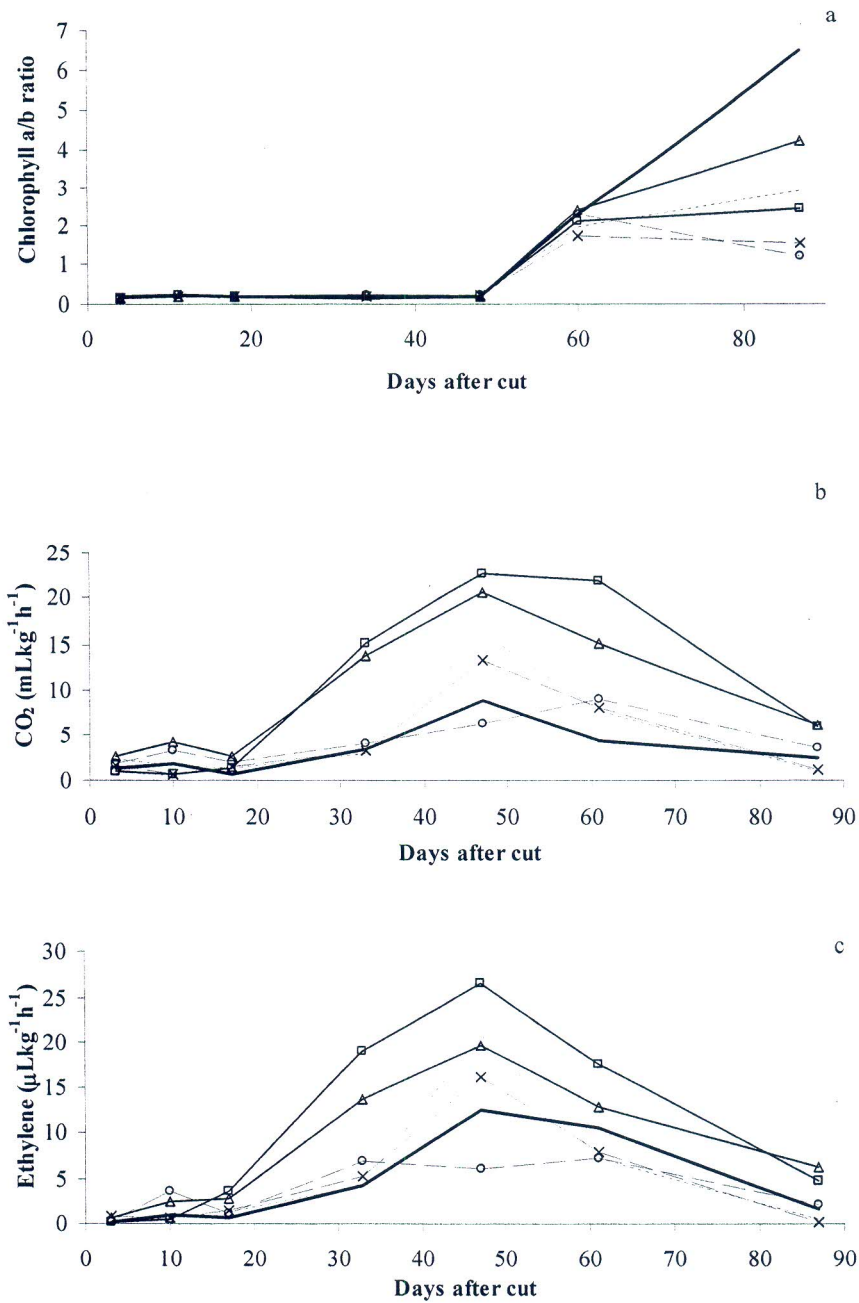


Figure 3. Dynamics of: a) "chlorophyll a/b ratio", b) "CO₂ production", and c) "ethylene production". ArV. (---), ClV. (—), PaT. (o), PaV. (x), PmT. (□), PmV. (Δ). *Abies religiosa* (Ar), *Cupressus lindleyi* (Cl), *Pinus ayacahuite* (Pa), *Pseudotsuga menziesii* (Pm).

Provenances: Veracruz (V), Tlaxcala (T).

In this research, average "CO₂ production" and "ethylene production" were linearly explained by average "cut-tree initial weight" (divided by "cut-tree height") (Fig. 4). In a *Chamaecyparis obtusa* plantation, a logarithmic relationship between weight and respiration was obtained (Ninomiya and Hozumi, 1983). These differences, the shape of response curves, can be explained because in the present work we have a lower observation range (cut trees between 1.5 and 1.8 m tall). Also, we contrasted across species and provenances, whereas Ninomiya and Hozumi (1983) compared within species.

Weight and volume relationship

"Trunk weight" increases as "trunk volume", "final cut-tree weight" or both increase (Fig. 5). Weight and volume trunk relationship has been widely reported in wood production (Vanclay, 1994), however, it has not been registered for cut Christmas trees.

Provenances

Statistical differences between Tlaxcala and Veracruz provenances were observed in "cut tree weight", "trunk weight", "secondary stem weight", "twig and leaf weight", "twig and leaf abscised weight"; "trunk volume" and "cut-tree volume"; "initial cut-tree weight/volume"; "foliage densities", "twig densities"; "twig diameter", "loss of tree moisture" and foliage color variables (ANOVA, $P < 0.05$) (Table 1) (Figs. 1-2).

In Mexico, *P. menziesii* (Hermann and Lavender, 2001), *P. ayacahuite* (Perry, 1991), *A. religiosa* (Aguirre *et al.*, 2000) and *C. lindleyi* have discontinuous populations since they are temperate species that grow at high altitudes (1500-3600 meters over sea level) (Perry, 1991, Farjon and Styles, 1997) in this intertropical heavily-mountained country (INEGI 1985).

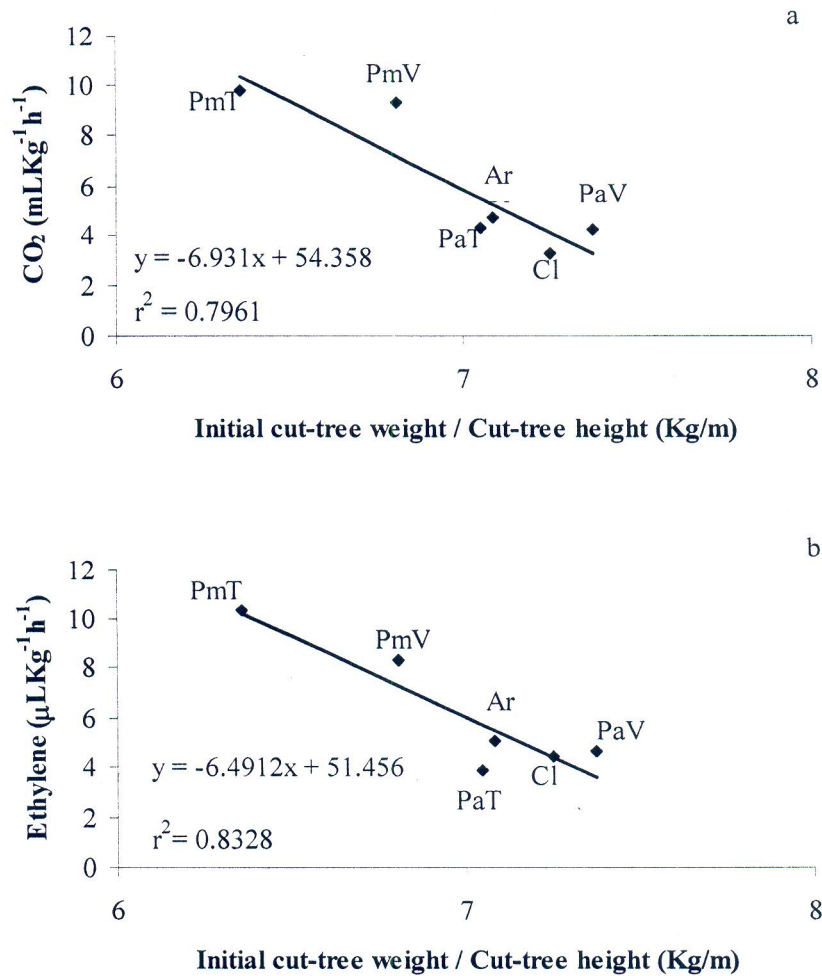


Figure 4. Means of: a) CO₂ and b) Ethylene production vs initial cut-tree weight (divided by tree-height). *Abies religiosa* (Ar), *Cupressus lindleyi* (Cl), *Pinus ayacahuite* (Pa), *Pseudotsuga menziesii* (Pm). Provenances: Veracruz (V), Tlaxcala (T).

Allozymes in *A. religiosa* (Aguirre *et al.*, 2000) and *P. menziesii* (Li and Adams, 1989) and microsatellite markers in *P. menziesii* (Viard *et al.*, 2001) showed low levels of intrapopulation variation and high levels of interpopulation variation. Much of this variation is strongly associated with topographic or geographic characteristics (Rehfeldt, 1983). Topoclinal variation in microenvironmental heterogeneity has been reported for *P.*

menziesii (Hermann and Lavander, 1990). Seed provenance can have an impact in postharvest characteristics (Bates *et al.*, 2004). Therefore, it is advisable to continue evaluating different Mexican populations from these species to continue identifying provenances with important values in postharvest characteristics.

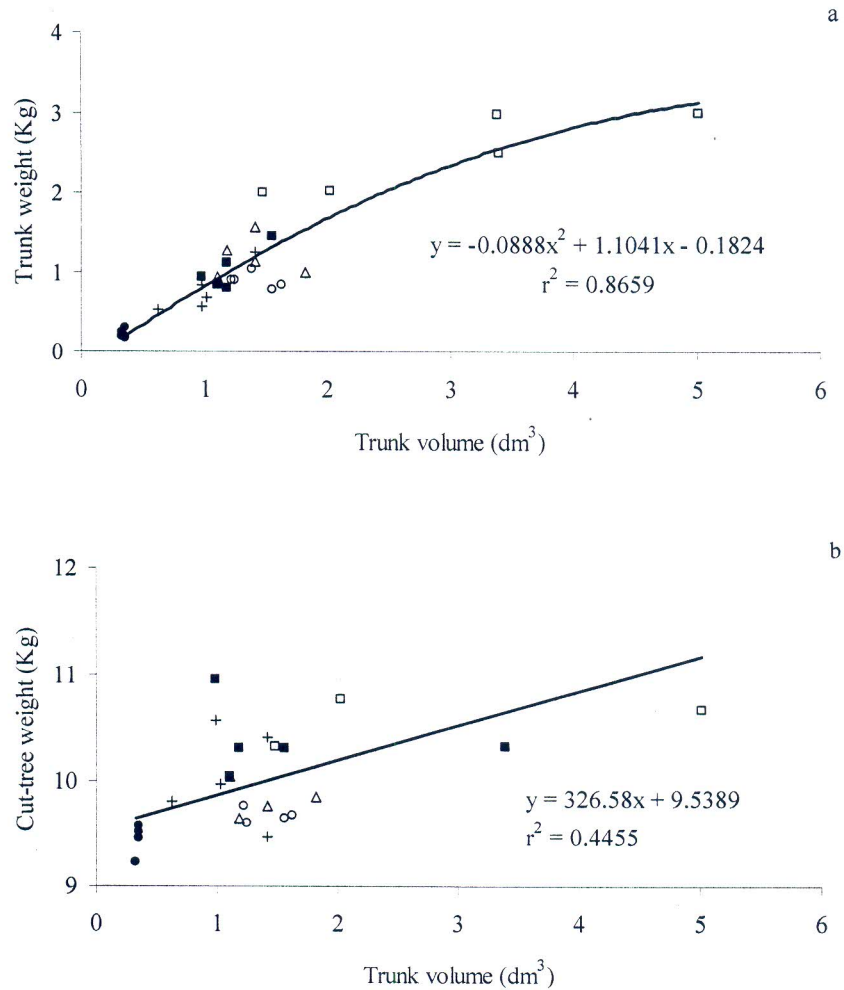


Figure 5. a) "Trunk weight" vs "trunk volume". b) "Cut-tree weight" vs "Trunk volume". ArV (Δ), ClV (+), PaT (□), PaV (■), PmT (○), PmV (●). *Abies religiosa* (Ar), *Cupressus lindleyi* (Cl), *Pinus ayacahuite* (Pa), *Pseudotsuga menziesii* (Pm). Provenances: Veracruz (V), Tlaxcala (T).

Desirable relationships

There was a statistically significant linear relationship between "leaf and twig abscission" and "final cut-tree weight" ($p < 0.001$). Therefore, these two variables can be jointly selected, because the lightest cut-trees (*A. religiosa* and *P. menziesii* from Tlaxcala) tended to show the lowest leaf and twig abscission. Also, "twig diameter" increases as "trunk weight" decreases; and, in mature leaf, "maximum lightness change" increases as "maximum hue change" increases (Fig. 6). "Trunk weight" vs "trunk volume" shows a quadratic relationship, whereas "Trunk weight" vs "final cut-tree weight" presents a linear relationship (Fig. 5). Then, there are some pairs of characteristics with advantages in selection.

Trade-offs

There is a trade-off when two variables are unfavorably related (anthropocentrically speaking). In an analysis of all species, "CO₂ production" and ethylene production" correlated significantly ($P \leq 0.01$) with "trunk volume" ($r = -0.50$ and $r = -0.56$, respectively) and "trunk weight" ($r = -0.62$, for both cases) ($r \geq \text{critical value} = 0.463$). In addition, "trunk weight" explains 75 % of the variation in "cut-tree weight" (ANOVA, $P < 0.01$). In this context, the optimal selection constitutes a trade-off, since, if the lightest species is selected (*P. menziesii*) (which implies a reduction in transport costs), at the same time, the species with the fastest metabolism may be selected as well and vice versa (Fig. 4). Since this relationship is not perfect, however, there may exist individuals with acceptable values for the two traits.

Other examples of trade-offs are: "moisture loss" decreases when "initial cut-tree weight", "trunk diameter" or both increase; "twig diameter" increases if "final cut-tree weight" increases. In young leaf, "maximum lightness change" increases as "period to

maximum lightness change", "maximum chroma change" or both decrease; and, in mature leaf, "maximum lightness change" increases if "maximum chroma change" decreases; in addition, "foliage density" increases when "maximum chroma change in mature leaf" increases, "initial hue in young leaf" decreases or both. Again, although difficult, individuals with a good balance of several traits could be selected. (Tables 2 and 3).

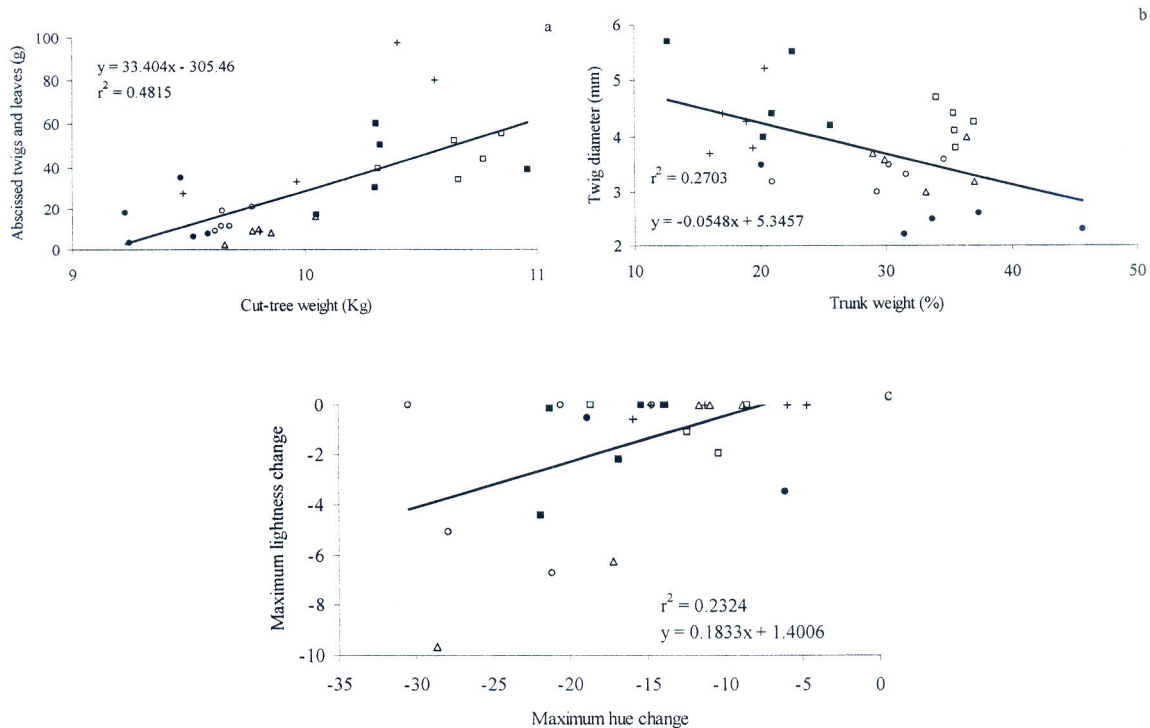


Figure 6. Desirable relationships. ArV (Δ), CIV (+), PaT ($\square$), PaV ($\blacksquare$), PmT ($\circ$), PmV ($\bullet$). *Abies religiosa* (Ar), *Cupressus lindleyi* (Cl), *Pinus ayacahuite* (Pa), *Pseudotsuga menziesii* (Pm). Provenances: Veracruz (V), Tlaxcala (T).

Christmas tree ideotype to look for would be an individual with low trunk percentage and secondary stem weight and high leaf and twig weight percentage. Nevertheless, it might be difficult to select a species with this structure, because "leaf and twig weights" have a significant and positive correlation with "secondary stem weight" ($r=0.5179$, $P\leq 0.01$). In

addition, "secondary stem weight" is significantly and positively correlated with "trunk weight" ($r=0.8089$, $P\leq 0.01$). If we select a tree species with many twigs and leaves, then we might also indirectly select a species with heavy trunk and secondary branches (Fig. 7).

Trade-offs establish a challenge, because when there is a natural trend (although does not always show a firm definition) the breeder has to look for genetically determined outliers; or an assignation of relative weight to the variables may be necessary through construction of a selection index.

Variable y	Variable x	Model	r^2
Moisture loss (%)	Cut tree weight (Kg)	$y=389.15 - 38.82x$	.66**
Moisture loss (%)	Trunk diameter (cm)	$y=109.67 - 8.75x$	.64**
Twig diameter (mm)	Cut tree weight (Kg)	$y=-8.49 + 1.23x$	.48**
Foliage density (m^{-1})	Days to max. lightness change (ML)	$y=2.70 + .06x$	.35*
Foliage density (m^{-1})	Initial hue (YL) (grade)	$y=34.34 - .26x$	.27*
Max. lightness change (YL)	Days to max. lightness change (YL)	$y=-2.14 - .10x$	.37*
Max. lightness change (YL)	Max. chroma change (YL)	$y=-9.21 - .27x$	.22*
Max. lightness change (ML)	Max. chroma change (ML)	$y=-4.22 - .42x$	.27*

Table 2. Trade-offs. Significant to $0.01 < P \leq 0.05$ (*) and $P \leq 0.01$ (**). Max: maximum,

ML: Mature leaf, YL: Young leaf.

Conclusions

The four studied species displayed undesirable characteristics. Genetic improvement is required. *P. menziesii* showed values nearer ideotype breeding in more variables. The best provenance was Tlaxcala. Several correlations between variables showed trade-offs in selecting the best species.

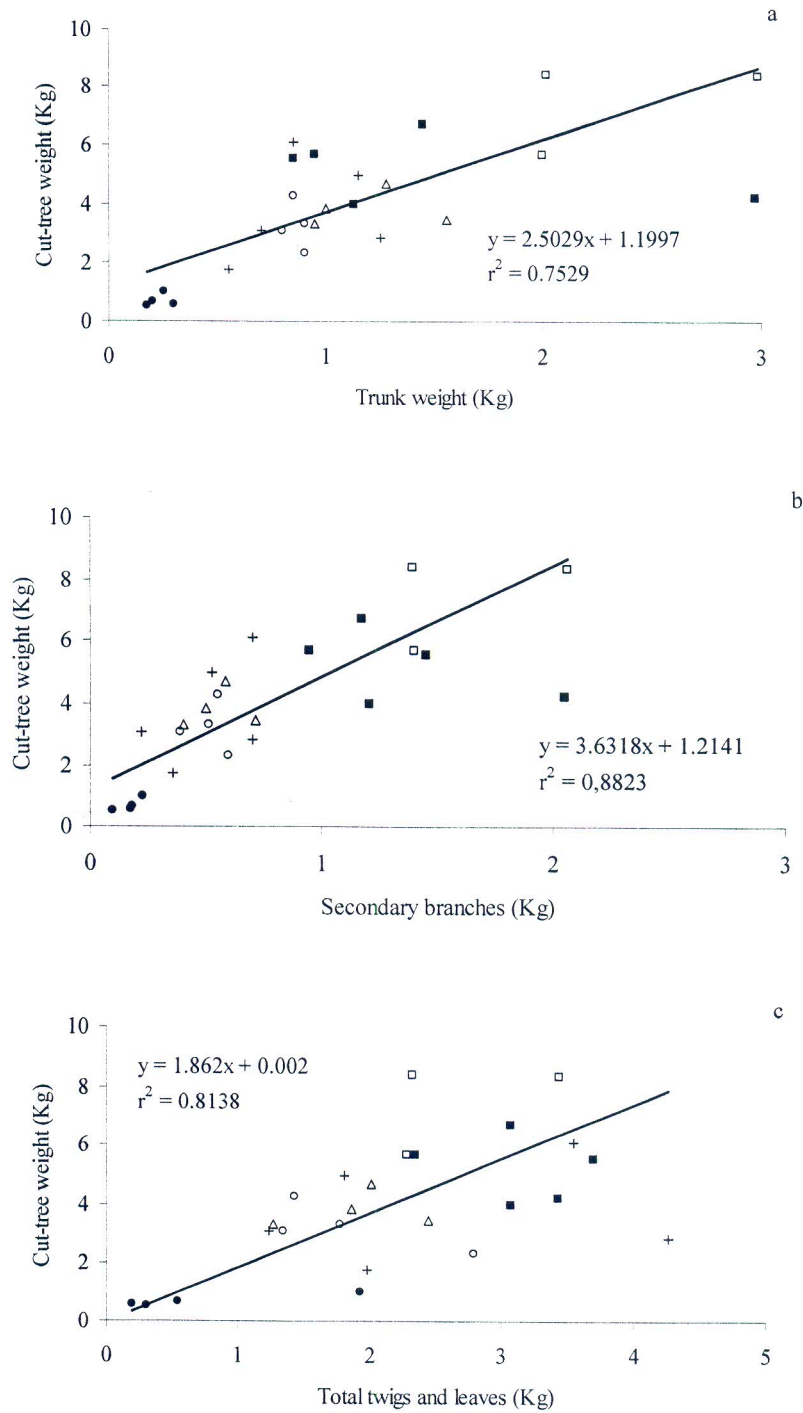


Figure 7. Trade-offs. ArV (Δ), CIV (+), PaT ($\square$), PaV ($\blacksquare$), PmT ($\circ$), PmV ($\bullet$). *Abies religiosa* (Ar), *Cupressus lindleyi* (Cl), *Pinus ayacahuite* (Pa), *Pseudotsuga menziesii* (Pm). Provenances: Veracruz (V), Tlaxcala (T).

Acknowledgment

To Luciano Zárate and Pedro Ernesto del Castillo for trees. To *Comisión Nacional Forestal* and *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* for financial support (CONAFOR-2002-C01-6181). To an anonymous reviewer.

References

- Aguirre P.E., G.R. Furnier and L.E. Eguiarte (2000): Low levels of genetic variation within and high levels of genetic differentiation among populations of species of *Abies* from southern Mexico and Guatemala. *American Journal of Botany* **87**: 362-371.
- Bates, R.M. (2002): Enhancing Christmas tree production and postharvest handling practices. Pennsylvania State University, Harrisburg.
- Bates, R.M., J.C. Sellmer and D.A. Despot (2004): Postharvest Quality of Concolor Fir Affected by Seed Source. Pennsylvania Christmas Tree Grower's Association.
- Chastagner, G.A. (1986): Effect of postharvest moisture stress on the keeping qualities of Douglas-fir Christmas trees. *HortScience* **21**: 485-486.
- Chastagner, G.A. (2002): Christmas trees, a summary of the postharvest characteristics of different types of Christmas trees. Food & Farm Connection. Washington State University.
- Chastagner, G.A. and L.E. Hinesley (2002): Maintaining moisture levels in cut Christmas trees. *American Christmas Tree J.* **44**: 10-16.
- Chastagner, G.A. and K.L. Riley (2003): Postharvest quality of Noble and Nordmann fir Christmas trees. *HortScience* **38**: 419-421.
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal) (2003): Directorio Nacional de Productores de Árboles de Navidad. México. www.conafor.gob.mx.
- Domínguez, A.F.A. (1986): Estudio ecológico de *Pseudotsuga menziesii*, en Huayacocotla, Ver. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Elizalde, C.N.N. (1979): Uso de preservadores en los árboles de navidad (*Abies religiosa*). Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Farjon, A. and B.T. Styles (1997): Pinus (Pinaceae). *Flora Neotropica Monograph* 75. The New York Botanical Garden, NY.
- Hermann, R.K. and D.P. Lavender. (1990): *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco Douglas-fir, pp. in *Silvics of North America, Conifers* edited by R.M. Burns and B.H. Honkala. Agric. Handb. 654, USDA, Forest Service, Washington.
- Hermann, R.K. and D.P. Lavender (2001): *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco Douglas-Fir www.na.fs.fed.us/.
- Hinesley, L.E. (1984): Measuring freshness of cut Fraser fir Christmas trees. *HortScience* **19**: 860-862.
- Hinesley, L.E. and G.A. Chastagner (2002): Christmas Trees, The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks. Agric. Handb. 66. USDA.
- Hinesley, L.E. and L.K. Snelling (1991): Vapour pressure deficit, temperature, and light affect post-harvest drying of Fraser fir and eastern white pine. *HortScience* **26**:402-405.
- Hinesley, L.E. and L.K. Snelling. (1995): Postharvest drying of Leyland cypress, eastern red cedar, Fraser fir Christmas trees. *HortScience* **30**: 1427-1428.
- Hinesley, L.E. and L.K. Snelling (1997): Postharvest drying and rehydration of Leyland cypress, Atlantic white cedar, Virginia pine, Arizona cypress and eastern white pine Christmas trees. *HortScience* **32**: 1252-1254.
- Ievinsh, G. and O. Dace (1998): Spatial Distribution of Ethylene Production by Individual Needles along a Shoot of *Pinus sylvestris* L. Relationship with Peroxidase Activity. *Annals of Botany* **82**: 489-495.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática) (1985) Carta topografía 1:50,000. Secretaría de Programación y Presupuesto, México.
- Ingemarsson, B.S.M., E. Lundqvist and

L. Eliasson (1991): Seasonal variation in ethylene concentration in the wood of *Pinus sylvestris* L. *Tree Physiology*, **8**: 273–279. Katz, E, J Riov, D Weiss and EE Goldschmidt (2005) The climacteric-like behaviour of young, mature and wounded citrus leaves. *Journal of Experimental Botany* **56**:1359-1367. Li P. and W.T. Adams (1989): Rangewide patterns of allozyme variation in Douglas-fir. *Canad. J. Forest Res.* **19**: 149-161. Lichtenthaler, H.K. (1987): Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic bio-membranes, pp. 350-382 in *Methods in Enzymology*, edited by L. Packer and R. Douce, Academic, San Diego. McDowell, N.G., N. Balster, J.D. Marxhall, B. and B. Austin (2005): Winter Carbon Dioxide Uptake and Release from an Interior Pacific Northwest Forest. University of Idaho, Moscow. México (2005): Terranete, Tlaxcala. Los municipios de México. Secretaría de Gobernación, Méx. Mitcham B.E.J., L.E. Hinesley and D.M. Pharr (1988): Effect of harvest date, storage temperature, and moisture status on postharvest needle of fraser fir. *J. Environ. Hort.* **6**: 1-4. Montano J.M. and W.M. Proebsting (1985): Effects of drying on cut Douglas-fir. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **110**: 751-757. Nielsen, U.B. and G.A. Chastagner (2005) Genetic variation in postharvest needle retention among Nordmann fir families and grafted clones. *Scandinavian Journal of Forest Research* **20**: 304-312. Ninomiya, I, and K. Hozumi (1983). Respiration of forest trees. II. Estimation of community respiration. *J. Jpn. For. Soc.*, **65**: 275. Parker, W.C. and S.G. Pallardy (1985) Drought-induced leaf abscission and whole-plant drought tolerance of seedlings of seven black walnut families. *Can. J. For. Res.* **15**:818-821. Perry, J.P. (1991): *The pines of Mexico and Central America*. Portland. Timber Press. RFD (Rochester Fire Department) (2000): *Seasonal Message from the fire Marshall*. RFD, Rochester. Seiler, J.R., T.J. Nichols and D.J. Paganelli. (1988): Rehydration characteristics of cut white pine and Norway spruce Christmas trees. *HortScience* **23**: 164-166. SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales) (2003): *Estadísticas*. SEMARNAT, México. SICLIM (Sistema de Información Climatológica) (1990): *Versión 1.0 y base de datos*. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. México. USDA (United States Department of Agriculture). (2002): *United States standards for grades of Christmas trees*. Agricultural Marketing Service, Washington. Van Doorn, WG (2004) Is Petal Senescence Due to Sugar Starvation? *Plant Physiology* **134**: 35-42. Vanclay, J.K. (1994) *Modelling Forest Growth and Yield*, CAB, Wallingford, U.K. Viard, F., Y.A. El-Kassaby and K. Ritland (2001): Diversity and genetic structure in populations of *Pseudotsuga menziesii* at chloroplast microsatellite loci. *Genome* **44**: 336–344. White, R.H., D. Demars and M. Bishop (1997): Flammability of Christmas trees and other vegetation. XXIV International Conference of Fire Safety. Columbus: 99-110.

Tratamientos de poscosecha en árboles de navidad montano-tropicales⁴

⁴ Álvarez-Moctezuma J. G., M. T. Colinas-León , J. Sahagún-Castellanos , A. Peña Lomelí y J. L. Rodríguez de la O. Para ser sometido a la Revista Fitotecnia Mexicana.

Resumen

México demanda 1'700,000 árboles de navidad al año. Esta actividad forestal ocupa más de 200 productores; genera muchos empleos indirectos en navidad, es la más rentable y permite conservar recursos genéticos. El principal problema a afrontar en el manejo de árboles de navidad en poscosecha es la pérdida de agua. Numerosos estudios han sido desarrollados en los últimos 50 años para determinar la eficacia de antitranspirantes para incrementar la supervivencia de especies forestales, pero los resultados han sido inconsistentes. Además, casi todos los estudios realizados en la evaluación de tratamientos en poscosecha en árboles de navidad han sido realizados en la región climática templada. La región climática tropical no presenta un verdadero invierno y los árboles continúan creciendo casi todo el año. Entonces, se genera mayor dificultad en el manejo de poscosecha. El objetivo fue evaluar la efectividad de varios tratamientos de poscosecha (dos tipos de antitranspirantes e inmersión de la base del tronco en agua) para alargar la vida en poscosecha de árboles de navidad de las especies más utilizadas en la producción en México (*Pinus ayacahuite* y *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca*) cultivados en una zona montañosa en una región tropical. El experimento se realizó en 2004-2005 con dos repeticiones (árboles). Los factores a estudiar fueron: a) antitranspirante (Anti-Stress 2000 y Moisturin-4), b) inmersión de la base del tronco en agua, c) especie y d) procedencia (Tlaxcala y Veracruz). Los árboles se colocaron según un diseño completamente al azar. Se midieron peso inicial y final, peso final de hojas desprendidas, humedades total y de ramillas, y color. Se hizo análisis de varianza y se compararon las medias (DMS). El mejor tratamiento fue cuando la base del tronco se mantuvo inmersa en agua; con este tratamiento se redujo la cantidad de hojas desprendidas; mantuvo las humedades total del árbol y de la ramilla en particular; y exhibió un menor cambio del croma, matiz y luminosidad de hojas

jóvenes y adultas. La especie y procedencia que presentaron una mejor respuesta fueron *Pseudotsuga menziesii* y Tlaxcala, respectivamente; en éstas se detectó una menor caída de hojas y el color, matiz y luminosidad de hojas jóvenes y adultas exhibieron un menor cambio con respecto a sus valores iniciales.

Palabras clave: tratamiento poscosecha, antitranspirante, árbol de navidad, *Pinus ayacahuite*, *Pseudotsuga menziesii*, México.

Abstract

Mexico requires 1'700,000 Christmas trees per year. This forest activity involves more than 200 growers; generates many indirect jobs during the holiday season; is the most profitable forest activity, and allows to preserve genetic resources. The principal problem to confront, in postharvest-management of Christmas-trees, is water loss. Many studies have been performed, in the last 50 years, to determine the efficacy of antitranspirants to increase survival of forest species, but produced inconsistent results. In addition, almost every research related to evaluation of postharvest treatments of Christmas-trees have been done in the temperate region. The tropical region does not show a real winter, trees grow all year long, subsequently, postharvest management is more difficult. The aim was to evaluate the effect of postharvest treatments (two kinds of antitranspirants, and immersion of trunk basis in water) to increase postharvest life of the most cultivated Christmas trees species in Mexico (*Pinus ayacahuite* and *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca*) cultivated at high altitudes in a tropical region. The experiment was done in 2004-2005, with two replicates (trees). The studied factors were: a) antitranspirant (Anti-Stress 2000 and Moisturin-4), b) immersion of the trunk base in water, c) species, and d) provenance (Tlaxcala and Veracruz). The trees were arranged in a completely randomized design. Variables registered

were: initial and final weight, final weight of abscised leaves, total and twig humidity, and color. Analyses of variance and comparisons of means (LSD) were performed. The best treatment was trunk base in water; reducing abscised leaves, maintaining total and twig humidity, and with lower chroma-, hue-, and luminosity-changes of young and mature leaves. The species and provenance that showed the best performance were *Pseudotsuga menziesii* and Tlaxcala; in both lower abscised leaves were detected; and chroma, hue, and luminosity of young and mature leaves showed a lower change compared to initial values.

Key words: Postharvest treatment, antitranspirant, Christmas tree, *Pinus ayacahuite*, *Pseudotsuga menziesii*, Mexico.

Introducción

México consume 1'700,000 árboles de navidad (AN) por año (SEMARNAT, 2003). Hay más de 200 productores mexicanos de AN (CONAFOR, 2003). Los AN generan muchos empleos indirectos durante la estación navideña. Los suelos forestales tienen una alta pendiente, por lo que no deben ser destinados a otro uso. Las plantaciones mexicanas de AN usan especies nativas, por lo que permiten conservar los recursos genéticos forestales. Es la actividad forestal más rentable (Torres-Pérez, 2004).

El principal problema a afrontar en el manejo en poscosecha de AN es la pérdida de agua. Por ejemplo, según Chastagner (1985) un AN de 1.80 m de *Abies grandis* o *Pseudotsuga menziesii*, bajo condiciones húmedas, puede perder hasta 2.84 litros de agua en 24 horas. Por lo tanto, es indispensable para los productores determinar los medios para reducir el estrés hídrico para extender la vida en poscosecha de los AN (Duck *et al.*, 2003). En los últimos 50 años, muchos estudios han sido realizados para determinar la eficacia de antitranspirantes para incrementar la supervivencia en especies forestales. Sin embargo, los

resultados han sido inconsistentes (Cuadro 1, Columna 7).

Casi todos los estudios realizados en la evaluación de tratamientos en poscosecha en AN han sido realizados en la región climática templada (Cuadro 1, Columna 6). La condición *sui generis* de la región climática tropical es particularmente interesante; dado que al no presentar un verdadero invierno, los árboles continúan creciendo casi todo el año. Por lo tanto, se genera mayor dificultad en el manejo poscosecha, dado que las yemas son más susceptibles a la pérdida de humedad. Sólo se ha evaluado la aplicación de antitranspirantes en *Abies religiosa* cultivado en una zona montana tropical (Elizalde, 1979).

No se ha evaluado la efectividad de los tratamientos poscosecha en poblaciones de las especies más utilizadas en la producción de AN en México (*Pinus ayacahuite* y *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca*). Sólo se han evaluado poblaciones boreales de *P. menziesii* (Simpson, 1984; Rose y Haase, 1995) (Cuadro 1, Columna 1). Los marcadores moleculares han mostrado baja variación intrapoblacional y alta variación interpoblacional en *P. menziesii* (Li y Adams, 1989; Viard *et al.*, 2001). En México, *P. menziesii* muestra una alta discontinuidad en la distribución (Hermann y Lavender, 2001). Entonces, es necesario evaluar poblaciones mexicanas de esta especie en función de su respuesta específica a tratamientos poscosecha.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la efectividad de varios tratamientos poscosecha (dos tipos de antitranspirantes e inmersión en agua de la base del tronco) para alargar la vida poscosecha en AN de *Pinus ayacahuite* y *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca*, ambos cultivados en zonas altas en una región tropical.

Cuadro 1. Tratamientos poscosecha utilizados en especies forestales.

Especie	P ¹	FA ²	UE ³	CA ⁴	RC ⁵	MT ⁶	Referencia
<i>Abies procera</i>	9-11	27	29	32	37	39	Duck <i>et al.</i> , 2003
<i>A. religiosa</i>	12-14	27	30	33	38	33	Elizalde, 1979
<i>Acer rubrum</i>	7	26			37	7	Sterret, 1985
<i>A. saccharum</i>	24	27	31		37	24	Lee y Kozlowski, 1974
<i>Crataegus</i> sp.	9	27	31		37	9	Englert <i>et al.</i> , 1993
<i>Fraxinus</i> sp.	24	27	31		37	24	Lee y Kozlowski, 1974
<i>F. americana.</i>	7	26			37	7	Sterret, 1985
<i>Liriodendron</i>	7	26			37	7	Sterret, 1985
<i>Picea glauca</i>	11	27	29		37	39	Simpson, 1984
<i>P. glauca</i>	11	27	31	35	37	11	Williams <i>et al.</i> , 1990
<i>P. glauca</i>	9-11	27	29	32	37	39	Duck <i>et al.</i> , 2003
<i>P. mariana</i>	15-21	27	29		37	15-18	Colombo y Odlum, 1987
<i>P. mariana</i>	11	27	31		37	39	Odlum y Colombo, 1987
<i>P. oomorika</i>	9-11	27	29	32	37	39	Duck <i>et al.</i> , 2003
<i>Pinus contorta</i>	11	27	29		37	11	Simpson, 1984
<i>P. halepensis</i>	8	27	31	34	37	40	Poljakoff <i>et al.</i> , 1967
<i>P. ponderosa</i>	9,25	27	31	34	37	40	Vera, 1995
<i>P. ponderosa</i>	9	27,28	31	34,35	37	39	Rose y Haase, 1995
<i>P. radiata</i>	8	27	31	36	37	8	Jack, 1955
<i>P. resinosa</i>	24	27	31		37	24	Lee y Kozlowski, 1974
<i>P. resinosa</i>	22	27			37		Davenport <i>et al.</i> , 1974
<i>P. resinosa</i>	24	27	31		37	40	Davies y Kozlowski, 1975
<i>P. strobus</i>	11	27	31	35	37	11	Williams <i>et al.</i> , 1990
<i>Platanus</i> sp.	7	26			37	7	Sterret, 1985
<i>Pseudotsuga</i> sp	11	27	29		37	39	Simpson, 1984
<i>P. menziesii</i>	9	27,28	31	34,35	37	39	Rose y Haase, 1995
<i>Quercus rubra</i>	9,21	27,28	31		37	9y21	Arnold y Culbertson, 1994
<i>Tsuga</i> sp.	11	27	29		37	39	Simpson, 1984

¹Producto, ²Forma de aplicación, ³Unidad experimental, ⁴Condiciones ambientales, ⁵Región climática, ⁶Mejor tratamiento, ⁷Paclobutrazol, ⁸Antitranspirantes, ⁹Moisturin, ¹⁰Nu Arbor, ¹¹Wilt Pruf, ¹²Candelilla, ¹³Veltex, ¹⁴Anilina, ¹⁵Plantco, ¹⁶Cloud-cover, ¹⁷Vapor Gard, ¹⁸Dow X21337, ¹⁹Clear-spray, ²⁰Folicote, ²¹Surfactante, ²²Acetato fenil mercurico, ²³Cera CS6433, ²⁴Silicón, ²⁵Antistress 2000, ²⁶Inyección, ²⁷Aspersión, ²⁸Inmersión, ²⁹Árbol en maceta, ³⁰Árbol cortado, ³¹Plántula, ³²Cámara de crecimiento, ³³La base del tallo en agua, ³⁴Campo, ³⁵Sequía, ³⁶Sanidad, ³⁷Templada, ³⁸Tropical, ³⁹No hubo diferencias significativas, ⁴⁰Sin antitranspirante.

Materiales y Métodos

Los árboles utilizados en este estudio se cosecharon en las parcelas de producción el mismo día; plantados en 1994 (*Pseudotsuga menziesii*) y 1995 (*Pinus ayacahuite*); y

tuvieron un manejo cultural similar previo a la cosecha. Los árboles se empacaron y transportaron al Laboratorio de Floricultura (Universidad Autónoma Chapingo). El experimento se condujo entre noviembre del 2004 y febrero del 2005. La longitud de los árboles se homogenizó a 1.5 m, previo a los tratamientos. Las condiciones del laboratorio fueron de $16.5 \pm 4.5^{\circ} \text{C}$, $60 \pm 25 \% \text{HR}$ y 11.5 ± 0.5 horas de luz natural ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); durante 70 días.

La unidad experimental fue un árbol. Los factores a estudiar fueron cuatro: a) tipo de antitranspirante (con tres niveles de estudio), b) inmersión en agua (con dos niveles de estudio), c) especie (con dos niveles de estudio) y d) procedencia (con dos niveles de estudio). Las repeticiones fueron dos. Los árboles fueron arreglados en un diseño experimental completamente al azar dispuesto en el Laboratorio de Floricultura. Los dos niveles de estudio del factor inmersión en agua fueron: a) árboles colocados en seco en una cruceta y b) árboles cuya base del tronco (15 cm) estuvo inmersa todo el experimento (desde un día después del corte hasta 70 días) en tres litros de agua. Los tres niveles del antitranspirante fueron: a) árboles con una aplicación al follaje de 100 mL agua de la llave (un día después del corte), b) árboles con una aspersión (hasta punto de goteo) al follaje (un día después del corte) de 100 mL de una solución 1:20 del antitranspirante "Anti-Stress 2000®" (44 % de polímeros acrílicos, Polymer AG Incorporated), y c) árboles con una aspersión (hasta punto de goteo) al follaje (un día después del corte) de 100 mL de una solución 1:7 del antitranspirante "Moisturin-4®" (monómero de cloruro de vinil y monómero de cloruro de vinilidano, Burke's Protective Coatings). Se evaluaron dos especies: *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* (Roetzl) Shaw y *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* (Mayr) Franco.

Se evaluaron dos procedencias (Tlaxcala y Veracruz). Terrenate, Tlaxcala (T) se ubica a los 19° 27' latitud Norte y 97° 55' longitud Oeste; clima semifrío subhúmedo con lluvias en verano; de noviembre a marzo las lluvias son escasas; los meses más calurosos son abril y mayo; la precipitación es de 1141 mm; con arroyos temporales; laderas protegidas de los fuertes vientos y casi siempre suelos profundos (México, 2005). Huayacocotla, Veracruz (V) se encuentra a los 20° 32' de latitud Norte y 98° 29' de longitud Oeste; topografía muy accidentada; clima semifrío húmedo con lluvias en verano; precipitación de 1380 mm y con pequeños ríos (Domínguez, 1986).

El peso inicial total (cruceta incluida) (PIT) fue determinado un día después del corte (ddc) usando una báscula mecánica (TORINO®). Los pesos de la cruceta (PC), final total (cruceta incluida) (PFT) fueron cuantificados (70 ddc) con báscula. El peso de las hojas desprendidas (PHA) fueron medidos con una balanza electrónica (Scout II, OHAUS®). Los pesos inicial ($PI=PIT-PC$) y final ($PF=PFT+PHA-PC$) fueron determinados.

La luminosidad (L), croma (C) y matiz (M) fueron evaluados en hojas jóvenes (<50 % de la longitud máxima) y adultas marcadas a los 3, 9, 16, 29, 45, 63 y 70 días después del corte con un espectrofotómetro de esfera serie SP60 (X-RITE®). Se calculó el cambio (adimensional) respecto al dato inicial (3 ddc). Se registró el número de días al máximo cambio.

La pérdida de agua por árbol (PA_A) (70 ddc) fue calculada con las fórmulas $PA_A(Kg)=PI-PF$ y $PA(\%)=(PI-PF)/PI$. Se colectó una ramilla de aproximadamente 10 g (por cada árbol) a los 70 ddc y se pesó con una balanza electrónica (Scout II, OHAUS®). La ramilla se hidrató en una caja de Petri (de 18 cm de diámetro) durante 24 horas, se secó con papel absorbente y se volvió a pesar; luego se colocó en una estufa (FELISA®) durante dos

semanas y se volvió a pesar. Se calculó la humedad de la ramilla con la fórmula $HR(\%) = [(Peso\ húmedo - Peso\ Seco) / Peso\ Seco] * 100$.

Se hizo el análisis de varianza con base en un modelo de cuatro factores de estudio y dos repeticiones. Los datos relativos fueron transformados mediante raíz cuadrada y cuando se presentaron muchos valores con cero se sumó 0.01 previo a la transformación. La comparación de medias se hizo con la Diferencia Mínima Significativa de Fisher (DMS).

Resultados

Antitranspirante. No hubo diferencia estadística significativa entre ninguno de los tres tratamientos de antitranspirantes ("Anti-Stress 2000", "Moisturin-4" y "sin antitranspirante") para todas las variables estudiadas (pérdida de agua del árbol, humedad final de la ramilla, peso de hojas desprendidas, y máximos cambios de luminosidad, croma y matiz) (ANOVA, $P < 0.05$) (Cuadro 2). Los tratamientos "Anti-Stress 2000", "Moisturin-4" y "sin antitranspirante" mostraron una dinámica similar en los cambios de luminosidad, croma y matiz (Fig. 1).

Inmersión. Sí hubo diferencias estadísticas altamente significativas entre los dos tratamientos de inmersión ("árbol en seco" y "árbol en agua") para todas las variables estudiadas (pérdida de agua del árbol, humedad final de la ramilla, peso de hojas desprendidas, y máximos cambios de luminosidad, croma y matiz) (ANOVA, $P < 0.05$). "Árbol en agua" mostró la menor pérdida de agua del árbol, la mayor humedad final de la ramilla, menor peso de hojas desprendidas, y los menores cambios de luminosidad (alrededor del 50 % de intensidad luminosa), croma (25/60 para *P. ayacahuite* y 17/60 para *P. menziesii*) y matiz (ambas especies conservándose en el color verde) (DMS, $P \leq 0.05$). Los tratamientos "árbol en seco" y "árbol en agua" mostraron una dinámica diferencial en los cambios de luminosidad, croma y matiz (Fig. 1).

Especie. Sí hubo diferencias estadísticamente significativas entre las dos especies evaluadas (*P. ayacahuite* y *P. menziesii*) para la mayoría de las variables estudiadas (pérdida de agua del árbol, peso de hojas desprendidas, y máximos cambios de luminosidad, croma y matiz) (ANOVA, $P < 0.05$). *P. menziesii* mostró el menor peso de hojas desprendidas, y los menores cambios de luminosidad, croma y matiz (DMS, $P < 0.05$). *P. ayacahuite* mostró la menor pérdida de agua del árbol (Cuadro 2).

Procedencia. Hubo diferencias estadísticamente significativas entre las dos procedencias analizadas (Tlaxcala y Veracruz) para la mayoría de las variables estudiadas (pérdida de agua del árbol, peso de hojas desprendidas, y máximos cambios de luminosidad, croma y matiz) (ANOVA, $P < 0.05$). Tlaxcala mostró la menor pérdida de agua del árbol, el menor peso de hojas desprendidas, y los menores cambios de luminosidad, croma y matiz (DMS, $P < 0.05$). (Cuadro 2).

Interacciones. No se observaron interacciones entre antitranspirante con cualquier otro factor de estudio. Sin embargo, las interacciones de los factores de "inmersión-especie", "inmersión-procedencia" y "especie-procedencia" sí fueron estadísticamente significativas para la mayoría de las variables estudiadas (pérdida de agua del árbol, peso de hojas desprendidas, y cambios de luminosidad, croma y matiz) (ANOVA, $P < 0.05$) (Cuadro 2).

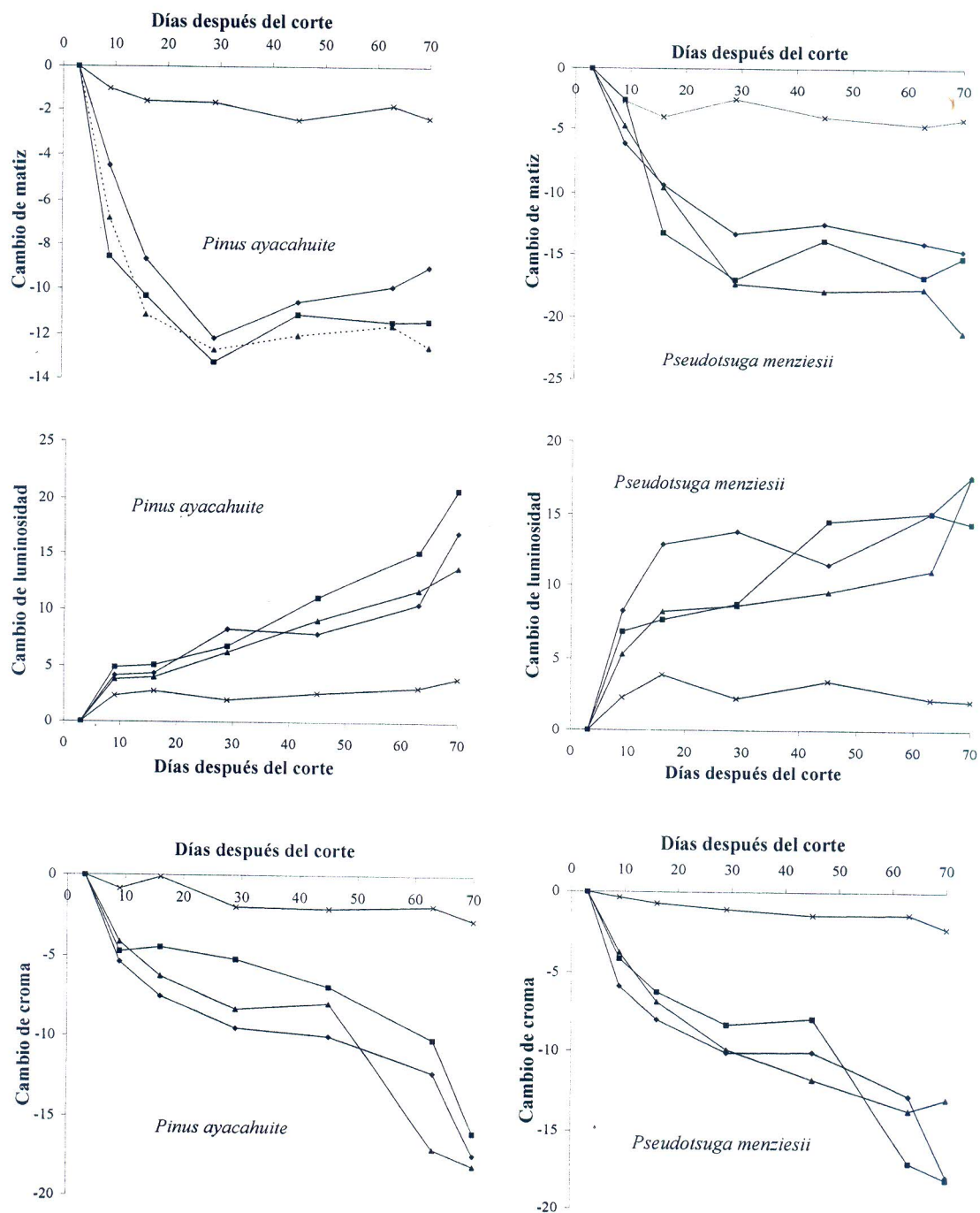


Figura 1. Promedios de cambios de matiz, cromaticidad y luminosidad en árboles de navidad cortados. Los tratamientos fueron: "Moisturin" (triángulo), "Antistress 2000" (cuadrado), "inmersión en agua" (equis) y "testigo" (sin antitranspirante ni inmersión) (rombo).

Cuadro 2. Análisis de varianza de las variables estudiadas.

Fuente de Variación ¹	GL ²	F _{PA} ³	F _{HRA} ⁴	F _{PHA} ⁵	F _{MCL} ⁶	F _{MCC} ⁷	F _{MCM} ⁸
Antitranspirante	2	0.06	0.08	0.07	0.04	0.04	0.03
Inmersión	1	11.01**	8.28**	6.32**	7.14**	6.99**	6.78**
Especie	1	3.29*	0.09	3.58*	2.67*	3.01*	3.10*
Procedencia	1	2.65*	0.06	2.95*	2.38*	2.85*	2.97*
Inmersión*Especie	1	3.42*	0.04	3.95*	2.78*	2.94*	2.91*
Inmersión*Procedencia	1	3.32*	0.03	3.76*	2.89*	2.85*	2.65*
Especie*Procedencia	1	2.02*	0.00	2.60*	2.00*	1.90*	2.16*

Significativo a $0.01 < P \leq 0.05$ (*), $P \leq 0.01$ (**).

¹Solo se incluyeron las interacciones dobles significativas. ²Grados de Libertad. Los valores de F para: ³pérdida de agua por árbol, ⁴humedad final de la ramilla, ⁵peso de hojas desprendidas, ⁶máximo cambio de luminosidad, ⁷máximo cambio de croma y ⁸máximo cambio de matiz.

Discusión

Antitranspirantes

En este trabajo los antitranspirantes no fueron efectivos en aumentar la vida poscosecha de los árboles de navidad cortados. Lo anterior coincide con muchas investigaciones con especies forestales. En la mayoría de los trabajos publicados no se encontró diferencia estadística entre aplicar o no antitranspirantes (Duck *et al.*, 2003; Odum y Colombo, 1987; Rose y Haase, 1995; Simpson, 1984). Otras investigaciones, inclusive encuentran que es mejor no aplicar antitranspirante (Davies y Kozlowski, 1975; Poljakoff *et al.*, 1967; Vera, 1995). (Cuadro 1, Columna 7).

Moisturin no fue efectivo en esta investigación. Este antitranspirante no fue útil para alargar la vida poscosecha de especies forestales en la mayoría de las investigaciones

reportadas (Duck *et al.*, 2003; Vera, 1995; Rose y Haase, 1995). Moisturin resultó adecuado para alargar la vida poscosecha de especies forestales en sólo dos estudios. Englert *et al.* (1993) mencionan que con Moisturin se pudo disminuir la pérdida de agua en *Crataegus phaenopyrum*. Mientras que Arnold y Culbertson (1994) reportan un mantenimiento del potencial hídrico, peso fresco y peso seco al aplicar Moisturin en *Quercus rubra* (Cuadro 1, Columnas 2 y 7).

En este trabajo, Anti-Stress 2000 no incrementó la vida poscosecha de ninguna de las dos especies. Sólo ha habido un estudio donde se ha evaluado anteriormente este antitranspirante. Anti-Stress 2000 no redujo la pérdida de agua, ni mantuvo el potencial hídrico, ni incrementó la altura, ni aumentó la supervivencia, ni incrementó el diámetro del tallo, ni rompió el reposo, ni disminuyó daño foliar, ni incrementó el crecimiento de raíz, ni mantuvo la conductancia estomatal, ni mantuvo el ligamiento electrolítico, ni tampoco mantuvo los niveles de fluorescencia clorofílica en plántulas en reposo (Vera, 1995). (Cuadro 1, Columnas 2 y 7).

La falta de efectividad de los antitranspirantes en especies forestales puede ser explicada por varias causas. La primera es la sanidad de la planta; Jack (1955) encontró que las plántulas enfermas de *Pinus radiata* responden mejor a los tratamientos de antitranspirante que las plántulas sanas. La segunda es el método de aplicación: en especies forestales, los antitranspirantes generalmente son aplicados mediante aspersión (Cuadro 1, Columna 2); sin embargo, probablemente la inmersión (en la solución de antitranspirante) es un mejor tratamiento porque genera mejor cubrimiento (Duck *et al.*, 2003). Pero como el costo de aplicación asciende enormemente, una evaluación financiera sería necesaria para valorar más integralmente la inmersión del árbol en la solución antitranspirante.

Inmersión de la base del tronco en agua

La inmersión de la base del tronco en agua fue el mejor tratamiento para alargar la vida poscosecha en esta investigación. Elizalde (1979) encontró menor peso de hojas desprendidas, retención del ángulo de inserción de la rama y conservación del color durante más tiempo, y mejor condición del estado del follaje cuando la base del tronco (de árboles de navidad cortados de *Abies religiosa*) se mantuvo inmersa en agua.

La frescura de un AN está determinada fuertemente por el contenido de humedad en el follaje (Hinesley, 1984; Chastagner, 1986; Chastagner y Hinesley, 2002). Además, un árbol muerto rodeado de cables conductores de electricidad es una invitación al fuego. Un AN seco puede ser consumido totalmente por el fuego en menos de 30 segundos (RFD, 2000).

La inmersión en agua representa un riesgo en la casa-habitación dado que, en caso de haber, alfombras y tapetes pueden mojarse. Además, a los distribuidores de árboles de navidad en México no les agrada mucho este tratamiento; pues las condiciones ambientales en bodegas no son adecuadas para la conservación de estos organismos vivos, debido a las temperaturas altas y baja humedad ambiental. Por lo anterior, la inmersión en agua sigue siendo una tratamiento poscosecha poco práctico. Por lo tanto, se debe seguir investigando para desarrollar mejores tratamientos para conservar mejor los árboles de navidad cortados.

Especie

Pinus ayacahuite. En este trabajo sólo la inmersión de la base del tronco en agua fue efectiva para alargar la vida poscosecha de esta especie arbórea. No ha habido ningún trabajo previo donde se evalúen los tratamientos para el alargamiento de la vida poscosecha en *P. ayacahuite*. Sólo se han evaluado antitranspirantes en otras seis especies del género *Pinus* (*P. contorta*, *P. halepensis*, *P. ponderosa*, *P. radiata*, *P. resinosa*, *P. strobus*); sin

embargo, no se realizan comparaciones de los antitranspirantes con inmersión en agua. En la mitad de las investigaciones los antitranspirantes no se consideran adecuados para incrementar la vida poscosecha en especies del género *Pinus* (Davies y Kozlowski, 1975; Poljakoff *et al.*, 1967; Rose y Haase, 1995; Vera, 1995). Inclusive en *P. resinosa* (Davies y Kozlowski, 1975) y *P. ponderosa* (Poljakoff *et al.*, 1967; Vera, 1995) la no aplicación de antitranspirantes fue significativamente mejor. Sin embargo, la inconsistencia en la respuesta es muy grande, por ejemplo con el mismo producto (Silicón) y la misma especie (*P. resinosa*); Lee y Kozlowski (1974) reportan una disminución de la transpiración, mientras que Davies y Kozlowski (1975) detectaron menor transpiración y mayor fotosíntesis neta en el tratamiento sin antitranspirante. (Cuadro 1, Columnas 1 y 7).

Pseudotsuga menziesii. En este trabajo sólo la inmersión de la base del tronco en agua fue efectiva para alargar la vida poscosecha de esta especie forestal. Sólo en dos trabajos se han evaluado antitranspirantes en *P. menziesii*, sin compararlos con inmersión en agua. En ambos estudios los antitranspirantes no fueron efectivos. Simpson (1984) no encontró diferencias significativas entre la aplicación o no de antitranspirantes en *P. menziesii*. Mientras que Rose y Haase (1995) no encontraron diferencias en el potencial hídrico, el crecimiento en altura, la supervivencia ni en el crecimiento en diámetro de tallo entre la aplicación o no de antitranspirantes en plántulas de *P. menziesii*. (Cuadro 1, Columnas 1 y 7).

Procedencia

La procedencia Tlaxcala presentó mejor respuesta al tratamiento de inmersión en agua. Tlaxcala exhibe menor precipitación y mayor evaporación (SICLIM, 1990). Entonces, las poblaciones probablemente han generado adaptaciones locales de resistencia a sequía, que pueden ser aprovechadas en el manejo poscosecha.

En México, el área de distribución de *P. menziesii* (Hermann y Lavender 2001) y *P. ayacahuite* (Perry 1991) es bastante discontinua dado que crecen en elevadas altitudes (Perry, 1991; Farjon y Styles, 1997) en un país con una accidentada orografía (INEGI, 1985).

Los análisis isoenzimáticos han mostrado baja variación intrapoblacional y alta variación interpoblacional en poblaciones mexicanas de *P. menziesii* (Porfirio Ramírez Vallejo, com. pers.). Se ha reportado variación topoclinal en respuesta a una heterogeneidad microambiental en *P. menziesii*. La fuente de semilla puede también tener impacto importante para las características de postcosecha (Bates *et al.* 2004).

La falta de consistencia en resultados de investigaciones con el mismo tratamiento y la misma especie (Lee y Kozlowski, 1974 versus Davies y Kozlowski, 1975) puede ser explicada por las diferencias en comportamiento entre procedencias. Es conveniente seguir evaluando la respuesta entre diferentes poblaciones de especies forestales, para poder identificar el mejor tratamiento poscosecha por procedencia.

Conclusiones

El mejor tratamiento fue cuando la base del tronco se mantuvo inmersa en agua. Con este tratamiento se redujo la cantidad de hojas desprendidas; se mantuvo las humedades total del árbol y de la ramilla en particular; y se exhibió un menor cambio del croma, matiz y luminosidad. La especie que presentó una mejor respuesta fue *P. menziesii*; detectándose una menor cantidad de hojas desprendidas y el croma, matiz y luminosidad con menor cambio con respecto a sus valores iniciales. La procedencia que presentó una mejor respuesta fue Tlaxcala; con menor cantidad de hojas desprendidas; se mantuvo por mayor tiempo la humedad total del árbol; y el croma, matiz y luminosidad exhibieron un

menor cambio respecto a sus valores iniciales.

Agradecimientos

A Luciano Zárate y Pedro del Castillo por árboles y Comisión Nacional Forestal y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por financiamiento (CONAFOR-2002-C01-6181).

Referencias citadas

- Arnold, MA y RK Culbertson (1994) Effects of antitranspirant sprays & hydrophilic polymer root dips on the growth of bare-root northern red oak seedlings transplanted to the field or containers. Southern Nursery Association Research Conference 39: 156.
- Bates, RM, JC Sellmer y DA Despot (2004) Postharvest Quality of Concolor Fir Affected by Seed Source. Pennsylvania Christmas Tree Grower's Association.
- Ceulemans, R, R Gabriels e I Impens (1983) Antitranspirant effects on transpiration, net CO₂, exchange rate & water-use efficiency of azalea. Scientia Horticulture 19: 125-31.
- Chastagner, G (1985) Research on Christmas tree keepability. Amer.ChristmasTreeJ. 29:31-5.
- Chastagner, GA (1986) Effect of postharvest moisture stress on the keeping qualities of Douglas-fir Christmas trees. HortScience 21: 485-486.
- Chastagner, GA y LE Hinesley (2002) Maintaining moisture levels in cut Christmas trees. Am. Christmas Tree J. 44: 10-16.
- Colombo, SJ y KD Odum (1987) Efficacy of six antitranspirants on black spruce container seedlings. New Forests 1: 239-244.
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal) (2003) Directorio Nacional de Productores de Árboles de Navidad. México. www.conafor.gob.mx.
- Davenport, DC, K Oriu y RM Hogan (1974) Effects of film antitranspirant on growth. J. Exp. Bot. 25: 410-419.
- Davies, WJ y TT Kozlowski (1975) Effects of applied abscisic acid & plant water stress on transpiration of woody angiosperms. For. Sci. 21(2): 191-195.
- Domínguez, AFA (1986) Estudio ecológico de *Pseudotsuga menziesii*, en Huayacocotla, Ver. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Duck, MW, BM Cregg, FF Cardoso, RT Fernandez, BK Kehe y RD Heins (2003) Can antitranspirants extend the shelf life of table-top Christmas trees? In: Tanino KK (ed.) XXVI International Hort. Congress: Environmental Stress. Acta Hort. 618: 153-162.
- Elizalde, CNN (1979) Uso de preservadores en los árboles de navidad (*Abies religiosa*). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo, México. 48 pp.

- Englert, JM, K Warren, LH Fuchigami y THH Chen (1993) Antidesiccant compounds improve the survival of bare-root deciduous nursery trees. *J.Am.Soc.Hort.Sci.* 118:228-35.
- Farjon, A y BT Styles (1997) *Pinus* (Pinaceae). *Flora Neotropica Monograph* 75. The New York Botanical Garden, NY.
- Hermann, RK y DP Lavender (2001) *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco Douglas-Fir www.na.fs.fed.us/. Hinesley, L.E.
- Hinesley, LE (1984) Measuring freshness of cut Fraserfir Christmastree *HortScience* 19:860-2
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática) (1985) Carta topografía 1:50,000. Secretaría de Programación y Presupuesto, México.
- Jack, JB (1955) Tests of a transpiration inhibitor. *Tree Planters' Notes* 20:23-25.
- Lee, KJ y TT Kozlowski (1974) Effects of silicon antitranspirant on woody plants. *Plant Soil.* 40: 493-510.
- Li P y WT Adams (1989) Rangewide patterns of allozyme variation in Douglas-fir. *Can. J. For. Res.* 19: 149-161.
- México (2005) Terranete, Tlaxcala. Los municipios de México. Secretaría de Gobernación.
- Odlum, KD y SJ Colombo (1987) The effect of three film-forming antitranspirants on moisture stress of outplanted black spruce seedlings. *Tree Planters' Notes* 38: 23-26.
- Perry, JP (1991) *The pines of Mexico & Central America*. Portland. Timber Press.
- Poljakoff, MA, J Gale, H Aluma, I Kahane, H Ginsburg, Z Goldschmidt, I Nir y E Shabi (1967) Final technical report of effect of plant antitranspirants on certain physiological processes of forest seedlings & other plant material. Project No. A10-FS-10. The Hebrew University of Jerusalem. 107 pp.
- RFD (Rochester Fire Department) (2000) Seasonal Message from the fire Marshall. EUA.
- Rose, R y DL Haase (1995) Effect of the antidesiccant Moisturin on conifer seedling field performance. *Tree Planters' Notes* 46: 97-101.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales) (2003) Estadísticas. Méx.
- SICLIM (Sistema de Información Climatológica) (1990) Versión 1.0 y base de datos. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. México.
- Simpson, DG (1984) Film-forming antitranspirants. Their effects on root growth capacity, storability, moisture stress avoidance, & field performance of containerized conifer seedlings. *The Forestry Chronicle* 60: 335-339.
- Sterret, JP (1985) Paclobutrazol: a promising growth inhibitor for injection into woody plants. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 110: 4-8.
- Torres-Pérez, J (2004) Indicadores financieros en actividades forestales. V Congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Vera, CJAG (1995) The Influence of Antidesiccants on field performance & physiology of 2+() Ponderosa pine (*Pinus ponderosa* Dougl.) seedlings. Tesis doctoral. Oregon State University. 133 pp.
- Viard, F, YA El-Kassaby y K Ritland (2001) Diversity & genetic structure in populations of *Pseudotsuga menziesii* at chloroplast microsatellite loci. *Genome* 44: 336-334.
- Williams, PA, AM Gordon y AW Moeller (1990) Effects of five antitranspirants on white spruce & white pine seedlings subjected to greenhouse drought. *Tree Planters' Notes* 41: 33-38.

**OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO
PARA *Abies religiosa*⁵**

⁵ Álvarez-Moctezuma J. G. , I. I. Lara-Sánchez¹, J. P. Legaria-Solano y J. O. Mascorro-Gallardo. Sometido a la Revista Fitotencia Mexicana.

RESUMEN

Se probaron dos protocolos convencionales y dos productos comerciales de extracción de ADN vegetal en *Abies religiosa*. Las extracciones se hicieron de tejido vegetal fresco y seco, con el objetivo de establecer un método de purificación de ADN para esta especie y determinar el efecto del almacenamiento en seco de sus hojas en la extracción de ADN. El mejor método fue Nucleon Phytopure Plant DNA Extraction[®] (AMERSHAM BIOSCIENCES) con mercaptoetanol. Este método sólo fue efectivo para aislar ADN de tejido fresco. Los demás métodos produjeron ADN impuro.

Palabras clave: Aislamiento de ADN, conífera, oyamel, CTAB, Protocolo comercial.

ABSTRACT

Two conventional laboratory protocols and two commercial DNA extraction protocols were tested in *Abies religiosa*. Extractions were done in tissue from fresh and dry leaves, with the objective of establishing an extraction DNA method for this species and determine the effect of dry leaf storage in DNA extraction. The best method for DNA extraction was Nucleon Phytopure Plant DNA Extraction[®] (AMERSHAM BIOSCIENCES) using mercaptoethanol. This method is effective only for fresh leaf tissues. Other methods produced contaminants.

Keywords: DNA isolation, conifer, fir tree, CTAB, Commercial protocol.

INTRODUCCIÓN

Hay poca información sobre protocolos de extracción que permitan obtener ADN de buena cantidad y calidad en plantas leñosas. Las especies leñosas, principalmente coníferas, presentan altas cantidades de polisacáridos u otros metabolitos secundarios como polifenoles, terpenos y resinas, que dificultan la extracción del ADN e impiden su análisis (Doullis *et al.*, 2000). El aislamiento y purificación de ADN es de crucial importancia, pues

la pureza y el alto peso molecular de ADN es un requerimiento absoluto para un análisis exitoso de huellas genómicas y para la aplicación de otras técnicas biológicas moleculares. Las impurezas del ADN pueden inhibir reacciones enzimáticas, la electroforesis y la cuantificación (Randhawa y Arya, 2003).

Abies religiosa es importante en el Valle de México porque forma bosques de gran extensión (Rzedowski, 1978). Se distribuye en la región central de México (Vásquez, 1964). Las poblaciones de esta especie cercanas a centros urbanos, se encuentran en declinación. Por ejemplo en el Desierto de los Leones, *A. religiosa* muestra reducción en la anchura de anillos, grosor de la pared celular y longitud de traqueidas; ausencia de carbohidratos y acumulación de compuestos fenólicos en radios; estas modificaciones se presentan en las últimas tres décadas, lo cual coincide con un aumento de los contaminantes atmosféricos en la ciudad de México (Bernal *et al.*, 2004).

Los marcadores de ADN serían útiles para selección asistida. Sin embargo, con los protocolos y productos comerciales comunes de extracción de ADN para plantas, no se ha logrado obtener la cantidad y la calidad de ADN que se requiere para análisis genómicos en *A. religiosa*, tales como amplificación por PCR, RAPDs, RFLPs o microsatélites. El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar un método de purificación de ADN genómico en *A. religiosa*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material se recolectó en el Parque Nacional Ajusco, México; de hojas jóvenes de árboles adultos libres de plagas y hongos visibles, de buen vigor y libres de daños físicos en hojas y tronco. La recolecta del material se hizo en dos años. La muestra del primer año se prensó y secó en una estufa a 80° C y se guardó en el herbario en condiciones óptimas para

evitar su maltrato o pudrición. El muestreo del segundo año se realizó un día antes de hacer pruebas de extracción de ADN. Las hojas se introdujeron en sobres con perlas de Silica-Gel® (GOLDEN BELL); manteniéndose a -20° C. Para la extracción se utilizaron las acículas de brotes apicales; las cuales se lavaron con extrano y etanol al 70 %

Los protocolos comerciales a probar se eligieron con base en la eficiencia que reporta el fabricante para extracción de ADN en coníferas. Éstos fueron: Plant DNAzol Reagent® (INVITROGEN) (PDNAzol) y Nucleon Phytopure Plant DNA extraction® (AMERSHAM BIOSCIENCES) (NPPDNA). Los protocolos de laboratorio usados fueron los de Dellaporta *et al.* (1983) (Dellaporta) y Doyle y Doyle (1987) (D y D). En el protocolo comercial de NPPDNA se agregó β -mercaptoetanol durante la lisis de la pared celular, para extracción de ADN de tejido fresco. Para la extracción de ADN utilizando tejido seco, se realizaron extracciones con PDNAzol, NPPDNA y Dellaporta.

El protocolo de D y D se modificó de la siguiente manera: antes de precipitar el ADN, se lavó con cloroformo (1:1) y se centrifugó a 1400 g durante 15 minutos. Se extrajo el sobrenadante y se lavó con hexano (1:1). Se centrifugó a 1400 g durante 15 minutos.

El protocolo PDNAzol se modificó de la siguiente manera: se pesaron 0.6 g del material y se disolvió en 1000 μ l del producto; se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos; se extrajo el sobrenadante lavándose con fenol (1:1, v/v); se agitó durante 10 minutos; se centrifugó (12000 g, 5 minutos); se lavó dos veces con cloroformo (1:1, v/v) y disolvió en 8mM NaOH.

Para el análisis de pureza y concentración de ADN se utilizó un espectofotómetro Genova MK3® (JENWAY). Para el análisis de integridad de la molécula de ADN, se utilizó una cámara de electroforesis GNA-100® (PHARMACIA BIOTECH), una fuente de poder para

Electroforesis 301[®] (AMERSHAM BIOSCIENCES), transiluminador UV[®] (UVP) y el sistema de análisis y documentación de geles (KODAK). Los resultados obtenidos en el análisis de concentración y pureza de ADN se examinaron mediante un análisis de varianza. Con el método de diferencia mínima significativa (DMS), se definió cuál es el mejor método de extracción de ADN para *A. religiosa* (Devore, 1998).

La reacción de PCR se realizó en un termociclador TECHNE[®] con un ciclo a 91° C (2 minutos), 35 ciclos (30 segundos a 94° C, 30 segundos a 40° C y 90 segundos a 72° C) y un ciclo a 72° C (90 minutos). Cada microtubo contenía 81.07 µL de agua deionizada (SIGMA), 10 µL amortiguador de Mg (1 M), 3 µL de MgCl₂ (50 mM), 2 µL de dNTPs (10 mM), 2.5 µL iniciador, 0.93 µL ADN, 0.5 µL de Taq DNA-polimerasa (INVITROGEN[®]). El iniciador utilizado fue G11 (5'-TGCCCGTCGT-3') (OPERON[®]).

La electroforesis se realizó en un gel de UltraPure[™] Agarosa-1000[®] (INVITROGEN) al 8 % (p/v). Cada muestra con 7µL de ADN y 5µL de amortiguador de carga. El marcador de peso molecular fue 100 bp DNA Ladder[®] (INVITROGEN). El gel se tiñó con bromuro de etidio (SIGMA) y se visualizó en el Sistema de Análisis e Interpretación de Geles EDAS 290[®] (KODAK).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con Müller y Schweizer (1994) los análisis del espectrofotómetro indicaron la presencia de impurezas proteicas o fenólicas, principalmente (Cuadro 1). No se obtuvieron resultados de los protocolos de D y D en tejido fresco y PDNAzol y PDNAzol modificado con tejido seco. En lo que respecta a la absorbancia en las longitudes de 260 nm y 280 nm, no se presentaron diferencias significativas entre los métodos, a excepción de las muestras aisladas con el protocolo modificado de D y D. En la relación A_{260}/A_{280} , la extracción de

tejido fresco con NPPDNA con mercaptoetanol, fue la mejor. Le siguieron Dellaporta y NPPDNA con tejido fresco. Además, el método de Dellaporta no presentó diferencias significativas con los demás métodos. Sólo utilizando NPPDNA con mercaptoetanol fue posible el análisis de genoma, pues la relación A_{260}/A_{280} fue casi cercana a 1.7 (Müller y Schweizer 1994).

Las lecturas de absorbancia para ADN de doble cadena, en cuanto a la concentración, los métodos de aislamiento usando tejido fresco no presentaron diferencias entre ellos. Los métodos de extracción con tejido seco presentaron las concentraciones más bajas. Con respecto a la absorbancia por centímetro (ABS/cm), el método de PDNAzol presentó diferencias con los métodos, pero el resto no presentó diferencias entre ellos. En relación al porcentaje de transmitancia (%T), el método de Dellaporta fue el que presentó mayor valor con respecto a los otros métodos. Las extracciones con NPPDNA, con tejido fresco y seco y el protocolo de Dellaporta, no presentaron diferencias. El NPPDNA con mercaptoetanol y PDNAzol, mostraron los valores más bajos de transmitancia, con diferencias entre ellos y los otros métodos.

Las modificaciones hechas al protocolo de NPPDNA por haber agregado una cantidad de mercaptoetanol mayor a la señalada eliminaron las impurezas que se precipitaban con el ADN, tal y como lo señalan Permingeat *et al.* (1998). La relación A_{260}/A_{280} obtenida y estudiada con el análisis de varianza cumple las características de pureza referidas por Müller y Schweizer (1994) y permite realizar estudios de análisis genéticos. Las otras modificaciones hechas a los protocolos no produjeron resultados satisfactorios.

Weishing *et al.* (1995), citados por Khanuja *et al.* (1999), mencionan que en algunas plantas aromáticas y medicinales existen compuestos que degradan el ADN como las

endonucleasas, coaislamiento de polisacáridos altamente viscosos y compuestos inhibidores como polifenoles y metabolitos secundarios que interfieren directa o indirectamente con las reacciones enzimáticas. *A. religiosa* es una especie que presenta canales resiníferos marginales (Pérez, 2000) y compuestos aromáticos (Vásquez, 1964), que al no poderse eliminar, el ADN obtenido es de mala calidad y en baja cantidad.

Khanuja *et al.* (1999), sugieren un protocolo para la extracción de ADN de tejido seco, proveniente de plantas aromáticas y medicinales. El protocolo funcionó para *Taxus wallichiana*, especie forestal con componentes aromáticos. Utiliza concentraciones de CTAB más altas que Dellaporta *et al.* (1983). Khanuja *et al.* (1999) eliminaron los problemas de alto contenido de polisacáridos, elevando la concentración de NaCl e indicaron que la extracción de tejido seco se haga con una cantidad mayor de tejido y se aumente el tiempo de incubación disminuyendo la temperatura durante la lisis celular.

Según McDonald *et al.* (1994), citados por Henry (2001), las condiciones en que se secan las muestras de herbario son las óptimas para purificar el ADN de buena calidad. Secar las muestras de manera forzada puede ocasionar ruptura de tejido y degradación del ADN. Las muestras utilizadas en el presente trabajo se secaron bajo condiciones estándares y no se observaron indicios de pudrición o algún otro factor que pudiera interferir para obtener ADN de calidad. Dnyaneshwar *et al.* (2003) sugieren que las muestras frescas sean almacenadas en un ultracongelador a -70 °C hasta ser utilizadas, esto puede ayudar a evitar la pérdida de agua y facilitar la extracción de ADN de muestras almacenadas.

El análisis de integridad de las moléculas de ADN, sólo se realizó con las muestras que se disolvieron en el amortiguador TE y presentaron concentración y pureza aceptables. Con el PDNAzol se obtuvo la mayor concentración de ADN, pero los análisis de pureza y

concentración indican que el ADN lleva impurezas protéicas y fenólicas y el barrido muestra que el ADN está degradado (Fig. 1).

El análisis de integridad de la molécula de ADN, muestra para NPPDNA agregando mercaptoetanol, un ADN de buena calidad (Fig. 1). Se sabe que el ADN extraído es de buena calidad porque es de alto peso molecular tiene una longitud mayor que la banda de mayor peso del marcador de peso molecular utilizado. Con los demás métodos, el ADN se degradó o no se logró aislar. Se logró la amplificación completa del ADN, con el iniciador G11 con tejido fresco y NPPDNA más mercaptoetanol y PDNAzol (Fig. 2).

CONCLUSIONES

El mejor método de extracción de ADN con tejido fresco para *A. religiosa* es Nucleon Phytopure Plant DNA Extraction[®]. Para mejorar la calidad y cantidad de ADN extraído, se pueden utilizar antioxidantes como mercaptoetanol. El almacenamiento en seco dificultó las extracciones de ADN.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a la Comisión Nacional Forestal y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento económico (CONAFOR-2002-C01-6181).

REFERENCIAS

- Bernal S S, T Terrazas, D Alvarado (2004)** Impact of air pollution on ring width and tracheid dimensions in *Abies religiosa* in the Mexico City basin. IAWA J. 25 (2): 205-215.
- Dellaporta S L, J Word, J B Hicks JB (1983)** A plant DNA miniprep: version II. Plant Mol. Biol. Report. 1:19-21.
- Devore J L (1998)** Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. 4ª ed. Internacional Thompson. México DF. 712 pp.
- Dnyaneshwar W, C Preeti, J Kalpana, P Bhushan P (2003)** DNA isolation from fresh and dry plant samples with highly acidic tissue extracts. Plant Mol. Report. 21: 467a-f.

- Doulis AG, AL Harfouche, FA Aravanopoulos (2000)** Rapid, high quality DNA isolation from Cypress (*Cupressus sempervirens* L.) needles and optimization of the RAPD marker technique. Plant Mol. Biol. Report. 17:1-14
- Doyle J J, J L Doyle (1987)** A rapid DNA isolation procedure for small quantites of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19:11-15.
- Henry R J (2001)** Plant genotyping: the DNA Fingerprinting of plants. CAB International. Pp 239-241.
- Khanuja S P S, Shasany A K, Darakar M P, K Sushil (1999)** Rapid isolation of DNA from dry and fresh simples of plants producing large amounts of secondary metabolitos and essential oils. Plant Mol. Report. 17:1-7.
- Müller H, B Schweizer (1994)** Biochemical Applications for UV/Vis Spectroscopy; DNA, Protein, and Kinetic Analysis. Perkin Elmer. Ueberlingen, Alemania. s/p.
- Pérez R M (2000)** Claves de determinación botánica. Universidad Autónoma Chapingo. México. 127 Pp.
- Permintgeat H R, M V Romagnoli, R H Vallejos (1998)** A simple method for isolating high yield and quality DNA from cotton leaves. Plant Mol. Biol. Report. 16:1-6.
- Randhawa G J, Arya. (2003)** Principles of DNA Isolation and Purification. National Bureau of Plant Genetic Resources. New Delhi. 103-118 pp.
- Rzedowski. J (1978)** Vegetación de México. Limusa. México. 431 pp.
- Vásquez S J (1964)** Botánica Forestal. Colegio de Posgraduados. Chapingo, México: 45-53 pp.

Cuadro 1: Resultados del análisis de la extracción de ADN. Media aritmética $\pm$ desviación estándar. Las medias con la misma letra (en una misma columna) no son diferentes (DMS, $p < 0.05$).

Protocolo	Tejido	n [#]	Radio (A_{260}/A_{280})	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)
PDNAzol	Fresco	14	1.08 ± 0.06 c	1455.25 ± 308.50 a
NPPDNA	Fresco	12	1.27 ± 0.09 b	52.94 ± 42.01 b
NPPDNA + mercaptoetanol	Fresco	21	1.52 ± 0.17 a	1354.48 ± 251.24 a
Dellaporta	Fresco	12	1.27 ± 0.09 bc	70.17 ± 34.75 b
D & D Modificado	Fresco	14	1.01 ± 0.08 c	49.23 ± 30.52 b
NPPDNA + mercaptoetanol	Seco	14	1.05 ± 0.43 c	65.75 ± 26.55 b
Dellaporta	Seco	11	0.96 ± 0.27 c	58.45 ± 21.96 b

#n: número de repeticiones.

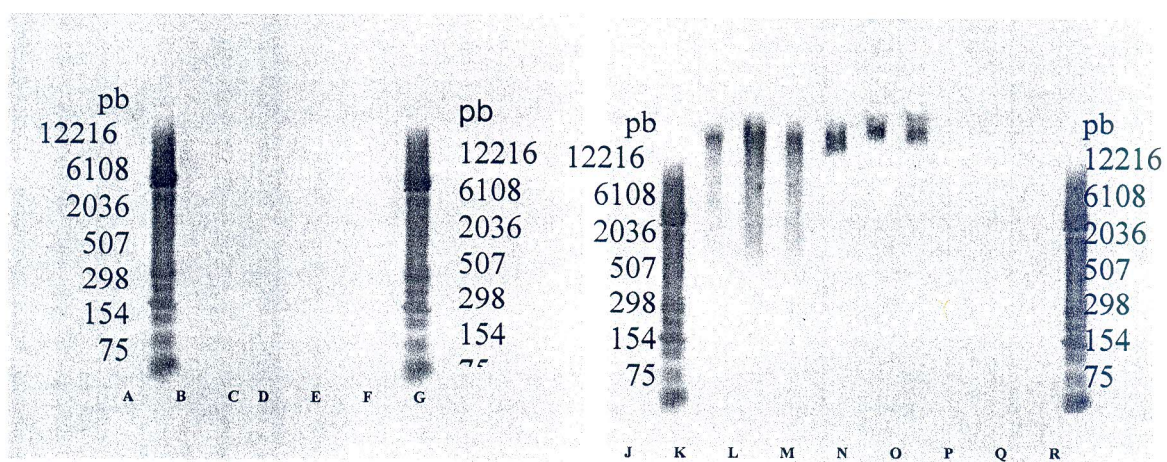


Figura 1: Integridad de la molécula de ADN. Marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (A, G, H, R), D & D modificado (B, C, D), Dellaporta (E, F), PDNAzol (I, J, K), NPPDNA + mercaptoetanol (L, M, N), NPPDNA (O, P, Q) con tejido fresco.

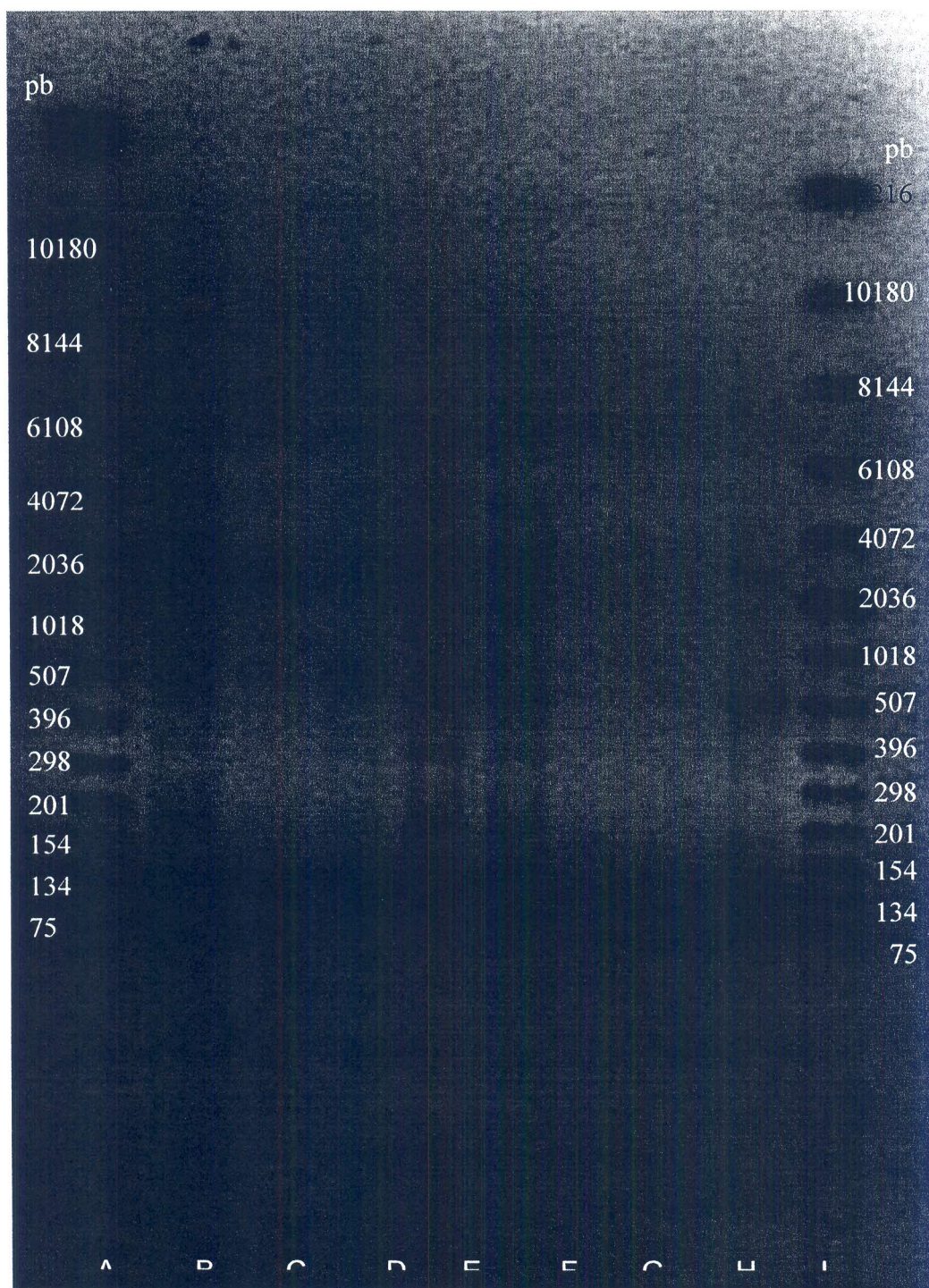


Figura 2: Productos de amplificación con RAPDs. Marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (A, J), PDNAzol (B, D, I), NPPDNA (H), Dellaporta (G), NPPDNA + mercaptoetanol (E, F), D & D modificado (C) con tejido fresco.

RAPDs asociados a la resistencia a alta intensidad luminosa en brinzales de *Abies religiosa*⁶

RAPDs associated to resistance for high intensity light on *Abies religiosa* seedlings

⁶ Álvarez-Moctezuma J.G., A. D. Ortiz-Reyes, J. P. Legaria-Solano, J. Sahagún-Castellanos, J. O. Mascorro-Gallardo, A. Peña-Lomelí y J. L. Rodríguez-de-la-O. para ser sometido a la Revista Fitotecnia Mexicana.

Resumen

Abies religiosa tiene un gran potencial para la formación de áreas verdes urbanas, como árbol de navidad, bonsáis, obtener madera, papel, techados, para medicina y para captura de carbono. Sin embargo, no es posible realizar plantaciones sin cobertura, porque es una especie tolerante a la sombra y sus brinzales son susceptibles a alta intensidad luminosa. No obstante, *A. religiosa* exhibe variación intraespecífica natural en la resistencia a la exposición a alta intensidad lumínica. Por esto y porque existe variación fenotípica interespecífica de la resistencia de las plántulas a altas intensidades lumínicas, debe haber una alta probabilidad de que la resistencia a nivel intraespecífico tenga una base genética. El objetivo de este trabajo fue detectar perfiles de RAPDs asociados a la resistencia a alta intensidad luminosa en brinzales de *A. religiosa*. Se purificó ADN de 15 brinzales resistentes y 15 susceptibles a alta intensidad luminosa, se formaron dos muestras compuestas y se evaluaron 35 iniciadores. De los iniciadores donde se observaron productos de PCR, se realizó nuevamente la reacción de PCR con el ADN de cada brinjal. Se evaluó: supervivencia a alta intensidad luminosa, número de acículas, apertura estomatal, número de estomas y altura del brinjal. Se calcularon correlaciones entre las características morfológicas y los perfiles de bandas por cada iniciador. Se identificaron bandas que correlacionaron con todas las variables evaluadas. 24 % de los brinzales sobrevivieron a alta intensidad luminosa. El ancho y área de la apertura estomatal presentaron el mayor número de correlaciones. La banda de 1801.92 pb del iniciador 5'-CCGGCCTTCC-3' correlacionó con casi todas las variables. Se sugiere que la supervivencia, altura, número de hojas y apertura estomatal son controladas genéticamente. La supervivencia a alta intensidad luminosa está determinada principalmente por la apertura estomatal.

Palabras clave: Marcador molecular, selección asistida, umbrófila, epidermis, estomas.

Abstract

Abies religiosa has great potential as urban forest tree, Christmas-tree, bonsai, timber, paper, ceiling, medicinal, and carbon sequestration. However, plantations are not possible without tree covering, because this species is shade tolerant, and their seedlings are susceptible to high intensity light. Nevertheless, *A. religiosa* shows natural intraspecific variation in resistance to high intensity light. Because of this and because exist interspecific phenotypic variation for resistance to high intensity light. The probability that there is a genetic basis for the intraspecific variation must be high. The aim of this study was to detect RAPD profiles associated with resistance to high intensity light on *A. religiosa* seedlings. The DNA from 15 resistant and 15 susceptible seedlings to high intensity light were isolated. Two bulked samples were formed and 35 primers were evaluated. From primers with PCR products, a second PCR reaction with DNA from individual seedlings was done. Registered data were: seedling survival to high intensity light, leaf number, stomata aperture, stomata number, and plant height. Correlations between these variables, and RAPDs profiles for each primer were computed. Bands which correlated with all variables were detected. 24 % of the seedlings survived to high intensity light. Stomata width and aperture showed the largest number of correlations. The 1801.92 pb band from primer 5'-CCGGCCTTCC-3' was correlated with almost all variables. This suggests that survival, height, leaf number, and stomata aperture are genetically controlled variables. Seedling survival to high intensity light is mainly determined by stomata aperture.

Key words: Molecular marker, assisted selection, umbrophylla plant, epidermis, stomata.

Introducción

Abies religiosa (H.B.K.) Schl. et Cham. es importante porque forma bosques de grandes extensiones (Rzedowski, 1978). Se distribuye en la región central de México (Dallimore y Jackson, 1961). Sin embargo, esta especie es marginalmente utilizada⁷, no obstante su gran potencial para: a) áreas verdes urbanas (Chacalo *et al.*, 1994), b) árbol de navidad⁸, c) bonsái⁹, d) madera, e) papel, f) techado, g) medicina¹⁰ y h) captura de carbono¹¹.

Desafortunadamente no es posible establecer plantaciones de *A. religiosa* sin una cobertura, porque los brinzales son susceptibles a alta intensidad luminosa. Las especies tolerantes a la sombra tienen la capacidad de establecerse mejor en condiciones de dosel cerrado donde la intensidad lumínica es baja (Spurr y Barnes, 1980). *A. religiosa* es tolerante a la sombra y sus brinzales son altamente susceptibles a la alta intensidad lumínica, por lo que en espacios abiertos exhibe una gran mortandad (Camacho, 1996; Madrigal, 1964 y Vázquez *et al.*, 1962). Los brinzales requieren 0.6 a 0.74 m² de cobertura¹², o sea 16.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ de intensidad lumínica¹³. Como consecuencia, la regeneración natural no llega a establecerse en suficiente cantidad en espacios abiertos, lo cual es importante para la renovación y restauración de bosques (Galindo, 1996). Las plantaciones muchas veces fracasan.

⁷ Gómez, GR (2003) Estado del conocimiento de *Abies religiosa* (H.B.K.) Schl. et Cham. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. México. 142 pp.

⁸ Elizalde, CNN (1979) Uso de preservadores en los árboles de navidad (*Abies religiosa*). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo, México. 48 pp.

⁹ Juan Montiel Avila, comunicación personal.

¹⁰ Bojorges, SJA (1990) Índice del sitio para oyamel (*Abies religiosa*) en Zoquiapan. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. México. 57 pp.

¹¹ Valenzuela, H.T. (2001) Estimación del secuestro de carbono en bosques naturales de *Abies religiosa*. Tesis. Universidad Autónoma Chapingo. México. 127 pp.

¹² Pimentel, BL (1979) Determinación del volumen óptimo en bosques de *Abies religiosa* (H.B.K.) Schl. et Cham. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. México. 150 pp.

¹³ May, ENG (2001) Dinámica de la regeneración de *Abies religiosa* (H.B.K.) Schl. et Cham. y *Pinus hartwegii* Lindl., en la Estación Forestal Experimental Zoquiapan, Estado de México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. México. 78 pp.

A. religiosa exhibe variación intraespecífica natural en la tolerancia a la exposición a alta intensidad lumínica¹⁴ (Camacho, 1996; Galindo, 1996; Madrigal, 1964; Vázquez *et al.*, 1962). Además, existe variación interespecífica a la resistencia a altas intensidades lumínicas (Spurr y Barnes, 1980). Por consiguiente, debe haber una alta probabilidad de encontrar una base genética que respalde la variación intraespecífica.

El Análisis Segregante en Agrupaciones (ASA) es la metodología más común para la selección asistida por marcadores moleculares y requiere la evaluación de tres generaciones. En muchas especies forestales no es posible aplicar el ASA debido a la ausencia de líneas endogámicas, ciclo de vida largo, y alta depresión endogámica (Carlson *et al.*, 1994). En el Análisis Parental en Agrupaciones (APA) es posible utilizar únicamente el progenitor femenino y su progenie, siempre que el marcador se encuentra en condición heterocigota en el progenitor (Arcade *et al.*, 2002; Carlson *et al.*, 1994; Marques *et al.*, 1999). De esta manera, actualmente es una realidad la utilización de los marcadores moleculares en la selección de características de importancia económica en especies forestales (Arcade *et al.*, 2002; Bernatzky y Mulcahy, 1992; Carlson *et al.*, 1994, Devey *et al.*, 1995; Grattapaglia *et al.*, 2004; Kirst *et al.*, 2004; Kondo *et al.*, 1999; Lerceteau *et al.*, 1999; Markussen *et al.*, 1999; Marques *et al.*, 1999; Mechlenbacher *et al.*, 2004; Moran *et al.*, 1999; Prat *et al.*, 1999; Storme *et al.*, 1999; Su *et al.*, 2000; Tabor *et al.*, 2000; Tauer *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 1999). Los perfiles de RAPDs son útiles en la selección asistida por marcadores moleculares, mapeo cromosómico y transgenesis.

El objetivo de esta investigación fue detectar perfiles de RAPDs asociados a la

¹⁴ González, GMJ (1985) Comportamiento de la germinación y crecimiento inicial de *Abies religiosa* (H.B.K.) Schl. et Cham. en diferentes aperturas de dosel, preparaciones de suelo y variantes de siembra en Zoquiapan, Méx. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. México. 82 pp.

resistencia a alta intensidad luminosa en brinzales de *Abies religiosa*.

Materiales y Métodos

En el año 2005, se recolectaron semillas de medios hermanos maternos de *Abies religiosa* en la ladera sur del Parque Nacional "Cumbres del Ajusco" (Tlalpan, México) a los 19° 12' de latitud Norte y 99° 15' de longitud Oeste. Las semillas germinaron bajo malla-sombra de 90 % (hasta 1000 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$).

En marzo de 2006, en el vivero de la División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo, se colocaron 400 brinzales (hermanos maternos) de un año de edad de *A. religiosa*, cubiertos con malla-sombra de 90 %. A las dos semanas se reemplazó por malla-sombra de 60 % (hasta 4000 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$) y los brinzales cuyo vigor disminuyó se retiraron y se colocaron bajo malla-sombra de 90 %, etiquetándolos como muy sensibles a alta intensidad luminosa. Dos semanas después, se reemplazó por malla-sombra de 40 % (hasta 6000 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$) y los brinzales que exhibieron disminución del vigor se retiraron y se colocaron bajo malla-sombra de 90 %, rotulándolos como sensibles. Dos semanas más tarde, se retiraron los brinzales supervivientes y se rotularon como resistentes.

Dos semanas después se eligieron al azar 15 brinzales resistentes y 15 muy susceptibles a alta intensidad luminosa. Por brinzal, se muestreó 0.1 g de acículas jóvenes; de buen vigor y libres de plagas, hongos y daños físicos. Se lavaron con extrano y etanol al 70 %. Se extrajo el ADN con el protocolo Nucleon Phytopure Plant DNA Extraction[®] (Amersham Biosciences). Se agregó β -mercaptoetanol durante la lisis de la pared celular. Se agregó RNAasa A. Se estandarizó la concentración de ADN de cada individuo a 10 pmol.

Se realizaron dos muestras compuestas. La primera contenía volúmenes idénticos de

ADN (a 10 pM) de cada uno de los 15 brinzales resistentes. La segunda con el ADN de los 15 brinzales susceptibles. La reacción de PCR se realizó en un termociclador Techne® con un ciclo a 91° C (2 minutos), 35 ciclos (30 segundos a 94° C, 30 segundos a 40° C y 90 segundos a 72° C) y un ciclo a 72° C (90 minutos). Cada microtubo contenía 81.07 µL de agua deionizada (Sigma), 10 µL amortiguador de Mg (1 M), 3 µL de MgCl₂ (50 mM), 2 µL de dNTPs (10 mM), 2.5 µL iniciador, 0.93 µL ADN , 0.5 µL de Taq DNA-polimerasa (Invitrogen®). Se evaluaron 35 iniciadores (Operon®) con 80 % de citocinas y guaninas y la mayoría con dos citocinas y/o guaninas en ambos extremos.

La electroforesis se realizó en un gel de UltraPure™ Agarosa-1000® (Invitrogen) al 8 % (p/v). Cada muestra incluía 7µL de ADN y 5µL de amortiguador de carga. El marcador de peso molecular fue 100 bp DNA Ladder® (Invitrogen). Se tiñó con bromuro de etidio (Sigma). Se visualizó en un Sistema de Análisis e Interpretación de Geles Edas 290® (Kodak).

De los iniciadores donde se observaban productos de PCR, se realizó de nuevo la reacción de PCR (como se mencionó anteriormente) con el ADN de cada brinzal (15 susceptibles y 15 resistentes). Se corrieron y revelaron los geles de manera similar.

Se tomaron los siguientes datos: supervivencia a alta intensidad luminosa (ausencia o presencia), número de acículas por brinzal, altura de planta (cm), promedio de la apertura estomatal (µm) y promedio del número de estomas por brinzal. Para las dos últimas variables se muestrearon cinco hojas de cada brinzal localizadas a diferente altura; se fijaron con FAA (Curtis, 1986) (durante 24 horas); se transparentaron con blanqueador doméstico Cloralex® (durante 72 horas), y se lavaron dos veces con agua destilada. La epidermis del envés se aisló manualmente con pinzas de disección y microscopio

estereoscópico Leica Zoom 2000®, se tiñó durante cinco minutos con acetocarmín (Curtis, 1986) y lavaron dos veces con agua destilada. Se observó en un microscopio de campo claro Leica Cme® y retrató con una cámara fotográfica Motic®. Se contó el número de estomas (en 0.040 mm²) en cinco campos (con un aumento de 400) por brinzal. Se midió la apertura estomatal (con un aumento total de 1000) en 10 células por brinzal. Se calculó el número de estomas por hoja y planta y área del ostíolo por estoma y planta.

Se calcularon correlaciones (producto-momento de Pearson) con Excel® (Microsoft Office) entre las características morfológicas y perfiles de bandas de cada iniciador. Se calcularon correlaciones (producto-momento de Pearson) entre las variables morfológicas; se analizaron las asociaciones significativas ($P=0.01$) y sin relaciones de cálculo.

Resultados y Discusión

Se encontraron 95 brinzales de 400 (23.75 %) de *Abies religiosa* que fueron capaces de sobrevivir a alta intensidad luminosa. Otros trabajos sugieren que el porcentaje es menor (10-15 %) (Camacho, 1996; Galindo, 1996; Madrigal, 1964 y Vázquez *et al.*, 1962). Hay que tomar en cuenta que la semilla fue colectada de la exposición sur del Ajusco. Podría suponerse que al estar expuestas a mayores intensidades luminosas, las poblaciones de la exposición sur pudieron haber sido preseleccionadas de manera natural para la supervivencia a alta intensidad luminosa. No se pudo colectar semilla de la exposición norte porque estas poblaciones están en proceso de declinación y no hay producción de semilla.

De 35 iniciadores evaluados sólo nueve fueron polimórficos y mostraron marcadas diferencias entre productos de amplificación por el método de RAPD (5'-GCATCCCGGC-3', 5'-GCCGGGATGC-3', 5'-CCGCCGTTGG-3', 5'-CCCCGCAACG-3', 5'-

CGGCGGTAGG-3', 5'-GCCGCCATCC-3', 5'-CCGGCCTTCC-3', 5'-CCCGCCTTCC-3' y 5'-ATGTGTTGCG-3'. Al final del primer análisis se obtuvieron nueve iniciadores polimórficos, cuatro monomórficos y 15 que no revelaron resultados significativos. Se probaron seis iniciadores de los nueve polimórficos en cada uno de los individuos resistentes y susceptibles, y de ellos solamente el iniciador 5'-CCCCGCAACG-3' no generó productos de amplificación. El iniciador que mostró mayor número de productos de amplificación fue 5'-GCCGGGATGC-3' (con 12 bandas). (Cuadro 1, Fig. 1).

Se encontró una correlación significativa de cinco productos de amplificación (provenientes de tres iniciadores) con la supervivencia a la intensidad luminosa (Cuadro 1). En la literatura se reportan casos en los que la supervivencia a la intensidad luminosa está controlada genéticamente. Por ejemplo, la síntesis del fosfatidilglicerol es controlada por un gen simple; éste permite a las células mantenerse protegidas en condiciones de alta luminosidad; participando en el mantenimiento de la maquinaria fotosintética, a través de la dimerización y reactivación del Fotosistema II (Sakurai *et al.*, 2003). La biosíntesis del tetrapirrol es estrictamente regulada para prevenir la acumulación de intermediarios libres; esta condición es causada a partir de los genes que ejercen control (Sperling *et al.*, 1997). Además, la enzima oxidorreductasa de la protoclorofila protege a las plántulas del daño fotodinámico (Su *et al.*, 2001). Por último, la fase cúbica del PBL paracristalino ha sido propuesta como un amortiguador contra el daño fotooxidativo en altas intensidades de luz (Franck *et al.*, 2000). Por lo tanto, la supervivencia a alta intensidad luminosa puede explicarse por muchos factores, algunos de ellos controlados genéticamente.

La altura es una variable importante dado que esta especie pierde su susceptibilidad a alta intensidad luminosa con la edad; y la edad puede ser evaluada con base en la altura del individuo. Se esperaría que los individuos más altos fueran menos susceptibles a alta

intensidad luminosa. El promedio de altura de los brinzales susceptibles fue de 34.3 cm mientras que de los resistentes fue de 33.5 cm. Sin embargo, no hubo diferencias significativas ($P=0.05$). Los resultados tan paradójicos se pueden explicar porque el intervalo de estudio de la altura fue muy estrecho (18 a 40 cm). Es posible que si se hubiera ampliado dicho intervalo, se hubieran encontrado diferencias significativas.

En este trabajo se encontraron cuatro bandas que correlacionaron significativamente ($P=0.01$) con la altura del brinjal (Cuadro 1). Esto coincide con un gran número de investigaciones para la determinación de la heredabilidad de la altura en especies forestales (Yeh y Heaman, 1987; Zobel y Talbert, 1988; Clark *et al.*, 1998; Jindal, 1998; López *et al.*, 1999; Mohammad *et al.*, 2005; Palmer, 2006; St. Clair, 2000). Al menos once loci se encontraron asociados con la altura en *Glycine max* (Lee *et al.*, 1996). En *Arabidopsis thaliana* se encontró que la altura a la floración es controlada por un solo gen de dominancia parcial (Kearsey *et al.*, 2003).

Se encontraron siete productos de amplificación, provenientes de tres iniciadores que correlacionaron de manera significativa con el número de hojas por planta (Cuadro 1). Se esperaba que los brinzales resistentes tuvieran un menor número de hojas, ya que esto reduciría la evapotranspiración. Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados en los brinzales susceptibles se registró menor número de hojas (666 hojas por planta) que en brinzales resistentes (1110 hojas por planta). Esto sugiere que aunque los brinzales resistentes tuvieron más hojas, permitieron eficazmente el cierre de sus estomas. En *Gossypium hirsutum*, el loci JESPR-178 reveló la asociación más alta con el deshoje natural (Abdurakhmonov *et al.*, 2005). En *A. thaliana*, se han identificado genes que controlan la expresión del meristemo adaxial (Grigg *et al.*, 2005). Al menos 42 genes participan en la morfogénesis de acículas de *Pinus sylvestris* (Zelena y Sorochnyn's'kyi, 2005).

Todos los individuos resistentes mostraron sus estomas cerrados y los susceptibles abiertos (Fig. 2). La apertura estomatal (además de estar controlada por agentes ambientales) está controlada por factores genéticos. En *Gossypium hirsutum* y *G. barbadense*, se identificaron rasgos cuantitativos de los loci (QTL) que influyen la conductancia estomatal (Ulloa *et al.*, 2000). En *A. thaliana* se reportan genes que codifican los factores de transcripción implicados en el cierre de estomas (Gray, 2005; Liang *et al.*, 2005). Se demostró que las fototropinas PHOT1 y PHOT2 son los receptores de luz azul en estomas y regulan la apertura estomatal en *A. thaliana* (Kinoshita *et al.*, 2001).

La supervivencia a alta intensidad luminosa presentó el mayor número de correlaciones con las demás variables morfológicas. Se reconoce en la literatura que la resistencia a alta intensidad luminosa es una variable compleja que está determinada por muchas variables morfológicas, fisiológicas y fenológicas (Salisbury y Ross, 1985). Sin embargo, las variables que tuvieron mayor correlación (negativa) con la supervivencia fueron las relacionadas con el ancho y área del ostíolo. Luego entonces, para el caso de las plántulas de *A. religiosa* se debe considerar a la apertura estomatal como un factor determinante en la supervivencia a alta intensidad luminosa. (Cuadro 2)

Conclusiones

Se encontraron 25 % de brinzales de *Abies religiosa* resistentes a alta intensidad luminosa. Las variables evaluadas como la supervivencia a la intensidad luminosa, altura de los individuos, número de hojas en brinzales y apertura estomatal sugieren que son características morfológicas que están controladas genéticamente. Se encontraron nueve iniciadores que revelaron bandas significativamente correlacionadas con las variables

anteriores. La supervivencia a alta intensidad luminosa está determinada principalmente por la apertura estomatal.

Agradecimientos

A la Comisión Nacional Forestal y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento (CONAFOR-2002-C01-6181).

Referencias citadas

- Abdurakhmonov, I. Y.; Abdullaev, A. A.; Saha S.; Buriev, Z. T.; Arslanov, D. Z.; Kuryazov, G. T.; Mavlonov, S. M.; Rizaeva, U.K.; Reddy, J.N.; Jenkins, A.; Abdullaev, A. y Abdulkarimov (2005) Simple sequence repeat marker associated with a natural leaf defoliation trait in tetraploid cotton. *J. Heredity* 96(6): 644-653.
- Arcade, A, P Faivre-Rampant, LE Pâques y D Prat (2002) Localisation of genomic regions controlling microdensitometric parameters of wood characteristics in hybrid larches. *Annals Forest Science* 59: 607-615.
- Bernatzky, R y DL Mulcahy (1992) Marker-aided selection in a backcross breeding program for resistance to chestnut blight in American chestnut. *Can J For Res* 22: 1031-1035.
- Camacho, CA (1996) Germinación de *Abies religiosa* en condiciones naturales. Primera Reunión Científica Nacional. México, D.F. s/p.
- Carlson, JE, YP Hong, GR Brown y JC Glaubitz. (1994) Fish, DNA amplification markers & Conifers. *In*: PM Greshoff (ed.) *Plant Genome Analysis*. Cap. 7. Boca Ratón: 69-82.
- Chacalo, A, A Aldama y J Grabinsky (1994) Street tree inventory in Mexico City. *Journal of Arboriculture* 20(4): 222-226.
- Clark, D.; Rollinson, T.; McIntosh, B.; Hill-Tout, P.; Forshaw, I.; Gale, M.; Macdonald, C.; Cooper, T.; Adebawale, O.; Bosanquet, A. y Wardell, G (1998) Forest Research - 50 years of tree breeding - Field progeny -, *Sitka spruce*. Forest Commission. Gran Bretaña. www.forestry.gov.uk/website/forestresearchnsf/byunique/infd5wrf8d?Open&PrintFriendly=y (28 julio 2006).
- Curtis, PJ (1986) *Microtecnia Vegetal*. Trillas. México, D.F. 106 pp.
- Dallimore, W y AB Jackson (1961). *A handbook of coniferae including Ginkgoaceae*. 3a ed. Edward Arnold. Gran Bretaña. 165 pp.
- Devey, ME, A Delfino, BB Kinloch y DB Neale (1995) Random amplified polymorphic DNA markers tightly linked to a gene for resistance to white pine blister rust in sugar pine. *Proc Natl. Acad. Sc. USA* 92: 2066-2077.
- Franck, F., Sperling, U.; Frick, G.; Pochert, B.; Cleve, B.; Apel, K. y Armstrong, G. A. (2000) Regulation of etioplast pigment-protein complexes, inner membrane architecture, & proto-chlorophyllide a chemical heterogeneity by light-dependent NADPH: proto-chlorophyllide oxidoreductases A & B. *Plant Physiol.*, 124: 1678-1696.

- Galindo, JL (1996) Regeneración natural de *Abies religiosa* y sobrevivencia de plántulas. Primera Reunión Científica Nacional. México, D.F. s/p.
- Grattapaglia, D, VJ Ribeiro y GDSP Rezende (2004) Retrospective selection of elite parent trees using paternity testing with microsatellite markers: an alternative short term breeding tactic for *Eucalyptus*. Theor Appl Genet. 109: 192-199.
- Gray, J. E. (2005) Guard cells: transcription factors regulate stomatal movements. Curr Biol. 15:593-595.
- Grigg, S. P.; Canales, C.; Hay A. y Tsiantis, M (2005) SERRATE coordinates shoot meristem function & leaf axial patterning in *Arabidopsis*. Nature 437:1022-1026.
- Jindal, S. K (1998) Combined selection for tree height improvement in *Prosopis cineraria*. Proceedings of a conference held at the Central Arid Zone Research Institute, Jodhpur, India. J.C. Tewari, N.M. Pasiecznik, L.N. Harsh y P.J.C. Harris (ed.). The Prosopis Society of India & the Henry Doubleday Research Association.
- Kearsey, M. J.; Pooni, H. S. y Syed, N. H. (2003) Genetics of quantitative traits in *Arabidopsis thaliana*. Heredity 91: 456-464.
- Kinoshita, T.; Suetsugu, M. D.; Kagawa, N. T.; Wada, M. y Shimazaki, K. (2001) Phot1 & phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. Nature 414: 656-60.
- Kirst, M, AA Myburg, y RR Sederoff (2004) Microarrays & transcript level QTLs identify candidate genes for the quantitative traits of wood quality & growth in *Eucalyptus*. In Planta & Animal Genomes XII Conference, San Diego, USA. P-611.
- Kondo, T, K Tereda, E Hayashi, N Kuramoto, M Okamura y H Kawasaki (1999) RAPD markers linked to a gene for resistance to pine needle gall midge in *Pinus thunbergii*. Forest Biotechnology. Universidad de Oxford. s/p.
- Lee, SH; MA Bailey; MAR Mian, TE Carter, DA Ashley, RS Hussey, WA Parrott, y HR Boerma. (1996) Molecular Markers Associated with Soybean Plant Height, Lodging, & Maturity across Locations. Crop Sci. 36:728-735.
- Lerceteau, E, C Plomion y B Anderson (1999) Quantitative trait loci (QTL) for economically important traits in *Pinus sylvestris*. Forest Biotechnology. Universidad de Oxford. s/p.
- Liang, Y. K., Dubos, C.; Dodd, I C.; Holroyd, G. H.; Hetherington, A. M. y Campbell, M. M. (2005) AtMYB61, an R2R3-MYB transcription factor controlling stomatal aperture in *Arabidopsis thaliana*. Current Biology 15: 1201-1206.
- López, A.; Vargas, J. J. H.; Ramírez, C. H. y López, JU (1999) Variación intraespecífica en el patrón de crecimiento del brote terminal de *Pinus greggii* Engelm. Revista Chapingo serie Ciencias Forestales y del Ambiente 5:133-140.
- Madrigal, SX (1964) Contribución al conocimiento de la ecología de los bosques de oyamel (*Abies religiosa* HBK Schl. et Cham.) en el Valle de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. Vol. Téc. 18. México, D.F. 94 pp.
- Markussen, T, A Tusch, B Karlsson, L Wilhelmsson, R Stephan y M Fladung (1999) Identification of QTL markers for wood density of *Picea*. Forest Biotechnology. Universidad de Oxford. s/p.
- Marques, CM, J Vasquez-Kool, VJ Carocha, JG Ferreira, DM O'Malley, BH Liu y R Sederoff (1999) Genetic dissection of vegetative propagation traits in *Eucalyptus tereticornis* & *E. globulus*. Theor Appl Genet. 99: 936-946.
- Mechlenbacher, SA, RN Brown, JW Davis, H Chen, NV Bassil, DC Smith y TL Kubisiak (2004) RAPD markers linked to eastern filbert blight resistance in *Corylus avellana*. Theor Appl Genet. 108: 651-656.

- Mohammad, N.; Raharjo, P.; y Kusdiandra, E. W. (2005) Early genetic information Of *Shorea leprosula* Miq. half-sib progeny test in Nanga Nuak Pt. Sari Bumi Kusuma, Central Kalimantan. Faculty of Forestry, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia. www.apafri.org/8thdip/Session%204/S4_Naiem.doc (27 julio 2006).
- Moran, GF, L Emebiri, K Groom, J Owen, M Byne y E Williams (1999) QTL for growth in *Eucalyptus nitens*. Forest Biotechnology. Universidad de Oxford. s/p.
- Palmer A. T. (2006) Heritability. Lakehead University. [//flash.lakeheadu.ca/~atpalmer/Miscellaneous/heritability.doc](http://flash.lakeheadu.ca/~atpalmer/Miscellaneous/heritability.doc). (27 julio 2006).
- Prat, D, A Archade, P Faivre-Rampant y LE Paques (1999) QTL detection in a factorial mating design: analysis of wood microdensitometry characters in larch. Forest Biotechnology. Universidad de Oxford. s/p.
- Rzedowski. J (1978) Vegetación de México. Limusa. México. 431 pp.
- Salisbury, FB y CW Ross (1985) Plant Physiology. 3a ed. Wadsworth. Belmont, EUA. 540 pp
- Sakurai, I.; Hagio, M.; Gombos, Z.; Tyystjarvi, T.; Paakkaninen, V.; Aro, E. M. y Wada, H. (2003) Requirement of phosphatidylglycerol for maintenance of photosynthetic machinery. Plant Physiol. 133:1376-84.
- Sperling, U; V Cleve; G Frick; K Apel y GA Armstrong (1997) Overexpression of light-dependent PORA or PORB in plants depleted of endogenous POR by far-red light enhances seedling survival in white light & protects against photooxidative damage. Plant J. 12: 649-658.
- Spurr, SH y BV Barnes (1980) Forest Ecology. 3a ed. Wiley & Sons. Nueva York. 615 pp.
- St. Clair, B (2000) Genetic Variation in Height Growth of Willamette Valley Ponderosa Pine: Results from Four-Year-Old Trees in the ODF Schroeder Seed Orchard. USDA Forest Service Pacific Northwest Research Station. www.westernforestry.org/wvppca/geneticvariation.htm. (27 julio 2006).
- Storme, V, J Zhang, MT Cervera, M Steenackers, B Ivens, S Neyrinck, K Schamp, B Michels, H Zhang, M Van-Montagu y W Boerjan (1999) Genetic mapping of poplar. Forest Biotechnology. Universidad de Oxford. s/p.
- Su, Q.; Frick, G.; Armstrong, G. A. y Apel, K. (2001) POR C of *Arabidopsis thaliana*: A third light- & NADPH-dependent protochlorophyllide oxidoreductase that is differentially regulated by light. Plant Mol. Biol. 47: 805-813.
- Su, XH, XH Zhang, JH Li, QW Zhang y XW Zeng (2000) Identification of RAPD molecular markers for resistance against *Alternaria alternata* in poplar. Scientia Silvae Sinicae 36: 73-76.
- Tabor, GM, TL Kubisiak, NB Klopfenstein, RB Hall y HS McNabb (2000) Bulk segregant analysis identifies molecular markers linked to *Melampsora medusae* resistance in *Populus deltoides*. Phytopathology 90: 1039-1042.
- Tauer, CG, SW Hallgren y B Martin (1992) Using marker-aided selection to improve tree growth response to abiotic stress. Can J For Res 22: 1018-1030.
- Taylor, G, S Bunn, R Ferris y HD Bradshaw (1999) Linking physiological traits to molecular markers: putative QTL for leaf growth in poplar. Forest Biotechnology. Universidad de Oxford. s/p.
- Ulloa, M.; Cantrell, R. G.; Percy, R. G.; Zeiger, E. y Lu, Z. (2000) Breeding & genetics QTL analysis of stomatal conductance & relationship to lint yield in an interspecific cotton. The Journal of Cotton Science 4:10-18.
- Vázquez, SJ, WE Barret y E Little (1962) Consideraciones generales sobre coníferas

- mexicanas. FAO. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. Publ. Esp. 1. México, D.F. 20 pp.
- Yeh, C. y Heaman, C. (1987) Estimating Genetic Parameters of Height Growth in Seven-Year Old Coastal Douglas-Fir from Disconnected Diallels. *Forest Science* 33: 946-957.
- Zelena, L.B y Sorochyns'kyi, B.V. (2005) Characteristics of gene expression in morphologically abnormal needles of Scots pine. *Ukr Biokhim Zh.* 77:78-83.
- Zobel, B. J. y Talbert, J. (1988) Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales. Limusa. México. pp.153

Cuadro 1. Valores de las correlaciones significativas ($P \leq 0.01$) entre iniciadores y variables independientes.

Iniciador	Tamaño de banda (pb)	Supervivencia	Altura	Hojas/planta	Estomas/.04 mm ²	Ancho de ostíolo	Estomas/ hoja	Estomas/ planta	Área de ostíolo	Área de ostíolos /planta
5'-CCGCCGTTGG-3'	570.00	.52				.51			-.47	
	759.06					-.50		.53		
	832.21				-.62	.51	-.62			.65
	1368.65	.58		.54		-.54		.64	-.50	
	1612.48			.51				.50		
5'-CCGGCCTTCC-3'	1351.77			-.51		.76		-.58	.75	.63
	1801.92	-.78		-.56	-.50	.70	-.50	-.66	.70	.50
5'-CGGCGGTAGG-3'	156.58	-.60		-.83		.53		-.60	.55	
	467.70	-.60		-.83		.53		-.60	.55	
	986.23		.50	.65				.77		
	1119.57					.54			.57	.83
	1267.72		-.80		.56		.56			
5'-GCCGGGATGC-3'	1371.43					.54			.57	.83
	2082.56					.54			.57	.83
	840.78		-.51							
	1473.43		.52							

Cuadro 2. Valores de las correlaciones producto-momento de Pearson significativas ($P \leq 0.01$) entre variables independientes.

	Super- vivencia	Estomas / 0.04 mm ² (#)	Estomas / hoja (#)	Estomas / planta (#)
Hojas / planta (#)	0.58			
Estomas / .04 mm ²	0.53			
Ancho del ostíolo (μm)	-0.93	-0.56	-0.56	-0.56
Estomas / hoja (#)	0.53			
Estomas / planta (#)	0.76			
Área del ostíolo (μm ²)	-0.86	-0.53	-0.53	-0.61
Área del ostíolo / planta (mm ²)	-0.73			

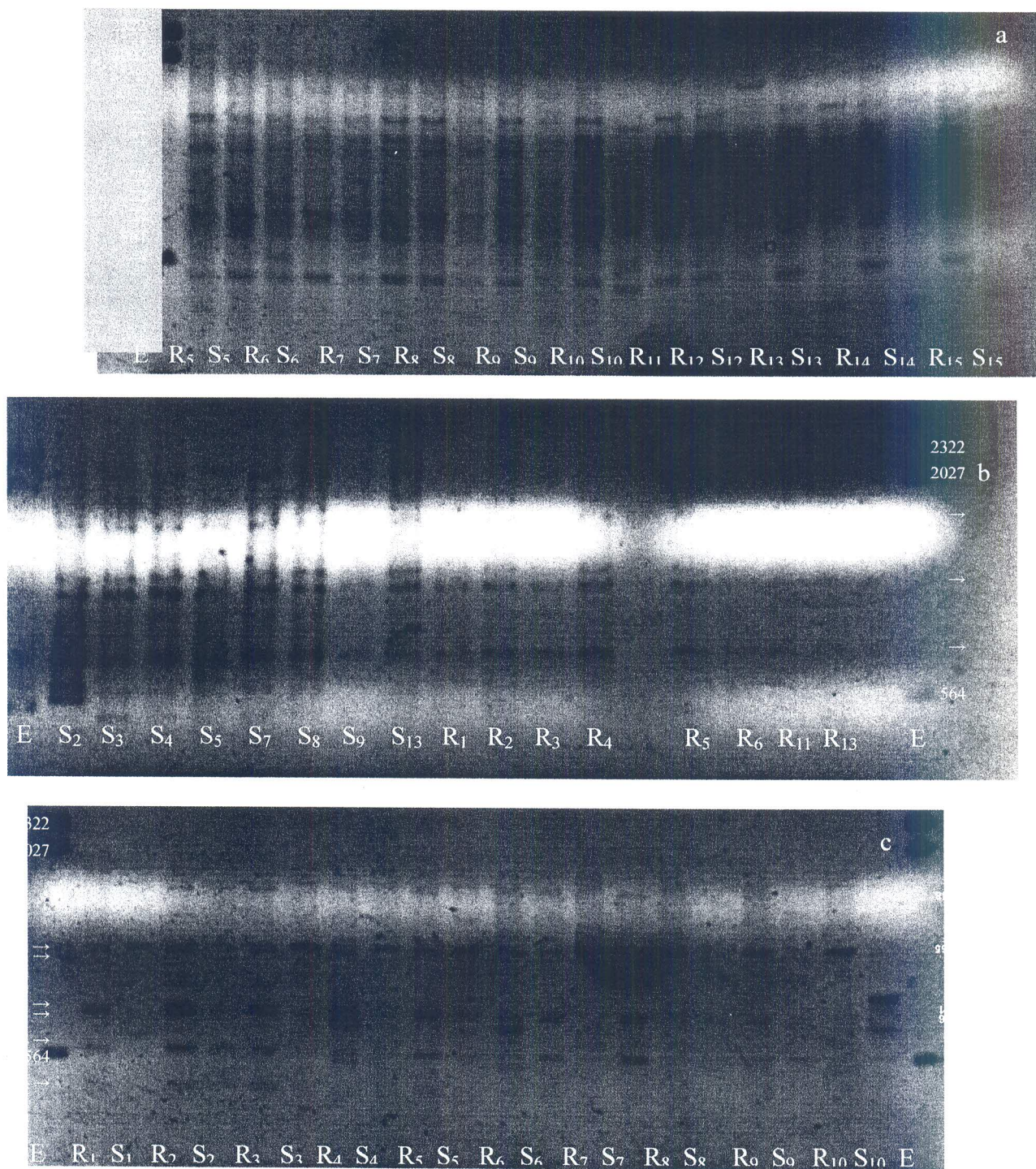


Figura 1. Patrones de amplificación RAPD y peso molecular de los productos obtenidos. Iniciadores: a) 5'-CCGGGATGC-3', b) 5'-CCGGCCTTCC-3', c) 5'-CCGCCGTTGG-3'. E: escalerilla. R: brinzales resistentes. S: brinzales susceptibles a alta intensidad luminosa. Las flechas señalan los perfiles de RAPDs.

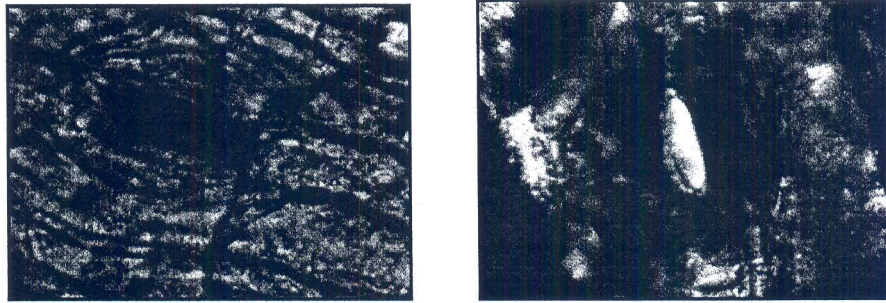


Figura 2. Estomas de un brinzal resistente (izquierda) y otro susceptible (derecha) de *Abies religiosa*.

DESINFECCIÓN Y SELECCIÓN DE INÓCULO *IN VITRO* DE *Abies religiosa*¹⁵

¹⁵ Álvarez-Moctezuma J. G., J. L. Rodríguez-de-La-O y J. García-Ruíz. Sometido a Agrociencia.

RESUMEN

Los bosques de *Abies religiosa* en el Ajusco, México están en declinación. Se requiere restablecer poblaciones a partir de algunos árboles supervivientes en laderas afectadas. Para la germinación *in vitro* se probaron desinfectantes (H_2O_2 , CH_3OH , $NaOCl$) y evaluaron inóculos para establecimiento. El mejor desinfectante fue sumergir la semilla en H_2O_2 al 3 % y los mejores inóculos fueron la semilla completa y primeras hojas verdaderas.

Palabras clave: Desinfección, H_2O_2 , CH_3OH , $NaOCl$, abeto, semilla.

ABSTRACT

Abies religiosa forests in Ajusco, Mexico are in declination. It is required to restore populations using some surviving trees from the affected slopes. For *in vitro* germination disinfectants were tested (H_2O_2 , CH_3OH , $NaOCl$) as well as explants for their establishment. The best seed disinfectant was 3 % H_2O_2 as a dip, and the best explants were complete seeds and true first leaves.

Key words: Disinfection, H_2O_2 , CH_3OH , $NaOCl$, fir, seed.

INTRODUCCIÓN

Abies religiosa es arborescente y crece a altas elevaciones (Martínez, 1953) en nueve entidades federativas de México¹⁶ (Gómez, 2003). Sus principales usos son madera, papel, medicina, techado¹⁷, árbol de navidad¹⁸ y captura de carbono¹⁹.

¹⁶ Gómez, G.R. (2003) Estado del conocimiento de *Abies religiosa* (HBK) Schl. et Cham). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. México. 450 p.

¹⁷ Bojorges, S.J.A. (1990) Índice del sitio para Oyamel (*Abies religiosa*) en Zoquiapan. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. México. 57 p.

¹⁸ Elizaldi, C.N.N. (1979) Uso de preservadores en árboles de Navidad (*Abies religiosa*). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. México. 48 pp.

Los bosques de *A. religiosa* del Ajusco son amenazados por factores crecientes que los han conducido a un proceso de declinación (Alvarez *et al.*, 1998). Se requiere restablecer las poblaciones originales, a partir de la escasa semilla de los árboles supervivientes en las laderas más afectadas. Las técnicas *in vitro* asegurarán la reproducción del material.

El objetivo del presente estudio fue evaluar las condiciones *in vitro* que permitan el establecimiento aséptico de semillas y seleccionar el inóculo más adecuado para la producción de plántulas en *A. religiosa*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La semilla se recolectó en primavera, bajo polinización abierta en el Ajusco, México. Se llevó al Laboratorio de Cultivo de Tejidos (Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo), donde la semilla se lavó con detergente y se enjuagó con agua corriente; después se colocó en etanol al 70 % durante 1 min.

Desinfección. Los tratamientos fueron H_2O_2 al 3 % v/v (se agitó 24 h en Orbit Shaker), CH_3OH al 70 % v/v (1 min), NaOCl al 3, 5 y 10 % v/v (5, 15 ó 20 min) y agua desionizada estéril. Se lavó tres veces con agua estéril. La sala de incubación a $28.05 \mu\text{Mm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (lámpara fluorescente DURO-TEST, Slim Line 75W), fotoperíodo: 16 h luz (8 h oscuridad) y 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). El medio de cultivo fue Murashige y Skoog (1962) al 50 % con $0.60 \mu\text{M}$ de tiamina, $277 \mu\text{M}$ de inositol, ácido cítrico y ácido ascórbico a un pH de 5.7 ± 1 ; se esterilizó por 20 min y el material 40 min a 120°C y $1.5 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$. Se contaron semillas contaminadas y necrosadas a los 32 d.

Prueba de inóculo. Los inóculos evaluados fueron semilla completa, embriones aislados

¹⁹ Valenzuela, H.T. (2001) Estimación del secuestro de carbono en bosques naturales de *A. religiosa*. Tesis. Universidad Autónoma Chapingo. México. 127 p.

completos o mitades (corte transversal), y cotiledones y primeras hojas verdaderas de plántulas germinadas *in vitro*. Se cultivaron en las condiciones mencionadas. A los 14 d se contabilizaron los inóculos vivos.

El diseño fue completamente al azar con 20 repeticiones (cajas Petri con 10 semillas cada una). Los datos se transformaron [$x'=(x+0.5)^{-2}$] para el análisis de varianza. Las medias se compararon con la prueba de Diferencia Mínima Significativa.

RESULTADOS

Desinfección. El H₂O₂ mostró la menor cantidad de semillas contaminadas y necrosadas. Para NaOCl, a mayor concentración y tiempo de exposición, menor incidencia de hongos y bacterias, pero aumenta las semillas necrosadas por toxicidad (Cuadro 1).

Prueba de inóculo. A los 14 d después de la siembra, los únicos inóculos vivos fueron la semilla completa y primeras hojas verdaderas de plántulas germinadas *in vitro*. La semilla iniciaba el proceso de germinación. Los otros inóculos se necrosaron (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

El H₂O₂ es eficaz en la desinfección de semilla en *Pseudotsuga menziesii* (Dumroese *et al.*, 1988) y en *Pinus ponderosa* reduce niveles de *Fusarium* (James y Genz, 1981). El H₂O₂ incrementa la germinación en *Pinus* spp. porque ablanda la testa y aumenta la permeabilidad²⁰. El H₂O₂ es más oxidativo que el cloro o ClO₂, se degrada en agua²¹ y

²⁰ Barnett, J.P. (1998). Disinfecting seeds with hydrogen peroxide.

<http://www.sfw.su.auburn.edu/sfnmc/class/fy614/peroxide.html>. 30 mayo 2005.

²¹ Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2004) Peroxide of hydrogen. Atlanta. www.atsdr.cdc.gov/. 30 mayo 2005.

libera O_2 y H_2O , sin residuos tóxicos. El H_2O_2 es bactericida, viricida y fungicida²² y las bacterias no tienen enzimas para degradarlo²³. La agitación minimiza la demanda química del O_2 ²⁴ y reduce la infección bacteriana²⁵.

Grahsl *et al.* (1991) desinfectaron semilla de *Abies alba* en una solución de NaOCl durante 24 h, los embriones aislados pasan a una inmersión de CH_3OH con ácido ascórbico. El CH_3OH y NaOCl también fueron efectivos para desinfectar semilla de *Agave parrasana* (Santacruz *et al.*, 1999) y *A. victoriae-reginae* (Martínez *et al.*, 2003). El cloro es eficaz en la mayoría de las bacterias patógenas, pero es imprevisible contra hongos y virus; el cloro oxida el material celular²⁶. El CH_3OH actúa desnaturalizando las proteínas, disolviendo las capas lipídicas y como agente deshidratante; es letal para bacterias, irregular para hongos y virus e inocuo sobre esporas; al combinarlo tiene mayor acción germicida²⁷.

Para una desinfección externa de la semilla, García *et al.* (1994) remojaron semilla de *Pinus pinea* en CH_3OH al 70 % durante 2 min y $HgCl$ al 0.3 % por 15 min; mientras que Drake *et al.* (1997) para *Picea sitchensis* utilizaron $HgCl$ al 1 % (P/V) con un gramo de Tween 20 (Sigma). Se ha desinfectado con Bavistin® y $HgCl$ en *Quercus glauca* y *Q. leucotrichophora* (Purohit *et al.*, 2002), y con CH_3OH y $HgCl$ en *Pinus* spp. (Tang y Ouyang, 1999); el $HgCl$ altera la permeabilidad y coagula las proteínas. Los compuestos mercuriales requieren altas concentraciones para tener efecto bactericida. Lavandina® es

²² Hospital Ramos Mejía (1993) Esterilización, desinfección, antisépticos y desinfectantes. Arg. www.ramosmejia.org.ar. 30 mayo 2005.

²³ Iáñez, P.E. (1998) Metabolismo energético. Curso de microbiología general. Univ. Nal. del Nordeste. Arg. [www://fai.unne.edu.ar/](http://fai.unne.edu.ar/). 30 mayo 2005.

²⁴ Sánchez, Y.J.M. (2004) Producción de bioinsecticida a base de *Bacillus thuringiensis*. <http://monografias.com/trabajos15/>. 30 mayo 2005.

²⁵ Riofrio, M. (2004) Growing Peppers in the Home Garden. www.g6csy.net 30 mayo 2005.

²⁶ Environmental Protection Agency (1999) Desinfección con cloro. Washington, <http://www.epa.gov/own/mtb/cs-99-062.pdf>. 30 mayo 2005.

²⁷ Mateos, P.F. (2004) Control de las poblaciones microbianas: Esterilización y desinfección. Univ. Salamanca. www.atl-gestion.com. 30 mayo 2005.

efectivo en *Pinus taeda*²⁸.

La regeneración de plantas en coníferas vía embriogénesis somática y organogénesis está progresando. Se ha obtenido la regeneración de órganos y embriones a partir de semilla en *Abies alba* (Schuller *et al.*, 1989, 2000), *A. fraseri* (Guevin y Kirby 1997), *Acer pseudoplatanus* (Grahsl *et al.*, 1991), *Picea abies* (Verhagen y Wann, 1989), *P. sitchensis* (Drake *et al.*, 1997), *Pinus pinea* (García *et al.*, 1994), *P. radiata* (Schestibratov *et al.*, 2003) y *P. taeda* (Tang y Ouyang, 1999).

Los explantes comúnmente usados para promover la regeneración de coníferas son ricos en almidón, como cotiledones, hipocótilos y embriones (Roca y Mroginski, 1991). En coníferas, la principal fuente de explante para la inducción de callo son embriones aislados de semilla, ya que poseen un potencial embriogénico mayor comparado con cualquier otra parte de la planta adulta. Grahsl *et al.* (1991) utilizaron hipocótilos aislados de semillas, y Schuller *et al.* (1989) embriones cortados longitudinal y transversalmente. Cotiledones de *Pinus pinea* se usaron para inducción de yemas (García *et al.*, 1994), pero los embriones aislados no fueron un buen inóculo en *A. religiosa*.

Sin embargo, se requiere seguir evaluando inóculos en estructuras de individuos adultos (David, 1987), que puedan ser valorados forestalmente y propagarse masivamente *in vitro* los individuos sobresalientes.

CONCLUSIONES

El mejor tratamiento para desinfectar la semilla de *A. religiosa* es sumergirla en H₂O₂ y agitarla 24 h. Los mejores inóculos fueron la semilla completa y primeras hojas primarias.

²⁸ Niella, F., P. Rocha (2004) Factores que afectan la formación de brotes adventicios a partir de embriones maduros de *Pinus taeda* L. vía organogénesis. Univ. Nal. Misiones. Arg. s/p. 30 mayo 2005.

AGRADECIMIENTOS

A la Comisión Nacional Forestal y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
(CONAFOR-2002-C01-6181).

REFERENCIAS

- Alvarez D., G. Laguna, I. Rosas (1998)** Macroscopic and microscopic symptoms in *Abies religiosa* exposed to ozone in a forest near Mexico city. *Environ Pollut* 103: 251-259.
- David, A. 1987.** In vitro propagation of Gymnosperms. J.M. Bonga, D.J. Durzan (eds). *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Dordrecht. Boston. pp: 72-109.
- Drake P.M.W., A. John, J.B. Power, M.R. Davey (1997)** Cytokinin pulse mediated shoot organogenesis from cotyledons of Sitka spruce and high frequency *in vitro* rooting of shoots. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 50: 147-151.
- Dumroese R.K., R.L. James, D.L. Wenny, C.J. Gilligan (1988)** Douglas-fir seed treatments: effects on seedborne organisms and germination. *In: Landis T.D. (ed) Proc. Combined Meeting of the Western Forest Nursery Associations*. USDA For. Serv. Gen. Tech. Rep. RM-167. p. 155-160.
- García, F.L., L. Serrano, J.A. Pardos (1994)** In vitro shoot organogenesis from excised immature cotyledons and microcuttings production in Pine. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 36: 135-140.
- Grahl, A., J. Schmidt, E. Wilhelm (1991)** Somatic embryogenesis and organogenesis of embryonic explants of *Abies alba* and *Acer pseudoplatanus*. *In: Ahuja., M.R. (ed) Woody Plant Biotechnology*. Plenum Press. Nueva York. pp: 201-203.
- Guevin, T.G., E.G. Kirby (1997)** Induction of embryogenesis in cultured mature zygotic embryos of *Abies fraseri*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 49: 219-222.
- James, R.L., D. Genz (1981)** Ponderosa pine seed treatments: effects on seed germination and disease incidence. Forest Service, Missoula, MT. Northern Region Report 81-16, 13 p.
- Martínez, P.A., L.P. Ortega, V.M. Chávez, R. Bye (2003)** Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 74: 135-142.
- Martínez, M. (1953)** Las Pináceas del estado de México. Dirección de Agricultura y Ganadería. México. pp: 47-57.
- Murashige, T., F. Skoog (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Purohit, V.K., S. Tamta, S. Chandra, P. Vyas, L.M.S. Palni, S.K. Nandi (2002)** *In vitro* multiplication of *Quercus leucotrichophora* and *Q. glauca*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 69: 121-133.
- Roca, W.M., L.A. Mroginski (1991)** Cultivo de Tejidos en la agricultura, Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. pp: 143-

- Santacruz, R.F., P.H. Gutiérrez, G.B. Rodríguez (1999)** Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana*. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 56: 163-167.
- Schestibratov K.A., R.V. Mikhailov, S.V. Dolgov (2003)** Plantlet regeneration from subculturable nodular callus of *Pinus radiata*. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 72: 139-146.
- Schuller A., G. Reuther, T. Geier (1989)** Somatic embryogenesis from seed explants of *Abies alba*. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 60: 23-31.
- Schuller, A., R. Kirchner, G. Reuther (2000)** Interaction of plant growth regulators and organic C and N components in the formation and maturation of *Abies alba* somatic embryos. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 17: 53-58.
- Tang, W., F. Ouyang (1999)** Plant regeneration via organogenesis from six families of loblolly pine. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 58: 223-226.
- Verhagen, S.A., S.R. Wann (1989)** Norway spruce somatic embryogenesis: high-frequency initiation from light-cultured mature embryos. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 16:103-111.

Cuadro 1. Efecto del tratamiento de desinfección en el número de semillas contaminadas (media aritmética $\pm$ desviación estándar).

Tipo de desinfectante	Tiempo de exposición	Semillas contaminadas	Semillas necrosadas
H ₂ O estéril	24 h	10.00 $\pm$ 0.00 d	10.00 $\pm$ 0.00 c
H ₂ O ₂ al 3% v/v	24 h	0.00 $\pm$ 0.00 a	0.00 $\pm$ 0.00 a
CH ₃ OH al 70 % v/v	1 min	10.00 $\pm$ 0.00 d	10.00 $\pm$ 0.00 c
NaOCl al 3% v/v	5 min	5.05 $\pm$ 0.37 c	5.15 $\pm$ 0.41 b
NaOCl al 3% v/v	15 min	4.25 $\pm$ 0.42 c	5.90 $\pm$ 0.32 b
NaOCl al 3% v/v	20 min	2.50 $\pm$ 0.22 b	9.55 $\pm$ 1.01 c
NaOCl al 10 % v/v	5 min	2.00 $\pm$ 0.31 b	9.80 $\pm$ 0.90 c
NaOCl al 5% v/v	15 min	4.75 $\pm$ 0.42 c	5.35 $\pm$ 0.62 b
NaOCl al 10 % v/v	15 min	10.00 $\pm$ 0.00 d	10.00 $\pm$ 0.00 c

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

Cuadro 2. Supervivencia del inóculo en *A. religiosa* (14 días después de la siembra) (media aritmética $\pm$ desviación estándar).

Tipo de inóculo	Número de inóculos vivos a los 14 d
Semilla completa	10.00 $\pm$ 0.00 a
Embriones aislados completos	0.00 $\pm$ 0.00 c
Mitad superior del embrión aislado (hipocótilo y plúmula)	0.00 $\pm$ 0.00 c
Mitad inferior del embrión aislado (hipocótilo y radícula)	0.00 $\pm$ 0.00 c
Cotiledones (de plántulas germinadas <i>in vitro</i>)	0.00 $\pm$ 0.00 c
Primeras hojas verdaderas (de plántulas germinadas <i>in vitro</i>)	7.48 $\pm$ 1.35 b

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

CONCLUSIONES GENERALES

Las cuatro especies estudiadas (*A. religiosa*, *C. lindleyi*, *P. ayacahuite* y *P. menziesii*) mostraron características no deseables en poscosecha. Se requiere mejoramiento genético. *P. menziesii* mostró los valores más cercanos en más variables al idiotipo. La mejor procedencia fue Tlaxcala. Varias correlaciones entre variables mostraron encrucijadas para seleccionar la mejor especie.

El mejor tratamiento de poscosecha fue la inmersión sostenida de la base del tronco en agua. Con este tratamiento se redujo la cantidad de hojas desprendidas; mantuvo la humedad total del árbol y de la ramilla en particular; y exhibió un menor cambio del croma, matiz y luminosidad. La especie que presentó una mejor respuesta fue *P. menziesii*; detectándose una menor cantidad de hojas desprendidas y el croma, matiz y luminosidad con menor cambio con respecto a sus valores iniciales. La procedencia que presentó una mejor respuesta fue Tlaxcala; con menor cantidad de hojas desprendidas; se mantuvo por mayor tiempo la humedad total del árbol; y el croma, matiz y luminosidad exhibieron un menor cambio respecto a sus valores iniciales.

El mejor método de extracción de ADN con tejido fresco para *A. religiosa* es Nucleon Phytopure Plant DNA Extraction®. Para mejorar la calidad y cantidad de ADN extraído, se pueden utilizar antioxidantes como mercaptoetanol. El almacenamiento en seco dificultó las extracciones de ADN.

Se encontraron 25 % de brinzales de *Abies religiosa* resistentes a alta intensidad luminosa. Los análisis de los datos de las variables evaluadas como la supervivencia a la intensidad luminosa, altura de los individuos, número de hojas en brinzales y apertura estomatal, sugieren que son características morfológicas que están controladas

genéticamente. Se encontraron nueve iniciadores que revelaron bandas significativamente correlacionadas con las variables anteriores. La supervivencia a alta intensidad luminosa está determinada principalmente por la apertura estomatal.

El mejor tratamiento para desinfectar la semilla de *A. religiosa* es sumergirla en H_2O_2 y agitarla 24 h. Los mejores inóculos fueron la semilla completa y primeras hojas primarias.