



Universidad Autónoma Chapingo

DIVISIÓN DE CIENCIAS FORESTALES
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

**VARIACIÓN DE CARACTERES CUANTITATIVOS ENTRE
PROCEDENCIAS DE *Abies religiosa* ORIGINADAS EN UN
GRADIENTE ALTITUDINAL EN LA RESERVA DE LA
BIOSFERA DE LA MARIPOSA MONARCA: ETAPA DE
VIVERO**

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Ciencias Forestales

Presenta:

Ana Laura Cruzado Vargas



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

Bajo la supervisión de:

Dr. Francisco J. Zamudio Sánchez

Dr. Cuauhtémoc Sáenz Romero



Chapingo, Estado de México, septiembre de 2017

**VARIACIÓN DE CARACTERES CUANTITATIVOS ENTRE
PROCEDENCIAS DE *Abies religiosa* ORIGINADAS EN UN GRADIENTE
ALTITUDINAL EN LA RESERVA DE LA BIOSFERA DE LA MARIPOSA
MONARCA: ETAPA DE VIVERO**

Tesis realizada por ANA LAURA CRUZADO VARGAS, bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

DIRECTOR:



DR. FRANCISCO JOSÉ ZAMUDIO SÁNCHEZ

CO-DIRECTOR:



DR. CUAUHTÉMOC SÁENZ ROMERO

ASESOR:



DR. GABRIEL ARCÁNGEL RODRÍGUEZ YAM

Chapingo, Estado de México, septiembre de 2017

CONTENIDO

RESUMEN GENERAL.....	14
ABSTRACT	15
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	16
OBJETIVOS	18
<i>Objetivo general</i>	18
<i>Objetivos particulares</i>	18
HIPÓTESIS	19
REVISIÓN DE LITERATURA	19
<i>Distribución de Abies en México</i>	19
<i>Descripción botánica de Abies religiosa</i>	19
<i>Ecología de Abies religiosa</i>	20
<i>Importancia ecológica de Abies religiosa</i>	20
<i>Importancia económica de Abies religiosa</i>	20
<i>Problemática en la restauración de bosques de Abies religiosa</i>	21
<i>Ensayos de procedencias en México</i>	21
<i>Ensayos para determinar la acumulación de prolina</i>	25
LITERATURA CITADA	26
CAPÍTULO I. VARIACIÓN GENÉTICA DE CARACTERES CUANTITATIVOS (INCREMENTO EN DIÁMETRO BASAL Y EN ALTURA DE PLANTA Y SOBREVIVENCIA) ENTRE PROCEDENCIAS DE <i>Abies religiosa</i>	32
RESUMEN.....	32
CHAPTER I. GENETIC VARIATION OF QUANTITATIVE TRAITS (NCREASE IN BASIC DIAMETER AND IN PLANT HEIGHT AND SURVIVAL) AMONG PROVENANCES OF <i>Abies religiosa</i>	33
ABSTRACT	33
INTRODUCCIÓN.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
<i>Incremento en altura de planta</i>	43

<i>Incremento en diámetro basal</i>	47
<i>Sobrevivencia de planta</i>	48
CONCLUSIONES.....	51
AGRADECIMIENTOS.....	51
LITERATURA CITADA	52
CAPÍTULO II. EVALUACIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE PROLINA PRESENTE EN PLANTAS DE UN GRADIENTE ALTITUDINAL DE <i>Abies</i> <i>religiosa</i>	56
RESUMEN.....	56
CHAPTER II. EVALUATION OF PROLINE CONCENTRATION ON SEEDLINGS OF AN ALTITUDINAL GRADIENT OF <i>Abies religiosa</i>	57
ABSTRACT	57
INTRODUCCIÓN.....	58
MATERIALES Y MÉTODOS	60
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
CONCLUSIONES.....	72
AGRADECIMIENTOS.....	73
LITERATURA CITADA	73

LISTA DE CUADROS

<i>Cuadro 1. Procedencias de plántulas de diferentes altitudes diferenciadas por colores.....</i>	<i>41</i>
<i>Cuadro 2. Análisis de varianza para la variable diferencia entre altura final (a 18 meses de establecimiento en vivero), e inicial (primera medición tomada una vez las plantas establecidas en vivero) de 6 procedencias de Abies religiosa de la RBMM.....</i>	<i>44</i>
<i>Cuadro 3. Medias por bloque a 18 meses de establecimiento en vivero de 6 procedencias de Abies religiosa de la RBMM. Los bloques están ordenados de mayor a menor promedio de crecimiento.....</i>	<i>46</i>
<i>Cuadro 4. Análisis de varianza para la variable diferencia entre diámetro basal final (a 18 meses de establecimiento en vivero), e inicial (primera medición tomada una vez las plantas establecidas en vivero) de 6 procedencias de Abies religiosa de la RBMM.....</i>	<i>47</i>
<i>Cuadro 5. Análisis del porcentaje de sobrevivencia de planta de Abies religiosa (a 18 meses de establecimiento en vivero), por procedencia (Altitud de origen).....</i>	<i>50</i>
<i>Cuadro 6. Reactivos usados para curva de calibración para determinar el contenido de prolina en seis procedencias de Abies religiosa.....</i>	<i>66</i>
<i>Cuadro 7. Absorbancias de curva de calibración tomadas por espectrofotómetro a 520 nm.....</i>	<i>67</i>

Cuadro 8. Análisis de varianza para determinar el contenido de prolina entre 6 procedencias de Abies religiosa de la RBMM..... 69

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Ejemplo de sitio de colecta de plántulas de la regeneración natural de Abies religiosa dentro del gradiente altitudinal de la RBMM.....</i>	<i>36</i>
<i>Figuras 2 y 3. Regeneración natural de Abies religiosa en sitios predominantemente húmedos (con abundante musgo), de donde se extrajeron plántulas recién emergidas para su trasplante a vivero.....</i>	<i>37</i>
<i>Figuras 4 y 5. Ejemplos de plántulas seleccionadas de regeneración natural de Abies religiosa para su trasplante a vivero.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 6. Ubicación del vivero comunitario en ejido La Mesa, San José del Rincón, Edo. de México.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 7. A) Sitio de establecimiento de vivero comunitario en el ejido La Mesa, San José del Rincón, Edo. de México. B) Casa de malla sombra al 50%.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 8. A) Plántula lista para trasplantar. B) Llenado de bolsa de polietileno (envase) con tierra de monte (sustrato). C) Envase listo para trasplante. D) Trasplante de plántulas de regeneración natural de Abies religiosa.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 9 y 10. Vivero comunitario establecido en ejido La Mesa, San José del Rincón, Estado de México.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 11. Vivero comunitario establecido en ejido La Mesa, San José del Rincón, Estado de México a 18 meses del inicio del experimento.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 12. A) Medición de altura de planta. B) Medición de diámetro basal.....</i>	<i>42</i>

<i>Figura 13. Regresión cuadrática de medias de incremento en altura por procedencia (altitud de origen).....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 14. Medias por procedencia de incremento en altura por bloque. Los bloques están ordenados de mayor a menor por la media de bloque.....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 15. Regresión cuadrática de medias de incremento en diámetro basal por procedencia (altitud de origen).....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 16. Índice de sobrevivencia total de planta rescatada de regeneración natural de Abies religiosa de RBMM por mes de medición.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 17. Porcentaje de sobrevivencia (por procedencia) de planta rescatada de regeneración natural de Abies religiosa de RBMM por fecha de medición.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 18. Experimento con plantas de Abies religiosa de la RBMM, con tratamiento de riego y sin riego para determinación del contenido de prolina....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 19. A) Ejemplo de colecta de acículas de Abies religiosa por planta. B) Pesaje de plantas de Abies religiosa de la RBMM en báscula de precisión (Sartorius). C) Untracongelador (Thermo Scientific).....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 20. Preparación de ácido de ninhidrina con agitación.....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 21. A) Muestra de acículas en ácido sulfosalicílico al 3% lista para macerar. B) Muestras procesadas con ácido de ninhidrina y ácido acético glacial. C) Muestras puestas a baño María. D) Muestras en baño de hielo.....</i>	<i>64</i>

Figura 22. A) Muestra en embudo de separación. B) Centrifugado de muestras. C) Lectura de absorbancia con espectrofotómetro a 520 nm..... 65

Figura 23. A) Tubos para curva de calibración B) Tubos en baño María. C) Baño de hielo para terminar reacción. D) Extracción con tolueno. E) Agitación para mezclar la solución de prolina con el tolueno..... 66

Figura 24. Curva de calibración para determinar contenido de prolina mg/ml.... 67

*Figura 25. Medias, regresión cuadrática y valor de p, para el contenido de prolina en seis procedencias de *Abies religiosa* (los datos fueron obtenidos de la diferencia del mes de junio menos el mes de mayo)..... 70*

DEDICATORIA

A mi hermosa familia:

Mis padres Ramón Cruzado e Irene Vargas por haberme traído al mundo y por brindar siempre todo y más de lo que un hijo puede esperar: amor, amistad, apoyo, paciencia y confianza incondicional. Mis hermanos Karent y David que siempre han creído en mí, y a mis sobrinos hermosos que quiero tanto.

A mis amigas y amigos, gracias por apoyar mis decisiones y ayudarme en momentos difíciles.

A todas las personas que han creído en mí.

GRACIAS.

Ana Laura Cruzado Vargas

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por permitirme ingresar a una maestría por medio de la beca 699285/581688, y la beca mixta 699285/291211.

A mi alma mater Universidad Autónoma Chapingo y a la División de Ciencias Forestales por ofrecer la oportunidad de iniciar y concluir esta nueva etapa.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por recibirme para realizar una estancia de investigación.

A los miembros del comité revisor:

Dr. José Francisco Zamudio Sánchez por las observaciones realizadas.

Dr. Cuauhtémoc Sáenz Romero por la excelente dirección, así como el apoyo mostrado tanto académica como moral.

Dr. Gabriel Arcángel Rodríguez Yam por las observaciones realizadas.

A la Coordinadora del Posgrado en Ciencias Forestales Dra. María Amparo Máxima Borja de la Rosa por el apoyo mostrado a lo largo del trayecto de la maestría.

A la Biól. Yolanda García Rodríguez encargada del laboratorio de Ecología Química y Agroecología del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad de la Universidad Nacional Autónoma de México campus

Morelia, por la gran ayuda ofrecida, así como la amistad que me brindó desde el inicio de la estancia de investigación.

Al Dr. Roberto Lindig Cisneros profesor de Restauración Ambiental del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad de la Universidad Nacional Autónoma de México campus Morelia por abrirme las puertas en el laboratorio de Ecología Funcional para el manejo de Ecosistemas, así como por el apoyo mostrado durante la estancia de investigación.

Al Dr. José Arnulfo Blanco García por su apoyo incondicional para el trabajo en campo, así como sus bien recibidas observaciones.

A los colegas biólogos pertenecientes a la Facultad de Biología de la UMSNH que participaron en la colecta, medición de campo y trabajo de laboratorio, muchas gracias por el apoyo brindado.

A las instituciones Monarch Butterfly Fund (Madison, Wisconsin, USA), el Consejo de Ciencia y Tecnología, Fondo Investigación Científica Básica, proyecto 2014-242985 y la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH, por el financiamiento otorgado para realizar el proyecto.

DATOS BIOGRÁFICOS

Ana Laura Cruzado Vargas nació el 29 de diciembre de 1989 en el municipio de Metepec, Estado de Hidalgo.

Realizó su formación media superior en la Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo de 2005 a 2008. Posteriormente continuó sus estudios en la División de Ciencias Forestales, en la misma Institución, de 2008 a 2012, donde escribió la tesis (de forma conjunta): “Estudio cariotípico de *Pseudotsuga* sp., en una localidad del centro de México” y en noviembre de 2013 obtuvo el título de Ingeniera en Restauración Forestal.

En agosto de 2015 ingresó a la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo donde realizó sus estudios de Maestría en Ciencias en Ciencias Forestales.

RESUMEN GENERAL

VARIACIÓN DE CARACTERES CUANTITATIVOS ENTRE PROCEDENCIAS DE *Abies religiosa* ORIGINADAS EN GRADIENTE ALTITUDINAL EN LA RESERVA DE LA BIOSFERA DE LA MARIPOSA MONARCA: ETAPA DE VIVERO

En este trabajo se analizó la variación de caracteres cuantitativos (incremento en altura de planta, incremento en diámetro basal, sobrevivencia y contenido de prolina), en plántulas rescatadas de la regeneración natural de 6 procedencias de *Abies religiosa* obtenidas en un gradiente altitudinal definido desde los 2960 a los 3450 m en la Reserva de la Biosfera de la Mariposa Monarca y establecidas en un vivero comunitario a 3000 m en la casa del Sr. Francisco Ramírez Cruz, ejidatario participante del proyecto perteneciente al ejido La Mesa, del Municipio de San José del Rincón, Edo. de México.

Los objetivos del trabajo fueron: 1) determinar en planta originada de regeneración natural producida en vivero, si existen diferencias genéticas significativas entre procedencias en sobrevivencia, incremento en diámetro basal e incremento en altura de planta y 2) analizar el contenido y cantidad de prolina de cada procedencia como posible respuesta al estrés por sequía, determinar si existe un patrón clinal altitudinal. Se encontraron diferencias significativas entre procedencias para diámetro basal ($P < 0.0001$), y un 75% de sobrevivencia promedio entre todas las procedencias, lo que indica como viable el rescate de planta de regeneración natural. Para altura total de planta, no se encontraron diferencias significativas entre procedencias ($P = 0.0603$).

El patrón altitudinal encontrado para todas las variables fue similar pero inesperado, determinando que, aunque no hay diferencias significativas, la tendencia que siguen las plantas es que las procedencias de las mayores altitudes fueron las que obtuvieron mejores resultados en cuanto a crecimiento (incremento en altura e incremento en diámetro basal) y contenido de prolina. En cuanto a sobrevivencia, los extremos altitudinales fueron los que tuvieron mayor sobrevivencia.

Palabras clave: *Abies religiosa*, incremento en altura, incremento en diámetro basal, sobrevivencia, contenido de prolina.

Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma Chapingo

Ing. Ana Laura Cruzado Vargas

Dr. Francisco J. Zamudio Sánchez

Dr. Cuauhtémoc Sáenz Romero

ABSTRACT

VARIATION OF QUANTITATIVE CHARACTERS BETWEEN PROCEDURES OF *Abies religiosa* ORIGINATED IN THE ALTITUDINAL GRADIENT IN THE RESERVE OF THE BIOSPHERE OF THE MONARCH BUTTERFLY: STAGE OF VIVERO

In this work, we analyzed the variation of quantitative traits (increase in plant height, increase in basal diameter, survival and proline content), in seedlings rescued from natural regeneration from 6 provenances of *Abies religiosa*, collected along an altitudinal gradient (2960 to 3450 m) in the Monarch Butterfly Biosphere Reserve and established in a community nursery at 3000 m in the house of Mr. Francisco Ramirez Cruz, local participant on the Project, belonging to the Ejido La Mesa, Municipality of San Jose del Rincón, Estado de Mexico.

The objectives of the study were: 1) to determine if there are significant genetic differences between provenances in survival, increase in basal diameter and increase in height of rescued seedlings originated from natural regeneration and produced in a nursery. 2) to analyze the content and amount of proline of each provenance as possible response to drought stress, and to determine if there is an altitudinal clinal pattern. Significant differences were found between provenances for basal diameter ($P < 0.0001$), and a 75% across provenance average survival, indicate that rescue of natural regeneration seedlings is viable. For the total height of the seedlings, there is no significant differences among provenances ($P = 0.0603$).

The altitudinal pattern, although no significant, was unexpected for all variables is fine, but there are no significant differences, where seedlings originated from the highest altitudes had the best growth (increase in height and increase in basal diameter) and proline content. For survival, the altitudinal extremes were those that had the largest survival.

Key words: *Abies religiosa*, increase in height, increase in basal diameter, survival, proline content.

Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma Chapingo

Ing. Ana Laura Cruzado Vargas

Dr. Francisco J. Zamudio Sánchez

Dr. Cuauhtémoc Sáenz Romero

INTRODUCCIÓN GENERAL

El clima determina la distribución geográfica de las especies de plantas, pues influye en el establecimiento y el desarrollo de los individuos (Pearson & Dawson, 2003; Gray, 2005; Lomolino *et al.*, 2005; Pérez-Miranda *et al.*, 2014), lo que afecta los patrones de estructura y productividad de la vegetación (Maslin, 2004; Pérez-Miranda *et al.*, 2014), así como, la composición y biología de los seres vivos (Gitay *et al.*, 2002; Rosenzweig *et al.*, 2007; Pérez-Miranda *et al.*, 2014).

Los bosques de *Abies religiosa* conforman comunidades clímax que predominan las partes altas montañosas. En México, se encuentra principalmente a lo largo del Eje Neovolcánico, cuyas características de cobertura vegetal y propiedades físicas del suelo permiten una buena absorción y retención de agua de lluvia; además de tener importancia estética-recreativa y ser de especial interés para la protección de fauna silvestre (Benavides-Meza *et al.*, 2011). Tal es el caso de la Reserva de la Biósfera de la Mariposa Monarca, ubicada en las montañas de los estados de Michoacán y México, con una superficie de 56,259 hectáreas (Byers, 2004); cuyo bosque (entre 2900 y 3400 m de altitud) sirve como resguardo para las poblaciones de mariposa monarca (*Danaus plexippus* L.) que migran desde Canadá y Estados Unidos durante el invierno (Anderson & Brower, 1996; Oberhauser & Peterson, 2003; Castellanos-Acuña *et al.*, 2014).

Las especies forestales con grandes áreas de distribución tienden a tener gran variación clinal controlada genéticamente, ya que es posible encontrar una sola especie en diferentes altitudes, exposiciones, tipos de suelo u otros factores ambientales y por consiguiente sus poblaciones (llamadas procedencias cuando nos referimos a ellas por su ubicación geográfica) pueden tener diferenciación genética entre ellas, como un mecanismo de adaptación al ambiente en donde crecen (Benavides-Meza *et al.*, 2011). Conocer la variación genética en

caracteres de relevancia adaptativa sirve para mejorar la productividad de las plantaciones, mejorando su adaptabilidad a las condiciones del sitio final de plantación (Nienstaedt, 1990; Viveros-Viveros *et al.*, 2005).

La transformación de bosques maduros en áreas abiertas para diferentes usos económicos del suelo es un fenómeno que se ha presentado a lo largo de los últimos siglos (Herrera *et al.*, 2001; Flores-Nieves *et al.*, 2011), lo cual se agrava con el cambio climático global. Esta combinación de progresivo cambio de uso de suelo con cambio climático es una razón urgente para conservar una variedad de recursos genéticos (Ledig, 2004). La declinación forestal, es un factor derivado del cambio climático que se define como una enfermedad multifactorial causada por agentes abióticos y bióticos, e implica la reducción del vigor y supervivencia de los árboles (Granados-Sánchez & López-Ríos, 2001; Vázquez-Silva *et al.*, 2004; Flores-Nieves *et al.*, 2011); es una de las afectaciones observadas a nivel mundial que han destruido áreas boscosas de importancia ecológica, ambiental y recreativa para la humanidad (Hernández-Tejeda & De Bauer, 1989; Alvarado & Hernández-Tejeda, 2002; Allen *et al.*, 2010; Castillo-Flores *et al.*, 2013).

Muchas especies de plantas responden rápidamente al estrés aumentando la concentración de solutos involucrados en la osmorregulación y en la protección de proteínas y membranas en condiciones de bajo potencial hídrico. Al parecer, bajo algunas tensiones, la acumulación de prolina libre es una respuesta generalizada contra algunos tipos de estrés en plantas superiores (Gzik, 1996; Moreno *et al.*, 2010). Se ha propuesto que la prolina está relacionada con la expresión de genes de tolerancia de las plantas a diferentes condiciones de estrés (Moreno *et al.*, 2010).

Éste trabajo se realizó con planta originada de rodales naturales de la Reserva de la Biósfera de la Mariposa Monarca (RBMM), puesto que es un área importante tanto ecológica como económica para los habitantes de la región, ya que representa uno de los principales ingresos de las poblaciones aledañas a la Reserva al mantener una gran cantidad de ecoturismo durante la época de hibernación de la mariposa monarca.

La investigación tuvo como propósito determinar si existen diferencias genéticas significativas entre seis procedencias de *Abies religiosa* que provienen del gradiente altitudinal de la RBMM, en plantas originadas de regeneración natural y trasplantadas a un vivero forestal comunitario, en incremento en altura de planta, incremento en diámetro basal, sobrevivencia (Capítulo I) y contenido de prolina (Capítulo II), y determinar las diferencias genéticas entre procedencias en crecimiento y adaptabilidad, para decidir que poblaciones son las mejores para utilizarse en proyectos de reforestación y asegurar una mayor sobrevivencia en campo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la variación genética de caracteres cuantitativos entre procedencias de *Abies religiosa* originadas en un gradiente altitudinal en la Reserva de la Biosfera de la Mariposa Monarca para incremento en diámetro basal, incremento en altura de planta y contenido de prolina.

Objetivos particulares

- Determinar en planta originada de regeneración natural producida en vivero, si existen diferencias genéticas significativas entre procedencias

en sobrevivencia, incremento en diámetro basal e incremento en altura de planta.

- Analizar el contenido y cantidad de prolina de cada procedencia como posible respuesta al estrés por sequía y determinar si existe un patrón clinal altitudinal.

HIPÓTESIS

Como resultado de la distribución del gradiente altitudinal de la cual provienen las procedencias estudiadas, existirán diferencias significativas en incremento en diámetro basal, incremento en altura y contenido de prolina, ya que se espera que las poblaciones de menores altitudes tengan un mayor desarrollo (tanto en diámetro basal como en altura) y mayor contenido de prolina (Como mecanismo de resistencia a la sequía).

REVISIÓN DE LITERATURA

Distribución de Abies en México

En México se localiza desde 17°30' a 21° 00' de Latitud Norte y 97° 104' a 97' 96' de Longitud Oeste. Se distribuye desde las montañas del centro y sur de México hasta el norte de Guatemala (Martínez, 1963). En altitudes que van desde 2600 hasta 3500 msnm, comprendiendo los estados de Hidalgo, Michoacán, Jalisco, México, Morelos, Guerrero, Puebla, Tlaxcala, Veracruz y el Distrito Federal (Narave & Taylor, 1997).

Descripción botánica de Abies religiosa

Árboles corpulentos, siempre verdes, resinosos, de copa simétrica y aguda, de 10 a 35 m de alto; corteza oscura, gruesa y hendida; ramillas opuestas, frecuentemente dísticas; hojas lineares, sésiles, rectas, algo coriáceas y

frecuentemente aromáticas de 11 a 30 mm de largo, 1 a 2 mm de ancho, con ápice agudo o redondeado, color verde pálido cuando seca, con 2 canales resiníferos y con brácteas sobresaliendo ligeramente a la escama ovulífera (Martínez, 1963; Narave & Taylor, 1997).

Ecología de Abies religiosa

Las comunidades de *Abies religiosa* muchas veces se encuentran restringidas en cerros, laderas, cañadas o barrancas, que ofrecen un microclima especial, en manchones aislados a menudo protegidos de la acción de vientos fuertes y de insolación intensa. Se encuentran entre los 2400 m y 3600 m, con una precipitación media anual superior a los 1000 mm y con temperaturas medias anuales entre 7 y 15°C. Su fórmula climática es Cw. Crece en suelos típicamente profundos, bien drenados, pero húmedos durante todo el año, con sustratos geológicos muy variados (Rzedowski, 1978).

Importancia ecológica de Abies religiosa

Es de alta importancia por ser uno de los ecosistemas más ricos en microflora, y por tener especies endémicas representativas como: *Alnus*, *Salix*, *Arctostaphylos*, *Crupressus*, *Juniperus*, entre otras (Rzedowski, 1978).

Importancia económica de Abies religiosa

Los árboles de *Abies* tienen gran demanda sobre todo como ornamentales como árboles de navidad. También, se obtiene resina que posee valor medicinal, y la corteza de árboles viejos es utilizada para carbón (Manzanilla, 1974; Iglesias-Andreu *et al.*, 2010). Además de que su madera, frecuentemente es preferida por la industria para la obtención de celulosa, papel (Rzedowski, 1978) y madera aserrada (Ortega, 1962; Luna, 2002). Además de usarla en trozos delgados para

techos de las casas (tejamanil) y elaboración de muebles (Narave & Taylor, 1997).

*Problemática en la restauración de bosques de *Abies religiosa**

La fragmentación de los ecosistemas ha restringido el movimiento del polen y la dispersión de las semillas, probablemente favoreciendo la endogamia. Además de que las campañas de reforestación no siempre han seleccionado semillas provenientes de ecosistemas colindantes, con lo cual han introducido fuentes genéticas de variación posiblemente no adaptadas a las condiciones locales. Por lo que, las plantaciones y cultivos de oyamel en gran medida no han sido exitosas en México, y la restauración de sus poblaciones ha estado limitada por medios artificiales a localidades con baja densidad por rodal (Nieto de Pascual-Pola *et al.*, 2003; Iglesias-Andreu *et al.*, 2010).

Ensayos de procedencias en México

Existen diferentes trabajos que se han realizado con ensayos de procedencias de diferentes especies, en donde han determinado si existen o no diferencias significativas entre ellas de acuerdo con el gradiente altitudinal del que proceden, aquí algunos ejemplos:

Benavides-Meza *et al* (2011), evaluaron la variación en el crecimiento de plántulas de ocho procedencias de *Abies religiosa* bajo condiciones de vivero. Los parámetros que evaluaron fueron diámetro en la base del tallo y altura; esto se hizo mediante la realización de mediciones que se efectuaron trimestralmente durante un período de 10 meses, llegando a la conclusión de que en general no hubo ningún patrón de crecimiento relacionado con el origen geográfico de las procedencias.

Sáenz-Romero *et al* (2012), investigaron la variación genética entre poblaciones de *Pinus pseudostrobus* a lo largo de un gradiente altitudinal en los bosques de la comunidad indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. Determinaron que existe un fuerte patrón clinal altitudinal para las variables de peso seco, en donde las plantas originadas de poblaciones de la menor altitud tuvieron mayores valores de biomasa. Las poblaciones separadas por 295 m de diferencia altitudinal son genéticamente diferentes. Por ello, se propusieron la delimitación de tres zonas altitudinales, que se pueden convertir en zonas climáticas delimitadas por temperatura media anual o grados día > 5 °C. Ellos sugieren implementar programas de migración asistida para transferir poblaciones hacia arriba (300 m de movimiento altitudinal), como una medida de adaptación de las poblaciones a los climas futuros (década centrada en el año 2030).

Soto-Correa *et al* (2012), evaluaron la variación genética de caracteres cuantitativos entre 12 poblaciones de *Lupinus elegans*, recolectadas a lo largo de un gradiente altitudinal. El ensayo se estableció a 2700 m de altitud y las plantas se dejaron crecer 10 meses. Se realizó altura y biomasa aérea de la planta, encontrando diferencias genéticas significativas en el crecimiento entre poblaciones en altura y biomasa aérea. Contrario a lo esperado, existe una asociación donde las plantas de mayores altitudes crecieron más que las de menores altitudes. Se propuso una zonificación de 150 m de intervalo altitudinal, con fines de restauración ecológica y conservación para la compensación de cambio climático.

Castellanos-Acuña *et al* (2013), realizaron un ensayo de vivero para cuantificar la variación genética, entre procedencias establecidas por rango altitudinal de la comunidad de Nuevo San Juan, Michoacán. Las especies que se usaron fueron

Pinus pseudostrobus, *P. devoniana* y *P. leiophylla*. Con base en lo anterior, llegaron a la conclusión de que la altura de la planta (tres y cinco meses de edad) fue significativamente diferente entre especies. Entre procedencias hubo diferencias significativas para *P. devoniana*, pues éste mostró un pronunciado patrón de crecimiento asociado con la altitud de origen, donde las plantas con mayor crecimiento procedían de una menor altitud. Las poblaciones de *P. leiophylla* fueron diferentes sólo a los tres meses de edad, sin un patrón altitudinal estadísticamente significativo. No se encontraron diferencias significativas entre poblaciones de *P. pseudostrobus*, al menos a la edad evaluada.

Viveros-Viveros *et al* (2013), evaluaron el patrón de variación morfológica en acículas, conos y semillas de 13 poblaciones de *Pinus patula*. Las poblaciones proceden de un gradiente altitudinal de la comunidad de Ixtlán de Juárez, Oaxaca. En este estudio, encontraron diferencias significativas inter e intrapoblacionalmente para todas las características evaluadas. Determinaron que las poblaciones de mayor altitud presentan conos más gruesos, con quillas más anchas y fascículos con vainas más largas. Sugieren realizar la delimitación preliminar de dos zonas semilleras altitudinales con una amplitud cada una de 450 m, para regular el movimiento de semillas.

Loya-Rebollar *et al* (2013), evaluaron en un ensayo de procedencias árboles *Pinus hartwegii* de 4.5 a 5.5 años, estimando variables climáticas contemporáneas y futuras (2030). Se encontraron diferencias significativas entre poblaciones para las variables de: elongación de la yema principal, altura de la plántula, diámetro basal, velocidad de elongación de la yema, peso seco de acículas, de ramas, de tallo y peso seco total. El resultado indica que el patrón de diferenciación genética entre las poblaciones está fuertemente asociado con un gradiente climático y altitudinal. Se propuso la delimitación de la zonificación climática y altitudinal, con base de 26 días de diferencia de período libre de

heladas, por lo que se establecieron 3 zonas con un ancho de 200 m de diferencia altitudinal, proponiendo que el desplazamiento de las poblaciones debe ser de 400 m altitudinales para el año de 2030, por medio de migración asistida para compensar los efectos del cambio climático para la década centrada en el año 2030.

Ruiz-Talonia *et al* (2014), realizaron una plantación en campo con plántulas de 12 procedencias de *Pinus patula* en Oaxaca, en dos sitios con alturas contrastantes dentro de la distribución natural de la especie, evaluando el crecimiento en altura a los 18, 24, y 36 meses de edad. Encontraron diferencias significativas entre procedencias y entre los sitios de plantación, determinando que existe un patrón climático y altitudinal, donde las poblaciones originadas a menores altitudes tienen un crecimiento mayor que las poblaciones originadas a mayores altitudes. Con los resultados obtenidos y con los datos de temperatura media anual, precipitación e índice de aridez, se delinearon zonas climáticas y altitudinales para el clima contemporáneo y futuro (2030), concluyendo que las poblaciones deben ser desplazadas altitudinalmente de 200 a 250 m hacia arriba, por medio de migración asistida.

Castellanos-Acuña *et al* (2014) determinaron la existencia de diferenciación morfológica, como indicador de variación genética, entre poblaciones de *Abies religiosa*, con la finalidad de delimitar una zonificación altitudinal para decidir el movimiento de semillas en los programas de reforestación el cerro de San Andrés, municipio de Ciudad Hidalgo, Michoacán, cercano a la Reserva de la Biósfera de la Mariposa Monarca. La diferenciación morfológica significativa entre poblaciones se determinó a lo largo del gradiente altitudinal, encontrando que las poblaciones de baja altitud tienen acículas más cortas y conos más largos que las poblaciones de elevada altitud. Se sugirió una zonificación altitudinal en tres zonas, cada una de 250 m de diferencia altitudinal.

Ensayos para determinar la acumulación de prolina

Vance & Zaerr (1990), encontró en acículas de *Pinus ponderosa* en condiciones de sequía, que la concentración de aminoácidos aumentó, entre ellos la prolina fue uno de los más destacados.

Diamantoglou & Rhizopoulou (1992), realizaron estudios de acumulación de prolina libre en albura, corteza y hojas en *Ceratonia siliqua* L., *Laurus nobilis* L. y *Myrtus communis* L. en diferentes estaciones del año, determinando que los valores más altos de prolina se registraron en invierno, ya que fue cuando presentaron mayor estrés y regresó a niveles más bajos después de la aparición de hojas y agujas. Mencionan que la presencia de altos niveles de prolina puede ser beneficioso para posponer la senescencia foliar y que podría actuar como un amortiguador entre el déficit de nitrógeno y la demanda de uso de recursos en el crecimiento.

Martínez & Moreno (1992), realizaron un cultivo en campo con dos variedades de papa (Yungay y Revolución), suspendiendo el riego por 10 días con posterior recuperación del riego. Encontraron que durante el período de estrés-recuperación la variedad Yungay tuvo mayor resistencia a sequía que la variedad Revolución, y esto lo determinaron con la capacidad de la variedad de acumular prolina con mayor rapidez y en mayor cantidad.

Parra-Quezada *et al.* (1999), realizaron un experimento con 10 plantas de zarzamora, en donde suspendieron el riego para ver como se modificaba el contenido de prolina, encontrando que cuando se suspendió el riego, la acumulación del aminoácido fue más del doble que en las plantas con riego.

Ortiz (2006), determinó las respuestas fisiológicas de *Pinus greggii* y *Pinus patula*, concluyendo que, en cuanto mayor era el déficit hídrico, aumentaban sus niveles de prolina, mientras que las plantas que mantuvieron con riego conservaron los niveles iniciales de dicho aminoácido.

De Diego (2012), demostró que, como consecuencia del déficit hídrico, *Pinus radiata* mostró ajuste osmótico (incremento de los niveles de prolina), favoreciendo la síntesis de osmolitos como respuesta de tolerancia a la sequía.

LITERATURA CITADA

Anderson, J. B., & Brower, L. P. (1996). Freeze-protection of overwintering monarch butterflies in Mexico: critical role of the forest as a blanket and an umbrella. *Ecological Entomology*, 21(2), 107-116.

Allen, C. D., Macalady, A. K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., ... & Gonzalez, P. (2010). A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management*, 259(4), 660-684.

Alvarado, R. D., & Hernández-Tejeda, T. (2002). Decline of sacred-fir in the Desierto de Los Leones National Park. In Fenn, M. E., De Bauer, L. I. & Hernández-Tejeda, T. (Eds.), *Urban air pollution and forests. Resources at risk in the Mexico City air basin* (pp. 243–260). New York, USA: Springer.

Benavides-Meza, H. M., Gazca Guzmán, M. O., López López, S. F., Camacho Morfín, F., Grandizo, F., Young, D., & Nepamuceno Martínez, F. (2011). Variabilidad en el crecimiento de plántulas de ocho procedencias de *Abies religiosa* (HBK) Schlecht. et Cham., en condiciones de vivero. *Madera y Bosques*, 17(3), 83-102.

Byers, B. (2004). La Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca y el papel del comportamiento de la gente en su conservación. *Resumen provisional preparado para WWF-México, Programa Mariposa Monarca*.

- Castellanos-Acuña, D., Sáenz-Romero, C., Lindig-Cisneros, R. A., Sánchez-Vargas, N. M., Lobbit, P., & Montero-Castro, J. C. (2013). Variación altitudinal entre especies y procedencias de *Pinus pseudostrobus*, *P. devoniana* y *P. leiophylla*. Ensayo de vivero. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 19(3), 399-411.
- Castellanos-Acuña, D., Lindig-Cisneros, R. A., Silva-Farias, M. Á., & Sáenz-Romero, C. (2014). Zonificación altitudinal provisional de *Abies religiosa* en un área cercana a la reserva de la biósfera de la Mariposa Monarca, Michoacán. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 20(2), 215-225.
- Castillo-Flores, J. D., López-López, M. A., López-Upton, J., Cetina-Alcalá, V. M., & Hernández-Tejeda, T. (2013). Factores de influencia en el enraizamiento de estacas de *Abies religiosa* (Kunth) Schltld. et Cham. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 19(1), 175-184.
- Flores-Nieves, P., López-López, M. Á., Ángeles-Pérez, G., de la Isla-Serrano, M. D., & Calva-Vásquez, G. (2011). Modelos para estimación y distribución de biomasa de *Abies religiosa* (Kunth) Schltld. et Cham: en proceso de declinación. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 2(8), 9-20.
- De Diego Sánchez, N. (2013). Respuesta a la sequía de *Pinus radiata* D. Don y su implicación en los procesos de tolerancia (Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco).
- Diamantoglou, S., & Rhizopoulou, S. (1992). Free Proline Accumulation in Sapwood, Bark and Leaves of Three Evergreen Sclerophylls and a Comparison with an Evergreen Conifer. *Journal of Plant Physiology*, 140(3), 361-365.
- Gitay, H., Suárez, A., Watson, R. T., & Dokken, D. J. (2002). Climate change and biodiversity. *Intergovernmental Panel on Climate Change*, Génova, IPCC, 77 p.
- Granados-Sánchez, D., & López-Ríos, G. F. (2001). Declinación forestal. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 7(1).
- Gray, P. A. (2005). Impacts of climate change on diversity in forested ecosystems: Some examples. *The Forestry Chronicle*, 81(5), 655-661.

- Gzik, A. (1996). Accumulation of proline and pattern of α -amino acids in sugar beet plants in response to osmotic, water and salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 36(1), 29-38.
- Hernández-Tejeda, T., & De Bauer, L. I. (1989). *La supervivencia vegetal ante la contaminación atmosférica*. México: Centro de Fitopatología, Colegio de Postgraduados.
- Herrera, M., Del Valle, J., & Orrego, S. (2001). Biomasa de la vegetación herbácea y leñosa pequeña y necromasa en bosques tropicales primarios y secundarios de Colombia. En *Simposio Internacional Medición y Monitoreo de la captura de Carbono en Ecosistemas Forestales*. Valdivia, Chile.
- Iglesias-Andreu, L. G., Sánchez-Velásquez, L. R., Tivo-Fernández, Y., Luna-Rodríguez, M., Flores-Estévez, N., Noa-Carrazana, J. C., ... & Moreno-Martínez, J. L. (2010). Efecto de radiaciones gamma en *Abies religiosa* (Kunth) Schltd. et Cham. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 16(1), 5-12.
- Ledig, F.T. (2004). Manejo de Recursos Genéticos Forestales. En: Vargas-Hernández, J.J., Bermejo-Velázquez, B. & Ledig, T. (eds). Manejo de Recursos Genéticos Forestales. Segunda Edición, Montecillo, México. Colegio de Postgraduados y Comisión Nacional Forestal. pp 2-20.
- Lomolino, M. V., Riddle, B. R., & Brown, J. H. (2005). Biogeography. Tercera Edición. *Sinauer Associates*. Sunderland, MA, USA. 868 p.
- Loya-Rebollar, E., Sáenz-Romero, C., Lindig-Cisneros, R. A., Lobit, P., Villegas-Moreno, J. A., & Sánchez-Vargas, N. M. (2013). Clinal variation in *Pinus hartwegii* populations and its application for adaptation to climate change. *Silvae Genetica*, 62(1-6), 86-95.
- Luna, M. V. E. (2002). *Inducción de respuestas morfogenéticas en Abies religiosa (Kunth) Schltdl & Cham. Y A. hickelii Flous y Gausen de la región del Cofre de Perote Veracruz* (Tesis. Maestría en Ecología Forestal. Instituto de Genética Forestal. Universidad Veracruzana. Xalapa, Ver. México).

- Manzanilla, H. (1974). Investigaciones Epidométricas y Silvícolas en Bosques Mexicanos de *Abies religiosa*. Dirección General de Información y Relaciones Públicas de la SAG. México, D. F.
- Martínez, M. (1963). Las pináceas mexicanas. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 400 pp., 1969. *Las plantas medicinales de México*, 15-16.
- Martínez, C. A., & Moreno, U. (1992). Expresiones fisiológicas de resistencia a la sequía en dos variedades de papa sometidas a estrés hídrico en condiciones de campo. *Bras. Fisiol. Veg*, 4(1), 33-38.
- Maslin, M. (2004). Ecological versus climatic thresholds. *Science*, 306(5705), 2197-2198.
- Moreno, L., Crespo, S., Pérez, W., & Melgarejo, L. M. (2010). Pruebas bioquímicas como herramientas para estudios en fisiología. *Experimentos en Fisiología Vegetal*, 187-248.
- Narave, F.H.V. & Taylor, K. (1997). Pinaceae. En: Flora de Veracruz. Instituto de ecología, A.C. Xalapa Ver.
- Nienstaedt, H. (1990). Importancia de la variación natural. En: Memoria del Curso de Mejoramiento Genético y Plantaciones Forestales. Centro de Genética Forestal, A.C. Lomas de San Juan, Chapingo, México. pp: 16-23.
- Nieto de Pascual Pola, C., Musálem, M. Á., & Ortega Alcalá, J. (2003). Estudio de algunas características de conos y semillas de *Abies religiosa* (hbk) schl. et cham. *Agrociencia*, 37(5).
- Oberhauser, K., & Peterson, A. T. (2003). Modeling current and future potential wintering distributions of eastern North American monarch butterflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 14063-14068.
- Ortega, J. H. (1962). Propiedades físicas y mecánicas de la madera de *Abies religiosa* (HBK) Schl. et Cham. y *Pinus hartwegii* Lindl. *Escuela Nacional de Agricultura: Chapingo, México*.

- Ortíz, O. M. (2006). Respuestas fisiológicas y bioquímicas de dos especies de pinos en condiciones limitantes de humedad. Tesis Licenciatura. Instituto de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo).
- Saradhi, P. P., AliaArora, S., & Prasad, K. V. S. K. (1995). Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV-induced peroxidation. *Biochemical and biophysical research communications*, 209(1), 1-5.
- Parra Quezada, R. A., Rodríguez Ontiveros, J. L., & González Hernández, V. A. (1999). Transpiración, potencial hídrico y prolina en zarzamora bajo déficit hídrico. *Terra Latinoamericana*, 17(2).
- Pearson, R. G., & Dawson, T. P. (2003). Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimate envelope models useful?. *Global Ecology and Biogeography*, 12(5), 361-371.
- Pérez Miranda, R., Moreno Sánchez, F., González Hernández, A., & Arriola Padilla, V. J. (2014). Distribución de *Abies religiosa* (Kunth) Schlttdl. et Cham. y *Pinus montezumae* Lamb. ante el cambio climático. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 5(25), 18-33.
- Rosenzweig, C., Casassa, G., Karoly, D. J., Imeson, A., Liu, C., Menzel A., A., Rawlins, S., Root, T. L., Seguin, B., & Tryjanowski, P. (2007). Assessment of observed changes and responses in natural and managed systems. In: Parry, M. L., Canziani, O. F., Palutikof, J. P., van der Linden, P. J., & Hanson, C. E. (eds.). *Climate Change: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp. 79-131.
- Ruiz-Talonia, L. F., Sánchez-Vargas, N. M., Bayuelo-Jiménez, J. S., Lara-Cabrera, S. I., & Sáenz-Romero, C. (2014). Altitudinal genetic variation among native *Pinus patula* provenances: performance in two locations, seed zone delineation and adaptation to climate change. *Silvae Genetica*, 63(1-6), 139-148.
- Rzedowski, J. (1978). *Vegetación de México* Limusa. México D.F: 432 p.

- Sáenz-Romero, C., Rehfeldt, G. E., Soto-Correa, J. C., Aguilar-Aguilar, S., Zamarripa-Morales, V., & López-Upton, J. (2012). Altitudinal genetic variation among *Pinus pseudostrobus* populations from Michoacán, México. Two location shadehouse test results. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(2): 111-120.
- Soto-Correa, J. C., Sáenz-Romero, C., Lindig-Cisneros, R., Sánchez-Vargas, N., & Cruz-de-León, J. (2012). Variación genética entre procedencias de *Lupinus elegans* Kunth, zonificación altitudinal y migración asistida. *Agrociencia*, 46(6), 593-608.
- Vance, N. C., & Zaerr, J. B. (1990). Analysis by high-performance liquid chromatography of free amino acids extracted from needles of drought-stressed and shaded *Pinus ponderosa* seedlings. *Physiologia Plantarum*, 79(1), 23-30.
- Vázquez-Silva, L., Tamarit-Urias, J. C., Quintanar-Olguín, J., & Varela-Fregoso, L. (2004). Caracterización de la declinación de bosques de encinos en Sierra de Lobos Guanajuato, México. *Polibotánica*, (17).
- Viveros-Viveros, H., Sáenz-Romero, C., López-Upton, J., & Vargas-Hernández, J. J. (2005). Variación genética altitudinal en el crecimiento de plantas de *Pinus pseudostrobus* Lindl. en campo. *Agrociencia*, 39(5): 575-587.
- Viveros-Viveros, H., Camarillo-Luna, A. R., Sáenz-Romero, C., & Aparicio-Rentería, A. (2013). Variación altitudinal en caracteres morfológicos de *Pinus patula* en el estado de Oaxaca (México) y su uso en la zonificación. *Bosque (Valdivia)*, 34(2), 173-179.

CAPÍTULO I. VARIACIÓN GENÉTICA DE CARACTERES CUANTITATIVOS (INCREMENTO EN DIÁMETRO BASAL Y EN ALTURA DE PLANTA Y SOBREVIVENCIA) ENTRE PROCEDENCIAS DE *Abies religiosa*

RESUMEN

Para determinar la existencia de variación genética y un posible patrón clinal altitudinal entre 6 procedencias de *Abies religiosa*, se colectaron plántulas de la regeneración natural de la especie dentro de la Reserva de la Biósfera de la Mariposa Monarca. Las plántulas se recolectaron desde los 2960 a los 3450 msnm, con intervalos de aproximadamente 100 m de diferencia altitudinal. Las plantas fueron trasplantadas a envase de bolsa de vivero con tierra de monte, y crecidas por dos años en un vivero comunitario a 3000 msnm en el Ejido La Mesa, San José del Rincón, Edo. de México. Las plantas se acomodaron bajo un diseño experimental de bloques completos al azar, en seis bloques con las seis procedencias distribuidas al azar en parcelas de 36 individuos (acomodadas en tres hileras de 12 plantas cada una de la misma procedencia). Los caracteres adaptativos evaluados fueron: incremento en altura de planta, incremento en diámetro basal y porcentaje de sobrevivencia por procedencia. Se obtuvieron diferencias significativas solamente para incremento en diámetro basal ($P = <.0001$). Para incremento en altura fue casi significativo ($P = 0.0603$). El porcentaje de sobrevivencia promedio entre todas las procedencias fue de 75%, lo que indica la viabilidad del rescate de planta de regeneración natural. El patrón altitudinal encontrado para incremento en altura de planta y en diámetro basal fue muy similar, siendo las plantas originadas de poblaciones de las mayores altitudes las que tuvieron un mejor crecimiento, lo cual fue contrario a lo esperado. Para porcentaje de sobrevivencia, se encontró que los extremos altitudinales fueron los que tuvieron la mejor sobrevivencia al final del experimento.

Palabras clave: *Abies religiosa*, variación genética, incremento en altura de planta, incremento en diámetro basal, porcentaje de sobrevivencia.

CHAPTER I. GENETIC VARIATION OF QUANTITATIVE TRAITS (INCREASE IN BASIC DIAMETER AND IN PLANT HEIGHT AND SURVIVAL) AMONG PROVENANCES OF *Abies religiosa*

ABSTRACT

To determine the existence of genetic variation and a possible altitudinal clinal pattern among 6 provenances of *Abies religiosa*, seedlings of the natural regeneration of the species were collected within the Monarca Butterfly Biosphere Reserve. Seedlings were harvested from 2960 to 3450 m above sea level, at intervals of approximately 100 m of altitude difference. The seedlings were transplanted to forestry bags with soil from the forest, and grown for two years in a community nursery at 3000 masl in Ejido La Mesa, San José del Rincón, Edo. from Mexico. The seedlings were accommodated under a randomized complete block experimental design in six blocks with the six provenances randomly distributed in plots of 36 individuals (accommodated in three rows of 12 plants each from the same source). The adaptive traits evaluated were: increase in plant height, increase in basal diameter and percentage of survival. Significant differences were obtained only for increase in basal diameter ($P = <10001$). For increase in height it was nearly significant ($P = 0.0603$). The among all provenances average survival was 75%, indicating the viability of natural regeneration plant rescue. The altitudinal pattern found for increase in plant height and basal diameter was very similar, being the plants originated from populations of the higher altitudes that had better growth, which was contrary to what was expected. For percent survival, it was found that the altitudinal extremes were the ones that had the best survival at the end of the experiment.

Key words: *Abies religiosa*, genetic variation, increase in plant height, increase in basal diameter, percentage of survival.

INTRODUCCIÓN

Las comunidades presentan variaciones en su composición y estructura a lo largo de gradientes altitudinales (Camero, 2007), ya que cada especie responde de diferente manera a las condiciones ambientales (Billings, 1974; Sánchez-Velásquez *et al.*, 1995). La diferenciación ocurre en diferentes variables como tasa de crecimiento, alargamiento de la yema apical y resistencia a heladas (Campbell, 1979; Rehfeldt, 1983¹, 1983², 1988, 1989, 1991; Sáenz-Romero, 2004).

Los niveles de variación genética dentro de especies y poblaciones constituyen aspectos que interesan en el manejo de recursos genéticos, pues la variación sirve como materia prima de la evolución y está relacionada con la habilidad de las poblaciones para adaptarse a cambios ambientales (Fisher, 1930; Furnier, 2004).

Para determinar la variación genética, los ensayos de procedencias son muy útiles, ya que permiten cultivar en un mismo ambiente individuos de distintas procedencias, dejando que se expresen las diferencias en el crecimiento debida al control genético (Zobel & Talbert, 1988; White *et al.*, 2007; Soto-Correa *et al.*, 2012).

En las especies de coníferas, como en otras, existe un factor importante a tomar en cuenta, que es el factor de depredación de semillas por herbívoros, los cuales provocan la pérdida de 55% de germoplasma que se produce (McNaughton & Wolf, 1973; Nieto De Pascual-Pola, 2013). En *Abies religiosa*, la depredación por herbívoros y aves es relativamente baja (Nieto De Pascual-Pola, 2013). Manzanilla (1974), concluyó que la capa de musgo es la responsable de la poca

regeneración natural, pues actúa como una barrera que impide a la radícula llegar al suelo y anclarse al mismo. Por lo mencionado anteriormente, es de gran importancia prestarle mayor atención a la regeneración natural, puesto que podemos obtener plantas de buena calidad, que pronto morirán a causa de la desecación del musgo durante la temporada de sequía posterior a la germinación. Dichas plantas servirían para realizar ensayos de procedencias, ya que en muchas ocasiones es difícil ingresar a los bosques a realizar colecta de semilla en un área protegida, tal es el caso de *Abies religiosa* en la RBMM.

La variación morfológica de una especie puede indicar plasticidad fenotípica como un mecanismo para la adaptación de la misma ante la heterogeneidad del medio, que se expresa en caracteres relacionados con la adecuación y la evolución bajo condiciones ambientales particulares (Franiel & Wieski, 2005; Chevin *et al.*, 2010; Viveros-Viveros *et al.*, 2013).

Con frecuencia, las poblaciones de coníferas ubicadas a menor altitud tienen un mayor potencial de crecimiento, es decir, están genéticamente condicionadas a aprovechar al máximo las condiciones favorables de temperaturas que se encuentran a bajas altitudes, por lo que crecen más, pero son menos resistentes a heladas. Por el contrario, las poblaciones de mayor altitud están adaptadas para tener un menor crecimiento, para escapar a posibles daños ocasionados por las bajas temperaturas que ocurren en invierno, que son más comunes a elevadas altitudes (Rehfeldt, 1988; Sáenz-Romero, 2011). Es de esperarse que la altitud sea una variable de gran importancia en la diferenciación genética entre poblaciones de coníferas, ya que en el país éstas se distribuyen especialmente en las principales cadenas montañosas (Sáenz-Romero, 2004).

MATERIALES Y MÉTODOS

La plántula usada en este trabajo fue extraída de regeneración natural recientemente emergida, a lo largo de un gradiente altitudinal ubicado dentro de La Reserva de la Biósfera de la Mariposa Monarca. Dicho gradiente tuvo seis sitios de colecta aproximadamente a 100 m de diferencia altitudinal, a los 2960, 3052, 3157, 3239, 3350 y 3450 msnm.

Las plántulas colectadas provienen de la regeneración natural de *Abies religiosa* (Figura 1), germinadas *in situ* a finales del invierno de 2014 e inicios de primavera 2015, colectadas entre la última semana de octubre y la primera semana de noviembre de 2015.

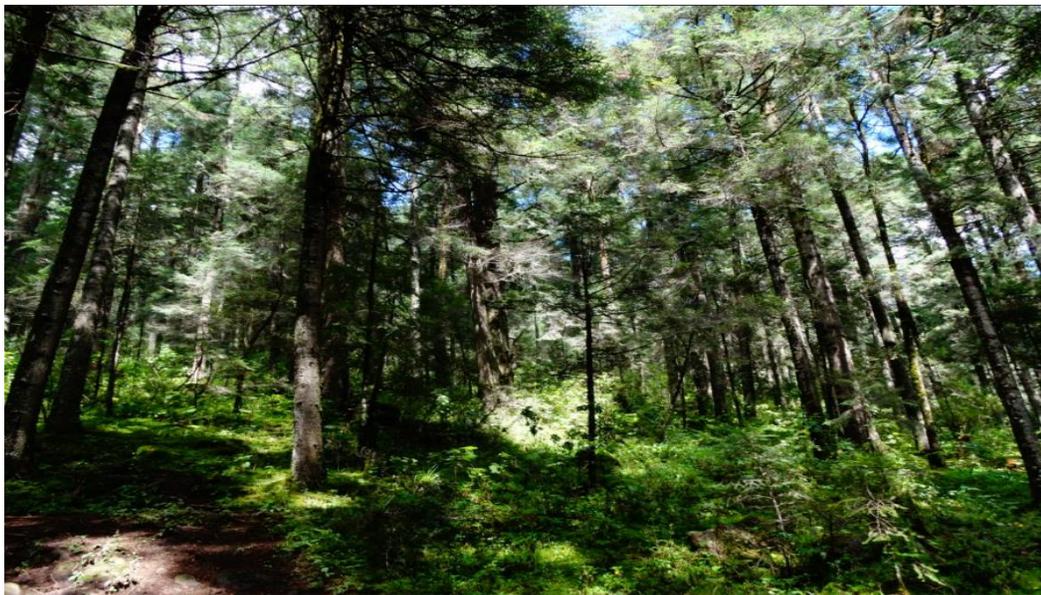


Figura 1. Ejemplo de sitio de colecta de plántulas de la regeneración natural de *Abies religiosa* dentro del gradiente altitudinal de la RBMM.

Las plántulas seleccionadas se encontraron en sitios donde prevalece el musgo, ya que son sitios que guardan mucha humedad durante la época en la que se establece la regeneración natural de *Abies religiosa* (Figuras 2 y 3).



Figuras 2 y 3. Regeneración natural de *Abies religiosa* en sitios predominantemente húmedos (con abundante musgo), de donde se extrajeron plántulas recién emergidas para su trasplante a vivero.

El método de colecta se realizó mediante una búsqueda dentro de cada sección altitudinal escogiendo las plántulas de la siguiente manera (Figuras 4 y 5):

- Aún con la semilla de la cual germinaron.
- Con presencia de hojas cotiledonares (sin hojas primarias), a modo de asegurar que la plántula es de la época de germinación anteriormente mencionada; es decir, de reciente germinación en condiciones naturales de campo.
- Con tallo delgado y rosado.
- Vigorosas.
- Altura menor a 5 cm.



Figuras 4 y 5. Ejemplos de plántulas seleccionadas de regeneración natural de *Abies religiosa* para su trasplante a vivero.

Se llamará procedencia a los sitios de origen donde se colectó la plántula, y población al conjunto de individuos de una procedencia representados en el experimento por las muestras.

El ensayo de procedencias se estableció en un sitio abierto, con coordenadas 19° 35' 18.21" Latitud Norte, -100° 10' 46.08" Longitud Oeste, pendiente cenital, exposición NE, a una altitud de 2998 msnm (por simplicidad, nos referimos a esta altitud como de 3000 m), en el ejido La Mesa, perteneciente al Municipio San José del Rincón en el Estado de México (Figura 6).



Figura 6. Ubicación del vivero comunitario en ejido La Mesa, San José del Rincón, Edo. de México.

El sitio de establecimiento del vivero es en la casa de un ejidatario participante, Sr. Francisco Ramírez Cruz, muy cercano al sitio de origen de la población número seis (2960 msnm). En el lugar se eliminó la maleza y se cubrió con una casa de malla sombra al 50%, para evitar la depredación por animales, así como evitar la desecación de las plantas por la exposición excesiva directa al sol, vientos fuertes y daños por granizo (Figura 7).



Figura 7. A) Sitio de establecimiento de vivero comunitario en el ejido La Mesa, San José del Rincón, Edo. de México. B) Casa de malla sombra al 50%.

Las plántulas se transplantaron (inmediatamente después de su colecta) a envases de bolsa de polietileno para vivero de 8 x 7 x 17 cm, con tierra de monte como sustrato (Figura 8). Entre el campo y el vivero, se trasladaron en recipientes con la tierra adherida de manera natural a la raíz y las raíces se cubrieron con una capa adicional de tierra de monte del lugar.



Figura 8. A) Plántula lista para trasplantar. B) Llenado de bolsa de polietileno (envase) con tierra de monte (sustrato). C) Envase listo para trasplante. D) Trasplante de plántulas de regeneración natural de *Abies religiosa*.

El diseño experimental del ensayo fue de seis bloques completos al azar, con 200 plántulas por cada una de las seis procedencias, distribuidas al azar dentro de los bloques en parcelas continuas de 36 plántulas, éstas dispuestas en tres hileras de 12 individuos, excepto el bloque número seis, en el cual sólo hubo 20 plántulas por procedencia. En los extremos de las camas de vivero se colocaron plántulas sobrantes para evitar efecto de borde.

Los 6 bloques se ubicaron en tres camas (dos bloques por cama) para facilitar con pasillos accesibles el trabajo de mediciones (Figura 9 y 10).



Figura 9 y 10. Vivero comunitario establecido en ejido La Mesa, San José del Rincón, Estado de México.

Las procedencias fueron distinguidas con cucharas de colores insertadas en el sustrato de cada planta (Cuadro 1, Figura 11); las plantas individualmente fueron identificadas con números del 1 al 200, definidas de acuerdo con los siguientes rangos altitudinales:

Cuadro 1. Procedencias de plántulas de diferentes altitudes diferenciadas por colores.

Procedencia / color*	Altitud (msnm)**
1 verde	3450
2 morado	3350
3 rojo	3239
4 rosa	3157
5 anaranjado	3052
6 blanco	2960

*Los colores de la tabla representan el color de las cucharas que distinguieron cada procedencia en vivero.

**La altitud representada en el cuadro, es la media del intervalo altitudinal de donde fueron extraídas las plántulas (aproximadamente ± 20 m de diferencia altitudinal a partir de la media).



Figura 11. Vivero comunitario establecido en ejido La Mesa, San José del Rincón, Estado de México a 18 meses del inicio del experimento.

Los parámetros evaluados fueron incremento en altura, tomada desde la base de la plántula a la punta de la yema principal (mm), e incremento en diámetro basal (0.1 mm) tomado en la base del tallo (Figura 12). Las mediciones se efectuaron bimestral y semestralmente, respectivamente, durante un período de 18 meses, así como el porcentaje de sobrevivencia por procedencia.



Figura 12. A) Medición de altura de planta. B) Medición de diámetro basal.

Las variables altura de planta y diámetro basal, expresadas como incremento (medición final menos medición inicial), fueron analizadas mediante el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, versión 9.0), con el procedimiento Proc GLM, usando el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + P_j + B_i * P_j + E_{ijk}$$

En donde:

Y_{ijk} = observación del k -ésimo individuo en el j -ésima procedencia en el i -ésimo bloque; μ = media general; B_i = efecto del i -ésimo bloque; P_j = efecto de la j -ésima procedencia; $B_i * P_j$ es la interacción del i -ésimo bloque con la j -ésima procedencia; E_{ijk} = error experimental.

Todos los factores se consideraron efectos aleatorios.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las variables evaluadas, se derivaron de la medición bimestral (para incremento en altura) y semestral (incremento en diámetro basal), así como de la modelación de una curva de sobrevivencia final para todas las procedencias seleccionadas.

Incremento en altura de planta

La altura es un carácter que se estima para observar el potencial genético de las poblaciones y, por lo tanto, la diferencia genética entre poblaciones (Viveros-Viveros *et al.*, 2009; Sáenz-Romero, 2011; Benavides-Meza *et al.*, 2011; Sáenz-Romero *et al.*, 2012; Soto-Correa *et al.*, 2012; Castellanos-Acuña *et al.*, 2013; Loya-Rebollar *et al.*, 2013). El incremento en altura de la planta representa el valor de la última medición realizada durante el experimento, restando la primera medición realizada, para expresar el crecimiento acumulado (incremento), durante la estancia de las plantas en vivero; esto es particularmente importante en nuestro caso, para excluir el error inducido por el crecimiento que la planta tenía previo a su trasplante al vivero.

Mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) se determinó que no existen diferencias significativas entre procedencias para la variable incremento en altura (Cuadro 2). Esto fue un resultado inesperado, ya que en trabajos comparables como los de Benavides-Meza *et al.*, 2011, Castellanos-Acuña *et al.*, 2013 y Ruiz-Talonia *et al.*, 2014, sí se encuentran diferencias significativas entre procedencias a temprana edad. En el primer caso, se evaluaron 8 procedencias de *Abies religiosa* durante un año y, a pesar de tener diferencias significativas, no se encontró un patrón clinal altitudinal, longitudinal o latitudinal. En el segundo y tercer caso, tomando en cuenta que las especies que usaron son de crecimiento más rápido que *Abies religiosa*, como son *Pinus devoniana*, *P. leiophylla* y *P. pseudostrobus*, y *Pinus patula*, respectivamente, se encontraron diferencias

significativas entre procedencias, además demostraron que existe un patrón clinal altitudinal marcado.

Cuadro 2. Análisis de varianza para la variable diferencia entre altura final (a 18 meses de establecimiento en vivero), e inicial (primera medición tomada una vez las plantas establecidas en vivero) de 6 procedencias de *Abies religiosa* de la RBMM.

Fuente de variación	G.L.	Cuadrado Medio	P-valor
Bloque	5	4309.5	0.4398
Procedencia	5	10235.0	0.0603
Bloque*Procedencia	25	4413.9	<0.0001
Error	722	1777.6	

Con un valor crítico de $\alpha = 0.05$ no existen diferencias significativas entre procedencias para la variable incremento en altura, aunque se acerca mucho con $P = 0.0603$. En la interacción bloque*procedencia sí se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$).

Teniendo presente que no hay diferencias significativas entre procedencias, con la finalidad únicamente de explorar la tendencia de los datos expresada por las medias por procedencia, se realizó una regresión lineal y una cuadrática entre las medias por procedencia y su altitud de origen. Se observa claramente que las procedencias de los extremos altitudinales tienen un mayor crecimiento que las procedencias que provienen de la parte media del gradiente altitudinal, destacando que la población proveniente de 3350 msnm fue la que tuvo el mayor incremento en altura de todas (Figura 13). Esto es contrario a lo encontrado por Castellanos-Acuña *et al.*, 2013 y Ruiz-Talonia *et al.*, 2014, quienes determinaron que las procedencias de menores altitudes presentan mayor crecimiento que las de altitudes más elevadas, debido a que las poblaciones de mayores altitudes, al estar más expuestas a heladas, limitan su crecimiento para evadir el daño por

heladas (Sáenz-Romero & Tapia-Olivares, 2008), por lo que se considera como una estrategia de adaptación (Vitasse *et al.*, 2009).

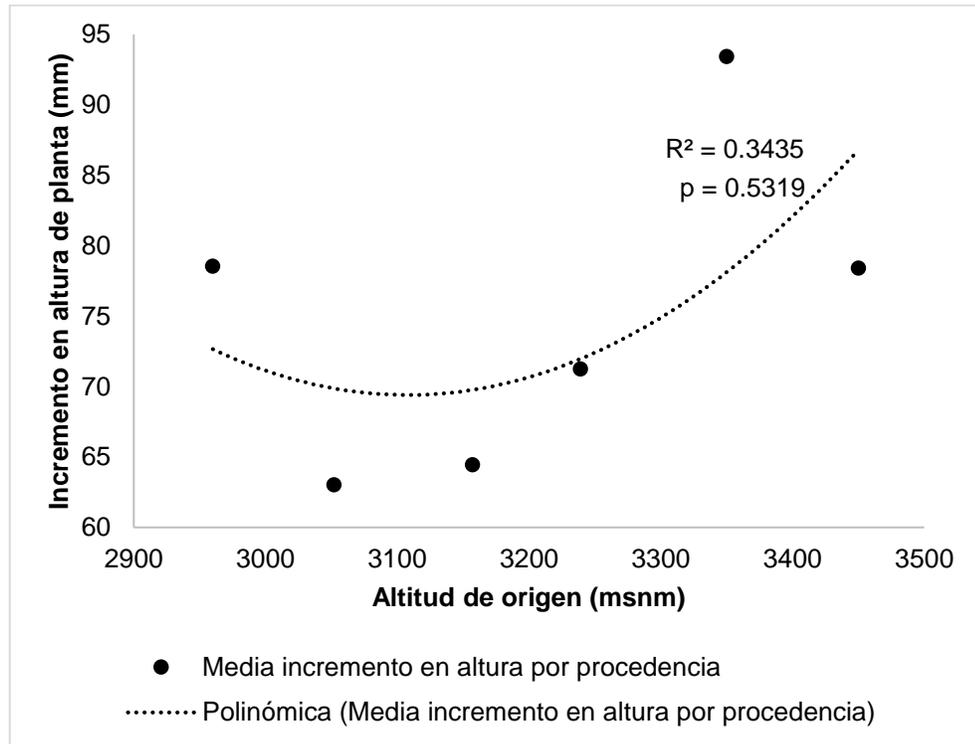


Figura 13. Regresión cuadrática de medias de incremento en altura por procedencia (altitud de origen).

Un análisis más detallado de las medias por procedencia por bloque revela un patrón difícil de interpretar (Cuadro 3; Figura 14). Las plántulas del bloque 4 fueron las que obtuvieron la media general de mayor incremento en altura, seguidas del bloque 3, 2, 6, 1 y 5. Las procedencias tuvieron un crecimiento desigual en varios de los bloques. Es posible que los factores microambientales de variación dentro de la casa de sombra, como mayor resolana o mayor viento lateral en algunos bloques, pudieran haber influido. El cuidado del vivero fue excelente, por lo que un riego desigual sería improbable. Se considera que para tener una respuesta clara habría sido necesario un año adicional de crecimiento.

Es preciso recordar que el vivero comunitario estaba a 3000 m de altitud, por lo que las temperaturas son bajas y por tanto el crecimiento lento.

Cuadro 3. Medias por bloque a 18 meses de establecimiento en vivero de 6 procedencias de *Abies religiosa* de la RBMM. Los bloques están ordenados de mayor a menor promedio de crecimiento.

Bloque	Media incremento en altura
4	79.75
3	78.73
2	76.32
6	76.01
1	73.20
5	63.36

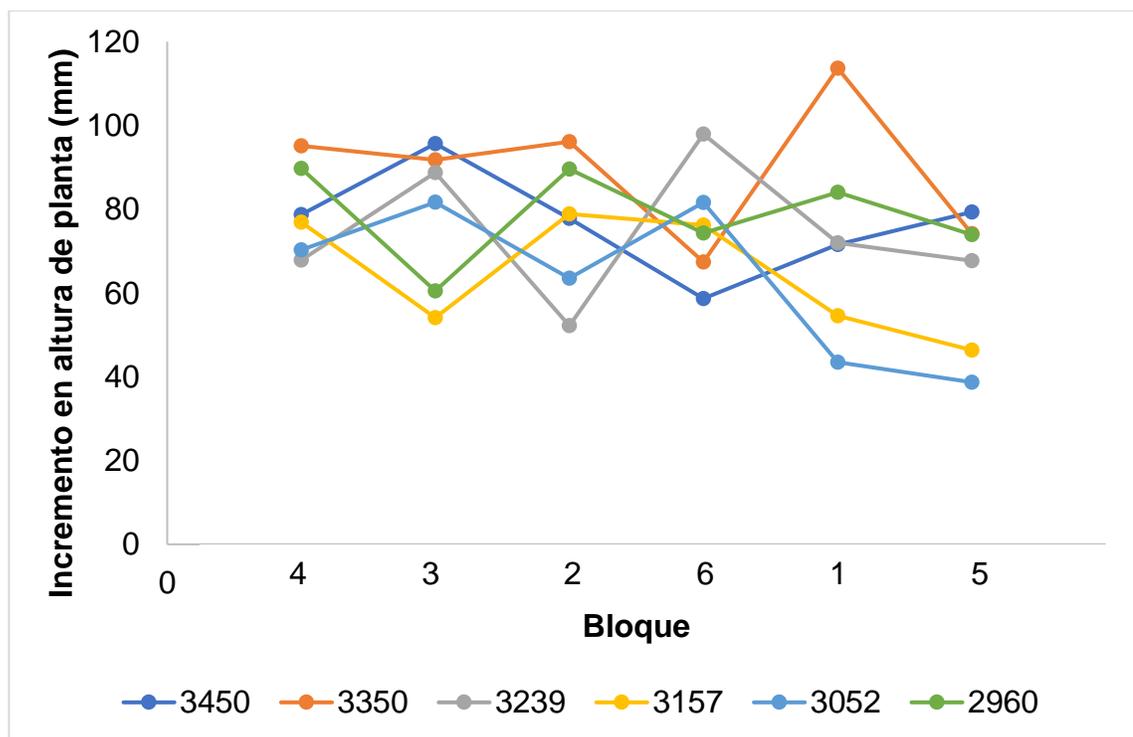


Figura 14. Medias por procedencia de incremento en altura por bloque. Los bloques están ordenados de mayor a menor por la media de bloque.

Incremento en diámetro basal

Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas para la variable incremento en diámetro basal, encontrando que sí las hay (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de varianza para la variable diferencia entre diámetro basal final (a 18 meses de establecimiento en vivero), e inicial (primera medición tomada una vez las plantas establecidas en vivero) de 6 procedencias de *Abies religiosa* de la RBMM.

Fuente de variación	G.L.	Cuadrado Medio	P-valor
Bloque	5	80.4	0.5981
Procedencia	5	891.3	<0.0001
Bloque*Procedencia	25	110.3	0.0002
Error	722	45.9	

Aunque sí se encontraron diferencias significativas para incremento en diámetro basal entre procedencias, el patrón clinal altitudinal es inverso a lo encontrado por autores como: Viveros-Viveros *et al.*, 2005 y Loya-rebollar *et al.*, 2013, quienes demostraron que las poblaciones de menores altitudes son las que tienen mayores diámetros basales que las poblaciones de mayores altitudes.

Realizando una regresión cuadrática se demostró que el patrón clinal altitudinal que existe es debido a que las procedencias de menores altitudes tienen un menor crecimiento en diámetro basal, que las de mayores altitudes (Figura 15). Esto probablemente se deba a que al haber menor cantidad de días fríos en el vivero con la protección de la malla-sombra, las plantas de mayores altitudes no tuvieron la respuesta fisiológica que normalmente deberían tener, es decir, cesar su crecimiento con mayor anticipación que las originadas a bajas altitudes.

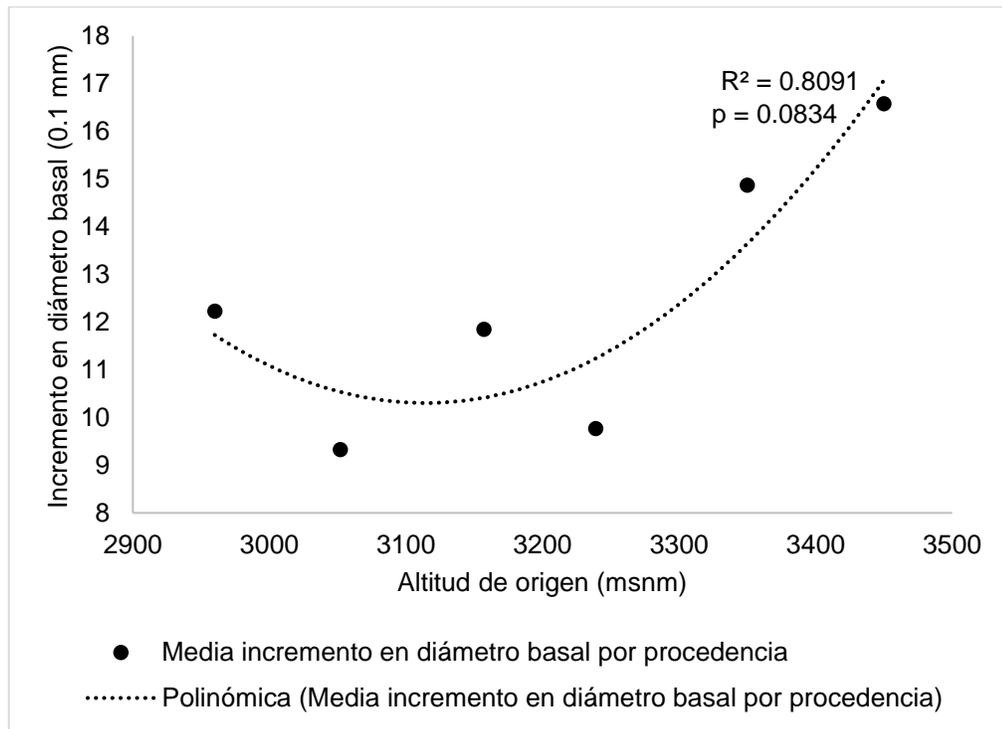


Figura 15. Regresión cuadrática de medias de incremento en diámetro basal por procedencia (altitud de origen).

Sobrevivencia de planta

La sobrevivencia de planta rescatada de la regeneración natural de *Abies religiosa* es algo que casi no se hace comúnmente, y podría ser una alternativa complementaria a la producción usual. Normalmente la producción de planta en vivero se realiza mediante la colecta de semilla y su posterior germinación en almácigo; esto implica grandes costos y riesgos, por la necesidad de escalar árboles, que en la RBMM son de gran altura (hasta 40 m), y *A. religiosa* comúnmente tiene sus conos sólo en la punta de la copa.

Para este trabajo se realizó la colecta de planta de regeneración natural, y se observó que, aunque sí existe mortalidad en vivero, la sobrevivencia es muy alta

(Figura 16), llegando a ser de 75% en promedio entre procedencias, aproximadamente a los 18 meses de su establecimiento en vivero.

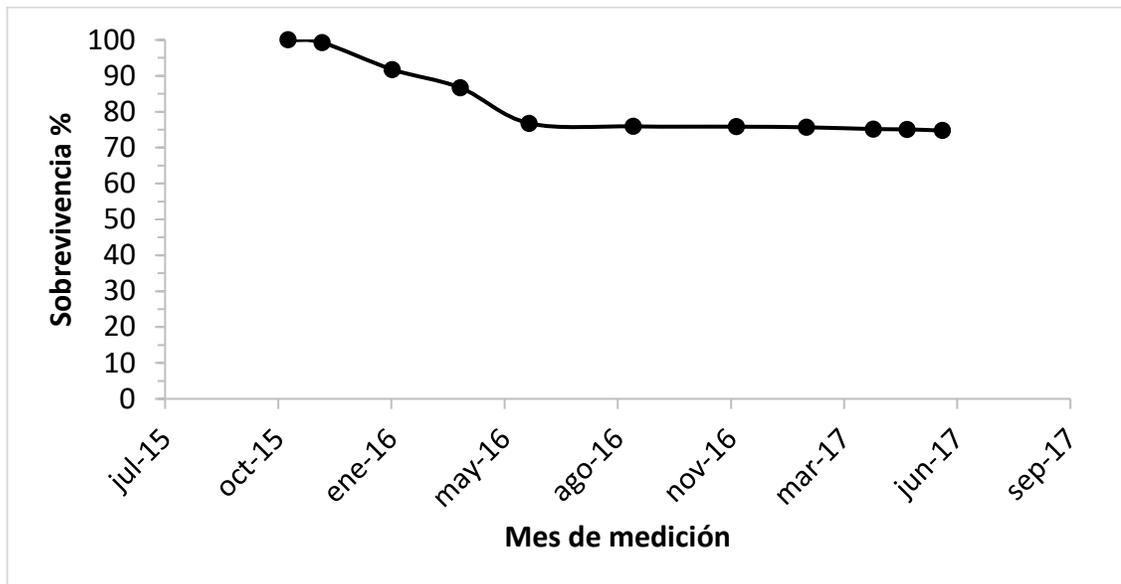


Figura 16. Índice de sobrevivencia total de planta rescatada de regeneración natural de *Abies religiosa* de RBMM por mes de medición.

De igual forma, se realizó un análisis del porcentaje de sobrevivencia para cada procedencia (Cuadro 5, Figura 17), observando que la procedencia con mayor sobrevivencia es la de mayor altitud (3350 msnm), seguida de la de más baja altitud (2960 msnm). Las procedencias que obtuvieron el porcentaje de menor sobrevivencia son las de las dos altitudes seguidas de la más baja, es decir, las de 3052 y 3157 msnm, respectivamente.

Cuadro 5. Análisis del porcentaje de sobrevivencia de planta de *Abies religiosa* (a 18 meses de establecimiento en vivero), por procedencia (Altitud de origen).

Altitud	% de sobrevivencia
3450	90.5
3350	79.5
3239	69.0
3157	62.5
3052	63.5
2960	83.5

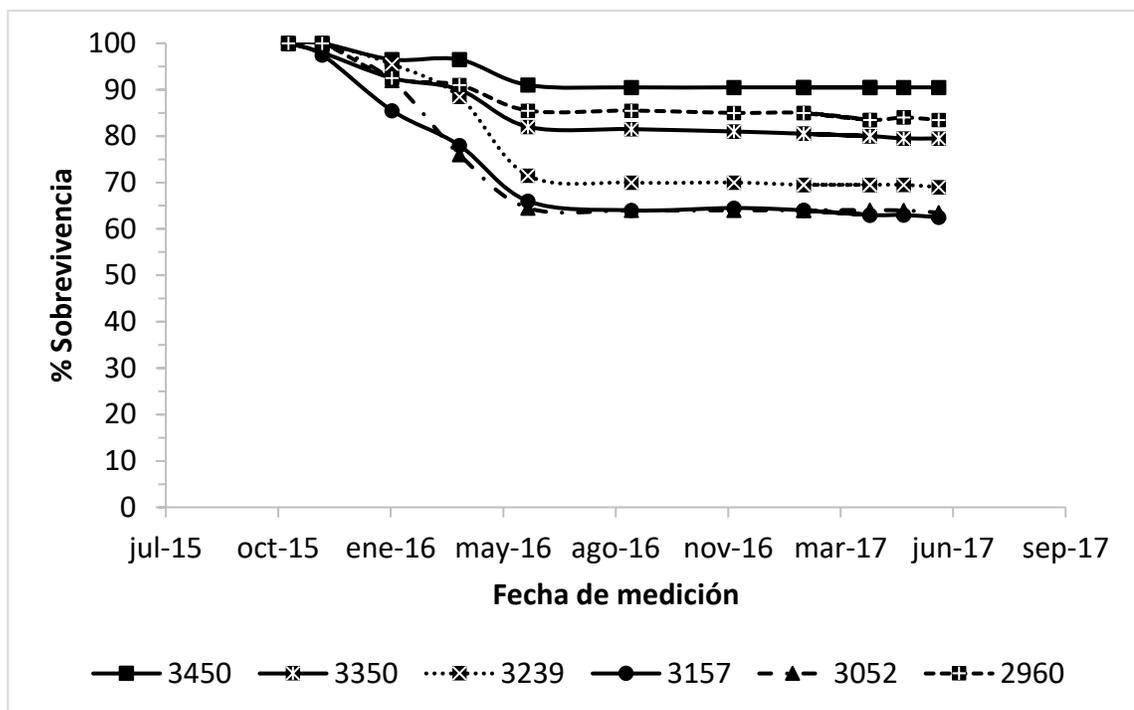


Figura 17. Porcentaje de sobrevivencia (por procedencia) de planta rescatada de regeneración natural de *Abies religiosa* de RBMM por fecha de medición.

CONCLUSIONES

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre procedencias de *Abies religiosa* para incremento en diámetro basal, en donde las poblaciones de mayores altitudes tuvieron el mayor incremento. Las poblaciones de mejor crecimiento fueron originadas a mayor altitud; esto es un patrón altitudinal contrario a lo reportado por otros autores. Incremento en altura de planta no tuvo diferencias significativas entre poblaciones ($P = 0.0603$), aunque sí una tendencia similar a la de incremento en diámetro basal.

Para sobrevivencia de plantas, se observó que las que tienen mayor capacidad de adaptación en vivero, fueron las poblaciones de los extremos altitudinales, principalmente las de mayores altitudes. Con un porcentaje de sobrevivencia promedio entre procedencias de 75%, podemos decir que el rescate de planta de regeneración natural para su posterior crecimiento en vivero es viable, recomendando indagar más sobre esta práctica, para evitar mayores gastos en la colecta de semilla directamente del árbol.

AGRADECIMIENTOS

Al Sr. Francisco Ramírez Cruz y esposa por permitir el establecimiento del vivero comunitario en su casa, así como por realizar el mantenimiento del mismo. A los Doctores Cuauhtémoc Sáenz Romero y José Arnulfo Blanco García por estar siempre al tanto de lo requerido para llevar a cabo el experimento. A los colegas biólogos Aglaen Lucero Carbajal Navarro, Gerardo Guzmán Aguilar, Jorge Herrera Franco, Nancy Izquierdo Calderón y otros participantes en la colecta y medición de campo.

LITERATURA CITADA

- Benavides-Meza, H. M., Gazca Guzmán, M. O., López López, S. F., Camacho Morfín, F., Grandizo, F., Young, D., & Nepamuceno Martínez, F. (2011). Variabilidad en el crecimiento de plántulas de ocho procedencias de *Abies religiosa* (HBK) Schlecht. et Cham., en condiciones de vivero. *Madera y Bosques*, 17(3), 83-102.
- Billings, W. D. (1974). Environmental: concept and reality. In: Strain, B. R. y W. D. Billings (eds.). *Vegetation and environment. Handbook of vegetation science. Part. VI.* Junk. The Hague. pp 9-35.
- Camero, É. (2007). Comunidad de mariposas diurnas (Lepidoptera: Rhopalocera) en un gradiente altitudinal del cañón del río Combeimatolima, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 12(2), 95-110.
- Campbell, R.K. (1979). Genecology of Douglas-fir in a watershed in the Oregon Cascades. *Ecology* 60(5):1036-1050.
- Castellanos-Acuña, D., Sáenz-Romero, C., Lindig-Cisneros, R. A., Sánchez-Vargas, N. M., Lobbit, P., & Montero-Castro, J. C. (2013). Variación altitudinal entre especies y procedencias de *Pinus pseudostrobus*, *P. devoniana* y *P. leiophylla*. Ensayo de vivero. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 19(3), 399-411.
- Chevin L. M, Lande, R. & Mace, G. M. (2010). Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: towards a predictive theory. *PLoS Biology* 8(4): 1-8.
- Fisher, R. A. (1930). *The genetical theory of natural selection.* Clarendon Press, Oxford. 272 p.
- Franiel, I. & Wieski, K. (2005). Leaf features of silver birch (*Betula pendula* Roth). Variability within and between two populations (uncontaminated vs Pb-contaminated and Zn-contaminated site). *Trees* 19: 81-88.
- Furnier, G. R., (2004). Métodos para medir variación genética en plantas. En: Vargas-Hernández, J.J., Bermejo-Velázquez, B. & Ledig, T. (eds). *Manejo de*

Recursos Genéticos Forestales. Segunda Edición, Montecillo, México. Colegio de Postgraduados y Comisión Nacional Forestal. pp 72-87.

Loya-Rebollar, E., Sáenz-Romero, C., Lindig-Cisneros, R. A., Lobit, P., Villegas-Moreno, J. A., & Sánchez-Vargas, N. M. (2013). Clinal variation in *Pinus hartwegii* populations and its application for adaptation to climate change. *Silvae Genetica*, 62(1-6), 86-95.

Manzanilla, H. (1974). Investigaciones epidométricas y silvícolas en bosques mexicanos de *Abies religiosa*.

McNaughton, S. J., & Wolf, L. L. (1973). General Ecology. Holt, Rinehart and Winston, Inc. New York, NY USA. pp. 511-548.

Nieto de Pascual Pola, C. (2013). Depredación de las semillas de *Abies religiosa* (Kunth) Schlttdl. et Cham. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 4(15), 87-102.

Rehfeldt, G. E. (1983¹). Seed Transfer guidelines for Douglas-fir in western Montana. Research Note INT-329. Intermountain Forest and Range Experiment Station, Forest Service, USDA, USA. 4 p.

Rehfeldt, G. E. (1983²). Seed Transfer guidelines for Douglas-fir in Central Idaho. Research Note INT-337. Intermountain Forest and Range Experiment Station, Forest Service, USDA, USA. 4 p.

Rehfeldt, G. E. (1988). Ecological genetics of *Pinus contorta* from the Rocky Mountains (USA): a synthesis. *Silvae Genetica*. 37(3-4):131-135.

Rehfeldt, G. E. (1989). Ecological adaptations in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *glauca*): a synthesis. *For. Ecol. Manage.* 28:203-215.

Rehfeldt, G.E. (1991). A model of genetic variation for *Pinus ponderosa* in the Inland Northwest (USA): applications in gene resource management. *Can. J. For. Res.* 21:1491-1500.

Ruiz-Talonia, L. F., Sánchez-Vargas, N. M., Bayuelo-Jiménez, J. S., Lara-Cabrera, S. I., & Sáenz-Romero, C. (2014). Altitudinal genetic variation

among native *Pinus patula* provenances: performance in two locations, seed zone delineation and adaptation to climate change. *Silvae Genetica*, 63(1-6), 139-148.

Sáenz-Romero, C. (2004). Zonificación estatal y altitudinal para la colecta y movimiento de semillas de coníferas en México. En: Vargas-Hernández, J.J., Bermejo-Velázquez, B. y Ledig, T. (eds). Manejo de Recursos Genéticos Forestales. Segunda Edición, Montecillo, México. Colegio de Postgraduados y Comisión Nacional Forestal. pp 72-87.

Saenz-Romero, C., & Tapia-Olivares, B. L. (2008). Genetic variation in frost Damage and seed zone delineation within an altitudinal transect of *Pinus devoniana* (*P. michoacana*) in Mexico. *Silvae Genetica*, 57(3), 165.

Sáenz-Romero, C. (2011). Guía para mover altitudinalmente semillas y plantas de *Pinus oocarpa*, *P. devoniana* (= *P. michoacana*), *P. pseudostrobus*, *P. patula* y *P. hartwegii* para restauración ecológica, conservación, plantaciones comerciales, y adaptación al cambio climático. Versión 4.0. Fondo Mixto CONACyT_Michoacán y COFOM.

Sáenz-Romero, C., Rehfeldt, G. E., Soto-Correa, J. C., Aguilar-Aguilar, S., Zamarripa-Morales, V., & López-Upton, J. (2012). Altitudinal genetic variation among *Pinus pseudostrobus* populations from Michoacán, México. Two location shadehouse test results. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(2).

Sánchez-Velásquez, L. R., Pineda-López, M. D. R., & Hernández-Martínez, A. (1995). Distribución y estructura de la población de *Abies religiosa* (HBK) Schl. Et Cham., en el Cofre de Perote, Estado de Veracruz, México. *Acta Botánica Mexicana*, (16), 45-55.

Soto-Correa, J. C., Sáenz-Romero, C., Lindig-Cisneros, R., Sánchez-Vargas, N., & Cruz-de-León, J. (2012). Variación genética entre procedencias de *Lupinus elegans* Kunth, zonificación altitudinal y migración asistida. *Agrociencia*, 46(6), 593-608.

Vitasse, Y., Delzon, S., Bresson, C. C., Michalet, R., & Kremer, A. (2009). Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden. *Canadian Journal of Forest Research*, 39(7), 1259-1269.

- Viveros-Viveros, H., Sáenz-Romero, C., López-Upton, J., & Vargas-Hernández, J. J. (2005). Variación genética altitudinal en el crecimiento de plantas de *Pinus pseudostrobus* Lindl. en campo. *Agrociencia*, 39(5).
- Viveros-Viveros, H., Saenz-Romero, C., Vargas-Hernández, J. J., López-Upton, J., Ramírez-Valverde, G., & Santacruz-Varela, A. (2009). Altitudinal genetic variation in *Pinus hartwegii* Lindl. I: Height growth, shoot phenology, and frost damage in seedlings. *Forest Ecology and Management*, 257(3), 836-842.
- Viveros-Viveros, H., Camarillo-Luna, A. R., Sáenz-Romero, C., & Aparicio-Rentería, A. (2013). Variación altitudinal en caracteres morfológicos de *Pinus patula* en el estado de Oaxaca (México) y su uso en la zonificación. *Bosque (Valdivia)*, 34(2), 173-179.
- White, T. L., Adams, W. T., & Neale, D. B. (2007). *Forest Genetics*. CABI Publishing, Oxfordshire, UK.
- Zobel, B. & Talbert, J. (1988). *Técnicas de Mejoramiento Genético de Árboles Forestales*. Limusa. México, D. F. 545 p.

CAPÍTULO II. EVALUACIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE PROLINA PRESENTE EN PLANTAS DE UN GRADIENTE ALTITUDINAL DE *Abies religiosa*

RESUMEN

Para establecer las diferencias entre procedencias y tratamientos mediante la determinación del contenido de prolina (sustancia que provee de resistencia al estrés por sequía) y su patrón clinal altitudinal, se realizó un ensayo de 144 plantas de 6 procedencias de *Abies religiosa* provenientes de la regeneración natural en un gradiente altitudinal dentro de la Reserva de la Biósfera de la Mariposa Monarca (desde los 2960 a los 3450 msnm). El ensayo fue establecido en una casa sombra en el Instituto de Investigaciones de Ecosistemas y Sustentabilidad, UNAM campus Morelia, Michoacán, donde 72 plantas fueron expuestas a tratamiento de riego y las otras 72 a tratamiento de sequía, en un diseño de bloques completos al azar, dispuestas en 5 bloques con parcelas de 5 plántulas de distintas procedencias, intercalando las parcelas con los tratamientos (riego y sin riego).

No se obtuvieron diferencias significativas entre procedencias para la concentración de prolina ($P = 0.3182$), pero sí entre tratamientos de riego/no riego ($P = 0.0080$). Las plantas produjeron aproximadamente el doble del aminoácido estudiado en el tratamiento de sequía, confirmando que responden con cambios metabólicos para enfrentar el estrés por sequía.

Si bien no existieron diferencias estadísticamente significativas entre procedencias, el patrón altitudinal encontrado indica que las poblaciones de mayores altitudes tuvieron una mayor producción de prolina que las de más bajas altitudes, siendo una respuesta inesperada. Esto podría deberse a que los mecanismos de resistencia a daño por heladas son fisiológicamente similares a los de resistencia a sequía.

Palabras clave: *Abies religiosa*, sequía, contenido de prolina, gradiente altitudinal.

CHAPTER II. EVALUATION OF PROLINE CONCENTRATION ON SEEDLINGS OF AN ALTITUDINAL GRADIENT OF *Abies religiosa*

ABSTRACT

In order to establish the differences between provenances and treatments by determining the content of proline (substance that provides resistance to drought stress) and its altitudinal clinal pattern, a trial was carried out on 144 plants from 6 sources of *Abies religiosa* from natural regeneration on an altitudinal gradient within the Monarch Butterfly Biosphere Reserve (from 2960 to 3450 m). The trial was set up in a shade house at the Instituto de Investigaciones de Ecosistemas y Sustentabilidad, UNAM Morelia campus, Michoacán, where 72 plants were exposed to irrigation treatment and the other 72 to drought treatment, in a randomized complete block design, arranged in 5 blocks with plots of 5 seedlings of different origins, intercalating the plots with the treatments (irrigation and without irrigation).

There were no significant differences between provenances for proline concentration ($P = 0.3182$), but there were between treatments ($P = 0.0080$). The seedlings produced approximately twice the amino acid studied in the drought treatment, confirming that they respond with metabolic changes to cope with drought stress.

Although there were no statistically significant differences between provenances, the altitudinal pattern found indicates that populations at higher altitudes had a higher production of proline than those at lower altitudes, an unexpected response. This may be due to the mechanisms of resistance to frost damage being physiologically similar to those of resistance to drought.

Key words: *Abies religiosa*, drought, proline content, altitudinal gradient.

INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de agua para las plantas se reducirá durante el siglo XXI debido al aumento de evapotranspiración como resultado del incremento de temperatura (IPCC, 2001; Valladares *et al.*, 2004). Por lo que muchos ecosistemas dependerán del ritmo en que se produzcan los cambios climáticos y de la velocidad de adaptación de las especies (Klein *et al.*, 2011). El déficit hídrico afecta a todos los aspectos del crecimiento de las plantas, modificando la anatomía, la morfología, la fisiología y la bioquímica (Kramer & Koslowski, 1979; Covarrubias-Robles, 2007). Estas respuestas o mecanismos para evitar o prevenir el estrés por sequía, han sido denominados estrategias y son características de cada especie (Larcher, 1995; Valladares *et al.*, 2004).

Una teoría sobre la acumulación de prolina (un aminoácido), indica que ocurre como un mecanismo de compensación para la mejor sobrevivencia de las plantas durante el periodo de estrés. El aminoácido actúa como un regulador osmótico (Aspinall & Paleg, 1981; Martínez, 1992), en plantas sometidas a tensiones hiperosmóticas causadas por la sequía y la salinidad, que son los factores más importantes que limitan el crecimiento de las plantas y la productividad de los cultivos (Delauney & Verma, 1993). Las plantas en condiciones de estrés son susceptibles de incurrir a una sobreexpresión de las enzimas clave en la biosíntesis de osmolitos, como la prolina y otros aminoácidos, las poliaminas y los compuestos cuaternarios de amonio como la glicina betaina, la sacarosa, los polioles, los azúcares-alcoholes y otros oligosacáridos (Tamura *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2009).

Al parecer, la prolina es el osmolito que se encuentra más ampliamente distribuido de forma acumulada en condiciones de estrés no sólo en plantas sino también en eubacterias, protozoos, invertebrados marinos y algas (McCue &

Hanson 1990; Delauney & Verma, 1993; Yoshida *et al.*, 1997; Verbruggen & Hermans, 2008). Siendo un importante soluto osmoprotector del citoplasma, que provee estabilidad a los coloides (Hernández-Acosta *et al.*, 1999). Los osmolitos son compuestos que tienen una función importante en el ajuste osmótico y protegen a las células de las especies reactivas de oxígeno (Smirnoff & Cumbes., 1989; Saradhi *et al.*, 1995; Hong *et al.*, 2000; Mohanty & Matysik, 2001; Pinheiro *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2009; Ábrahám *et al.*, 2010). Se ha sugerido que la prolina puede actuar no sólo como osmolito, sino como reserva de energía, poder reductor, fuente de nitrógeno y protector frente a radicales hidroxilo (Andrade *et al.*, 1995; Nolte *et al.*, 1997; Hare & Cress, 1997; Parra-Quezada *et al.*, 1999; Hernández-Acosta *et al.*, 1999). Además, como es un compuesto soluble puede moverse a través de las vías del agua, es decir, por medio del xilema y floema (Diamantoglou & Rhizopoulou, 1992).

Los efectos de la manipulación genética de la síntesis de prolina pueden ser específicos de especies de plantas (Verbruggen & Hermans, 2008).

Existe algo a lo que se le llama “límite xérico”, y es aquel en donde las especies se encuentran en el límite de sus posibilidades de adaptación a condiciones cálidas y/o de sequía. Usualmente es el límite altitudinal inferior o el límite sur en el Hemisferio Norte. Aparentemente, debido al cambio climático, este límite, se está desplazando hacia el norte y hacia mayor altitud, matando árboles gradualmente, principalmente los árboles debilitados (Mátyás, 2010). Este fenómeno no ha sido tratado con la importancia que merece. Por contrario, desde hace varios años, los bosques de la Reserva de la Biósfera de la Mariposa Monarca han sido sometidos a diversas presiones, tales como: la conversión de bosques a tierras de cultivo y tala clandestina (Merino & Hernández, 2004). Razón de más para conservar y proteger el bosque de *Abies religiosa*, pues con

el tiempo los ejidos aledaños pueden verse afectados con pérdidas sociales y económicas.

El límite xérico tiene grandes consecuencias ecológicas y evolutivas que requieren un enfoque transdisciplinario, priorizando estudios sobre cómo los ecosistemas forestales responden a estrés ambiental extremo y sus mecanismos de persistencia (como es el incremento en la producción de prolina). Las poblaciones que están cerca de los límites xéricos deben conservarse, pues son las que muy posiblemente están mejor adaptadas al estrés hídrico y, por tanto, son genéticamente más valiosas (Mátyás, 2010). Debido a la limitación de los recursos, como el agua se crea una respuesta competitiva entre las especies, condicionada por sus adaptaciones fisiológicas que repercute en la estructura y estabilidad de la comunidad (Sánchez-Mejía *et al.*, 2007).

En el presente trabajo se exploró cuantificar la cantidad de prolina en un ensayo de procedencias obtenidas a lo largo de un gradiente altitudinal de *Abies religiosa*, con y sin estrés hídrico, a fin de determinar si existen diferencias genéticas entre procedencias para el contenido de prolina bajo condiciones normales y bajo estrés por sequía. La hipótesis es que las procedencias originadas a baja altitud podrían ser más resistentes a sequía debido a una mayor capacidad de producción de prolina bajo estrés hídrico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las plántulas utilizadas para cuantificar el contenido de prolina fueron obtenidas del ensayo de procedencias de *Abies religiosa* del ejido La Mesa, San José del Rincón, Edo. de México (ver Materiales y métodos del Capítulo I de esta tesis). Dichas plántulas se obtuvieron mediante el “rescate” de plántula de la regeneración natural de *Abies religiosa* en un gradiente altitudinal dentro de la

Reserva de la Biósfera de la Mariposa Monarca. Dado que en el ensayo existen 6 procedencias representadas en 6 bloques, fueron seleccionadas 4 plántulas al azar por procedencia por bloque, es decir, de cada procedencia se obtuvieron 24 plántulas en total. Las plántulas tenían aproximadamente año y medio de edad y estaban creciendo en bolsa de vivero con tierra de monte como sustrato. Posteriormente fueron trasladadas a una casa sombra (malla-sombra del 50%), en el Instituto de Investigaciones de Ecosistemas y Sustentabilidad, UNAM campus Morelia. Las plantas fueron colocadas en 5 bloques completos al azar, con seis hileras de 5 plántulas cada una. Dentro de cada hilera (o parcela grande), cada planta pertenecía a una procedencia distinta, elegidas al azar de entre las 6 procedencias. Las hileras fueron de cinco y no de seis procedencias, debido a limitaciones de los soportes de los envases. Las plantas que representaban a las procedencias se ubicaron al azar dentro de la hilera. A las parcelas se les asignó de manera intercalada los tratamientos de riego y sequía. Es decir, cada bloque tenía 3 hileras de planta bajo riego y 3 hileras bajo sequía (Figura 18). El tratamiento de sin riego consistió en la suspensión de riego, una vez que las plantas (todas) habían tenido riego normal por un mes, para facilitar la adaptación a la casa de sombra y permitir que las plantas se recuperaran de su transporte desde el ejido La Mesa a la UNAM Morelia.



Figura 18. Experimento con plantas de *Abies religiosa* de la RBMM, con tratamiento de riego y sin riego para determinación del contenido de prolina.

Para poder hacer una comparación del contenido de prolina antes y después de aplicado el tratamiento de sequía, se colectaron 2 acículas por planta el 30 de mayo de 2017 (Figura 19 A), las cuales fueron pesadas y resguardadas en un Ultracongelador (Thermo Scientific) (Figura 19 B y C).

Posteriormente, al mes de haber sido aplicado el tratamiento de sin riego (29 de junio de 2017), se colectaron otras 2 acículas por plántula, al igual que las primeras, fueron pesadas en una báscula de precisión (Sartorius) para poder calcular la concentración de prolina de acuerdo con un peso específico y, posteriormente, se colocaron en un Ultracongelador (Thermo Scientific) durante una semana, para facilitar el trabajo de maceración.



Figura 19. A) Ejemplo de colecta de acículas de *Abies religiosa* por planta. B) Pesaje de plantas de *Abies religiosa* de la RBMM en báscula de precisión (Sartorius). C) Ultracongelador (Thermo Scientific).

A continuación, basándose en la metodología de Bates *et al.* (1973), pero haciendo modificaciones al método, para la determinación de la concentración de prolina libre en reacción con la ninhidrina, se siguieron los siguientes pasos:

- Preparación de Ácido de Ninhidrina (Figura 20), mediante la colocación 1.25 gr de ninhidrina por cada 30 ml de ácido acético glacial y 20 ml de 6 M ácido fosfórico (en este trabajo se preparó una solución de 6.25 gr : 150 ml : 100 ml, respectivamente), con agitación hasta disolver, manteniendo la solución en fresco (en hielo a 4°C).

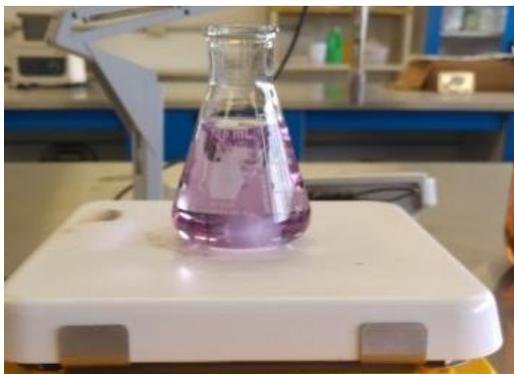


Figura 20. Preparación de ácido de ninhidrina con agitación.

- El siguiente paso fue macerar las acículas de cada plántula con 2 ml de ácido sulfosalicílico al 3% y colocar la mezcla en un tubo de ensayo (Figura 20 A).
- Se agregaron 1 ml de ácido de ninhidrina y 1 ml de ácido acético glacial (Figura 21 B).
- Posteriormente, las muestras (ya en tubos de ensayo con sus respectivas soluciones), se colocaron a baño María a 100°C por una hora, terminando la reacción en un baño de hielo (Figura 21 C y D).

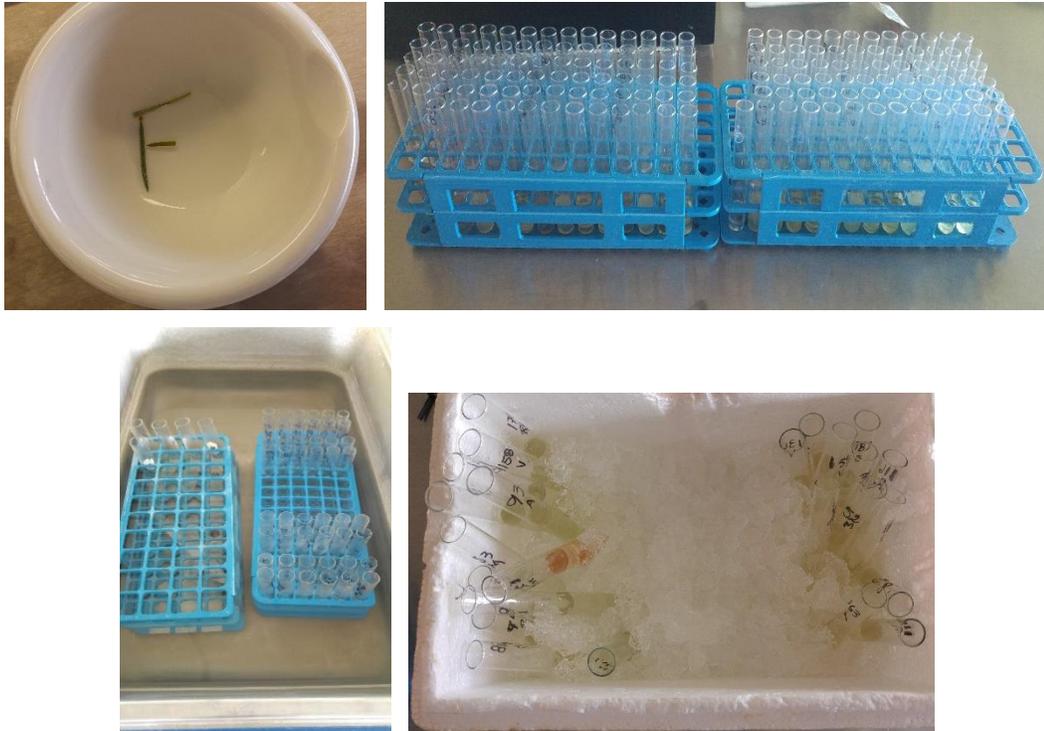


Figura 21. A) Muestra de acículas en ácido sulfosalicílico al 3% lista para macerar. B) Muestras procesadas con ácido de ninhidrina y ácido acético glacial. C) Muestras puestas a baño María. D) Muestras en baño de hielo.

- La mezcla obtenida se pasó a un embudo de separación, en donde fue extraída con 2 ml de tolueno, agitando vigorosamente para homogeneizar la muestra (Figura 22 A).
- El excedente de muestra fue regresado al tubo de ensayo, y la extracción requerida se pasó a una celda (recipiente de vidrio que se usa para realizar lecturas en espectrofotómetro), para centrifugar la mezcla a 250 r/s por 5 minutos (Figura 22 B), de esta forma se aceleró la sedimentación del exceso de tejido vegetal y se evitó la interferencia del mismo en la lectura realizada por el espectrofotómetro (Thermo Scientific).
- Por último, con el espectrofotómetro (Thermo Scientific) se realizó la lectura con una absorbancia de 520 nm (Figura 22 C), usando tolueno como blanco.



Figura 22. A) Muestra en embudo de separación. B) Centrifugado de muestras. C) Lectura de absorbancia con espectrofotómetro a 520 nm.

La concentración de prolina es determinada mediante una curva de calibración, la cual es la representación gráfica de una señal que se mide en función de la concentración de un analito (Dosal y Villanueva, 2008). Se realizó mediante la preparación de 5 tubos de ensayo con distintas concentraciones conocidas de prolina (Cuadro 6).

Cuadro 6. Reactivos usados para curva de calibración para determinar el contenido de prolina en seis procedencias de *Abies religiosa*.

Tubo de ensayo	Prolina (ml)	Agua destilada (ml)	Ácido de ninhidrina (ml)	Ácido acético glacial (ml)
1	2.0	0	2	2
2	1.5	0.5	2	2
3	1.0	1.0	2	2
4	0.5	1.5	2	2
5	0	2.0	2	2

Los tubos que contienen la curva de calibración (Figura 23) se obtuvieron mediante el procedimiento anteriormente descrito, pero con una concentración de 0.001 g de prolina por 10 ml de agua destilada en vez de muestra de tejido (modificación a Bates *et al.*, 1973, donde se usó 0.1 gr de prolina).

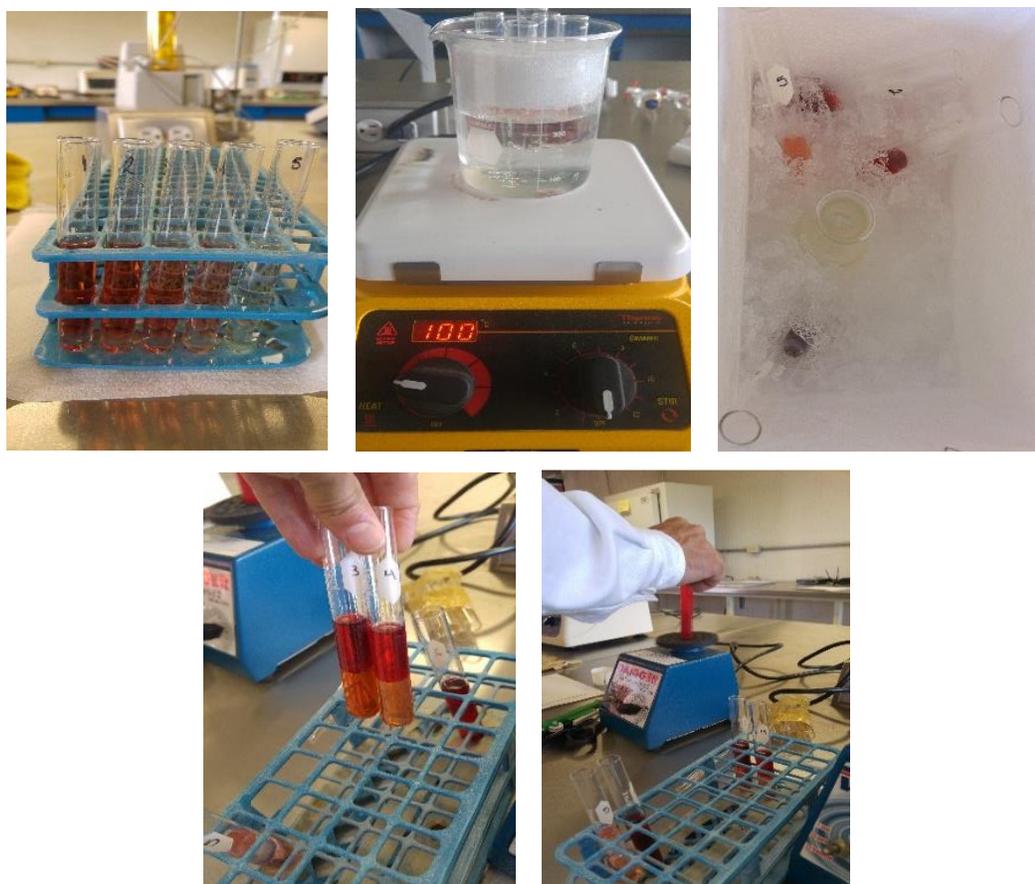


Figura 23. A) Tubos para curva de calibración B) Tubos en baño María. C) Baño de hielo para terminar reacción. D) Extracción con tolueno. E) Agitación para mezclar la solución de prolina con el tolueno.

La curva se realizó a través de un modelo de línea recta, que consiste en encontrar la recta que mejor ajuste al calibrado de una serie de datos, donde la variable independiente está representada por la concentración de prolina conocida y la variable dependiente por la lectura en nm (nanómetros) obtenida del espectrofotómetro (Cuadro 7). La recta está definida por una ordenada al origen y una pendiente, mediante la ecuación $y = mx + b$. Para determinar el ajuste del modelo que relaciona la concentración conocida con la lectura del espectrofotómetro, se calcula el valor de R^2 y su significancia (Figura 24).

Cuadro 7. Absorbancias de curva de calibración tomadas por espectrofotómetro a 520 nm.

Tubo de ensayo	mg/ml de prolina	Abs
1	0.100	0.489
2	0.075	0.429
3	0.050	0.314
4	0.025	0.138
5	0.000	0.008

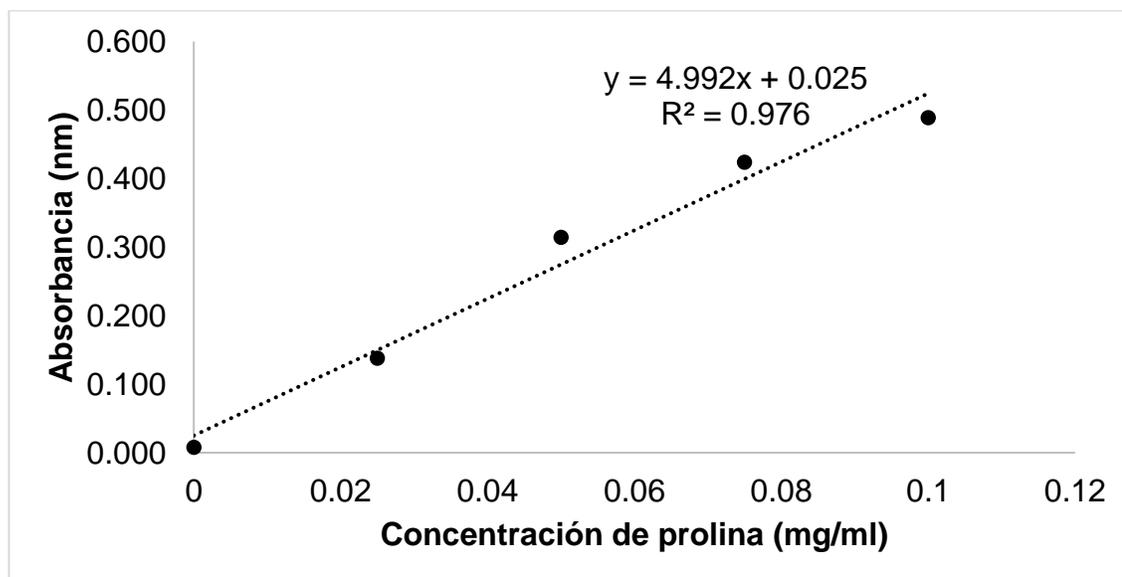


Figura 24. Curva de calibración para determinar contenido de prolina mg/ml.

Para determinar el contenido de prolina por gramo de tejido, se hacen diversos cálculos que se describen a continuación:

- Teniendo las absorbancias y los resultados de la ecuación $y = mx + b$, se procede a sacar la concentración de prolina con la siguiente fórmula:

$$[P] = \frac{Abs - b}{m}$$

Donde:

[P]: Concentración de prolina

b : ordenada al origen

Abs: Absorbancia en nm

m : pendiente

Que se obtuvo mediante el despeje de la variable x , que para nosotros es la concentración de prolina.

- Posteriormente, el resultado de la ecuación anterior se multiplicó por 2, debido a que se utilizaron 2 ml de tolueno para extraer el material que se usará para determinar la absorbancia de cada una de las muestras.
- El resultado de multiplicar por 2 se divide entre los gramos de tejido de cada muestra para poder obtener la concentración en mg/gr.
- Con las mediciones de los dos meses evaluados, se sacó una diferencia del mes de junio menos la del mes de mayo, para ver el cambio en el contenido de prolina a través del tiempo cuando las plantas ya estaban en tratamiento (riego y sin riego).

- Los resultados fueron evaluados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA), con la ayuda del programa SAS (Statistical Analysis System 9.0), con el procedimiento Proc GLM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prolina es un mecanismo de respuesta metabólico de las plantas (ajuste osmótico), que consiste en incremento de su concentración bajo condiciones de estrés por sequía; esto permite que el potencial de turgencia al interior de las células sea alto, permitiendo que la apertura de estomas, expansión foliar, transpiración y fotosíntesis se mantengan en funcionamiento por más tiempo (Lakaso, 1979; Parra-Quezada *et al.*, 1999). En este trabajo, se confirma que la prolina aumenta en condiciones de estrés por sequía, obteniendo diferencias significativas entre tratamientos: media bajo tratamiento de riego: 4.3 mg prolina/gr de tejido; sin riego: 7.7 mg/gr ($P = 0.0080$; Cuadro 8). Este resultado concuerda con el de otros autores que han encontrado un incremento de la producción de prolina en especies de coníferas bajo estrés por sequía, como *Pinus ponderosa* (Vance & Zaerr, 1990), *P. radiata* (De Diego, 2012), *P. greggii* y *P. patula* (Ortiz, 2006).

Cuadro 8. Análisis de varianza para determinar el contenido de prolina entre 6 procedencias de *Abies religiosa* de la RBMM.

Fuente de variación	G.L.	Cuadrado Medio	P-valor
Tratamiento	1	324.2	0.0080
Procedencia	5	28.3	0.3182
Tratamiento*Procedencia	5	18.1	0.7753
Error	101	36.2	

Se puede observar que el aumento de prolina en las plantas (todas las procedencias), como respuesta al tratamiento, fue aproximadamente del doble que en las plantas de riego (Figura 25). Aunque se esperaba que la lectura del tratamiento de riego fuera cercana a 0, se observa que presenta contenidos de prolina de 2.5 a casi 6 mg/gr de tejido. Esto podría deberse a las altas temperaturas durante el período en que fue realizado el ensayo (mayo y junio). Es decir, probablemente presentaron estrés en su potencial hídrico, a pesar de ser regadas.

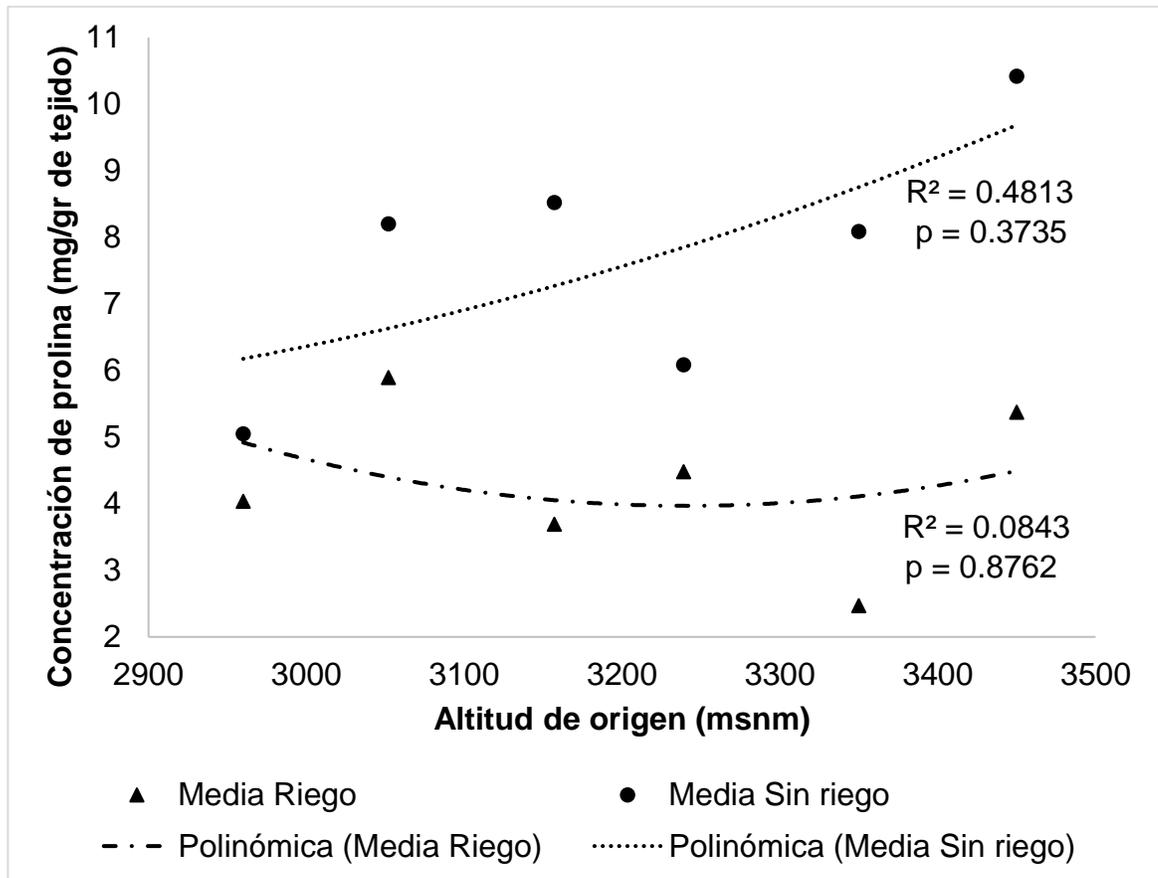


Figura 25. Medias, regresión cuadrática y valor de p, para el contenido de prolina en seis procedencias de *Abies religiosa* (los datos fueron obtenidos de la diferencia del mes de junio menos el mes de mayo).

No obstante, a pesar de que existe una respuesta metabólica de las plantas a la suspensión del riego, no se pudo demostrar que existieran diferencias entre procedencias (Figura 25), por lo que se sugiere realizar experimentos similares, pero con un mayor tiempo de tratamiento y/o con mayor tamaño de muestra. Esto para confirmar si el tiempo es el factor que determina la variación genética para el aminoácido estudiado, o si existe alguna otra respuesta que favorezca el patrón genético de la especie. Delauney & Verma (1993), menciona que la cuestión sigue siendo si la acumulación de prolina en los tejidos vegetales proporciona una ventaja adaptativa a la planta bajo estrés osmótico o es simplemente una consecuencia accidental de otros cambios inducidos por el estrés en el metabolismo.

Se observa que el patrón clinal altitudinal no es el esperado, ya que la hipótesis era que las poblaciones de las más bajas altitudes produjeran una mayor cantidad de prolina, como una respuesta adaptativa a las condiciones de mayor temperatura y menor humedad. Sin embargo, se ha demostrado que los mecanismos fisiológicos de respuesta de las plantas al enfrentarse a estrés hídrico tienen mucho en común con el estrés por bajas temperaturas, tanto en estrategias de resistencia que implican características morfológicas y funcionales (como el ajuste osmótico), como en efectos finales (deshidratación celular) (Nardini *et al.*, 2000; Beck *et al.*, 2007).

Durante el desarrollo de una comunidad de árboles, la competencia intensiva se produce por la luz, la humedad y los minerales, lo que resulta en la diferenciación de los árboles en diferentes clases de copa (Kramer & Koslowski, 1979). Probablemente la competencia entre individuos de *Abies religiosa* con otras especies con las que se encuentra en transición en el límite altitudinal inferior (por ejemplo, *Pinus pseudostrobus*), es un factor determinante para la persistencia de los individuos de *A. religiosa*, más que la capacidad adaptativa para resistir la

sequía. En otras palabras, más que la diferenciación genética de la capacidad de resistir estrés por sequía entre procedencias, en el límite altitudinal inferior lo que probablemente sería decisivo serían las interacciones bióticas, en particular, la competencia con *Pinus pseudostrobus*. Esto concuerda con la observación en campo de que el límite xérico de *A. religiosa* es muy difuso (no hay un claro límite altitudinal en la distribución de los fragmentos de poblaciones de *A. religiosa* en su límite inferior). En contraste, el límite altitudinal superior es mucho más definido, probablemente determinado por temperaturas frías, en un ecotono en donde se mezcla *Pinus hartwegii*, especie de pino que seguramente no representa una competencia seria por caracterizarse por rodales muy abiertos.

CONCLUSIONES

Se obtuvo que las plantas de *Abies religiosa* producen mayor cantidad de prolina como respuesta al estrés por sequía. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las procedencias de *A. religiosa*. También se encontró que el patrón clinal no fue estadísticamente significativo, no fue el esperado, al observar que las poblaciones de las mayores altitudes producen un mayor contenido de prolina. Esto podría deberse a que éstas últimas poblaciones están adaptadas a climas extremos de frío y, como respuesta metabólica, generan distintos aminoácidos en un mecanismo similar al de la producción de prolina para compensar el estrés hídrico. Otra posibilidad es que las poblaciones del límite inferior están más sujetas a presiones de selección por la competencia, principalmente con *Pinus pseudostrobus*, más que a su capacidad de resistir el estrés hídrico, y por lo tanto, no se ha generado una diferenciación genética entre poblaciones para la capacidad de producir prolina.

AGRADECIMIENTOS

Al Monarch Butterfly Fund (Minneapolis, Minnesota), el Consejo de Ciencia y Tecnología (Fondo Investigación Científica Básica, proyecto 2014-242985) y la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH, por el financiamiento otorgado para realizar el proyecto.

Al Dr. Roberto Lindig Cisneros del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, UNAM campus Morelia, por apoyar considerablemente el proyecto con la facilitación del laboratorio, reactivos y sus muy apreciadas observaciones y recomendaciones.

También se agradece al D. Cuauhtémoc Sáenz Romero, por estar presente en cada paso del experimento, así como facilitar la compra de reactivos y material de laboratorio.

LITERATURA CITADA

- Ábrahám, E., Hourton-Cabassa, C., Erdei, L., & Szabados, L. (2010). Methods for determination of proline in plants. *Plant Stress Tolerance: Methods and Protocols*, 317-331.
- Andrade, J. L., Larque-Saavedra, A., & Trejo, C. L. (1995). Proline accumulation in leaves of four cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. with different drought resistance. *Phyton-Revista Internacional de Botanica Experimental*, 57(2), 149-158.
- Aranda, I., Alía, R., Ortega, U., Dantas, Â. K., & Majada, J. (2010). Intra-specific variability in biomass partitioning and carbon isotopic discrimination under moderate drought stress in seedlings from four *Pinus pinaster* populations. *Tree Genetics & Genomes*, 6(2), 169-178.
- Aspinall, D., & Paleg, L. G. (1981). Proline accumulation: physiological aspects. *Physiology and biochemistry of drought resistance in plants*.

- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205-207.
- Beck, E. H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K., & Bhattarai, T. (2007). Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Biosciences*, 32(3), 501.
- Covarrubias-Robles, A. A. (2007). Sobrevivir al estrés: cómo responden las plantas a la falta de agua. *Bioteconología*, 14.
- De Diego Sánchez, N. (2013). Respuesta a la sequía de *Pinus radiata* D. Don y su implicación en los procesos de tolerancia (Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco).
- Delauney, A. J., & Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The plant journal*, 4(2), 215-223.
- Dosal, M., & Villanueva, M. (2008). Curvas de Calibración en los métodos analíticos. *Antología de Quím. Anal. Experimental*, 993-1014.
- Hare, P. D., & Cress, W. A. (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant growth regulation*, 21(2), 79-102.
- Hernández-Acosta, P., Cutanda, P., Aguado, M. C., Espinosa-Ruiz, A., Romero, C., Cortina, C., Bellés, J. M. & Culiáñez-Maciá, F. A. (1999). Selección y caracterización de mutantes de *Arabidopsis thaliana* afectados en la ruta de biosíntesis de prolina. En: Molina, J. L. M. V Reunión de Biología Molecular de Plantas. (Memoria).
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., & Verma, D. P. S. (2000). Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant physiology*, 122(4), 1129-1136.
- IPCC. (2001). Climate change 2001: the scientific basis. Páginas: In: Houghton, J. T., Ding, Y. D. J. G., Griggs, D. J., Noguer, M., van der Linden, P. J., Dai, X., ... & Johnson, C. A. (2001). *Climate change 2001: the scientific basis*. The Press Syndicate of the University of Cambridge.

- Klein, T., Cohen, S., & Yakir, D. (2011). Hydraulic adjustments underlying drought resistance of *Pinus halepensis*. *Tree Physiology*, 31(6), 637-648.
- Kramer, P. J. & Koslowski, T. T. (1979). *Physiology of woody plants*. Academic Press. 787 p.
- Lakso, A. N. (1979). Seasonal changes in stomatal response to leaf water potential in apple. *Journal American Society for Horticultural Science*.
- Larcher, W. (1995). *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Mátyás, C. (2010). Forecasts needed for retreating forests. *Nature*, 464(7293), 1271-1271.
- McCue, K. F., & Hanson, A. D. (1990). Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends in Biotechnology*, 8, 358-362.
- Merino Pérez, L., & Hernández Apolinar, M. (2004). Destrucción de instituciones comunitarias y deterioro de los bosques en la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca, Michoacán, México. *Revista Mexicana de Sociología*, 66(2), 261-309.
- Mohanty, P., & Matysik, J. (2001). Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino acids*, 21(2), 195-200.
- Moreno, L. P. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 27(2), 179.
- Nardini, A., Salleo, S., Gullo, M. L., & Pitt, F. (2000). Different responses to drought and freeze stress of *Quercus ilex* L. growing along a latitudinal gradient. *Plant Ecology*, 148(2), 139-147.
- Nolte, K. D., Hanson, A. D., & Gage, D. A. (1997). Proline accumulation and methylation to proline betaine in citrus: implications for genetic engineering

of stress resistance. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122(1), 8-13.

- Ortíz, O. M. (2006). Respuestas fisiológicas y bioquímicas de dos especies de pinos en condiciones limitantes de humedad. Tesis Licenciatura. Instituto de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo).
- Pinhero, R.G., Rao, M. V., Palyath, G., Murr, D. P., & Fletcher, R. A. (2001). Changes in the activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiology*, 114, 695-704.
- Sánchez-Mejía, Z. M., Serrano-Grijalva, L., Peñuelas-Rubio, O., Pérez-Ruiz, E. R., Sequeiros-Ruvalcaba, E., & García-Calleja, M. T. (2007). Composición florística y estructura de la comunidad vegetal del límite del desierto de Sonora y la selva baja caducifolia (Noroeste de México). *Rev. Lat. Rec. Nat*, 3(1), 74-83.
- Smirnoff, N., & Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057-1060.
- Tamura, T., Hara, K., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., & Sano, H. (2003). Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane-located receptor-like protein from tobacco plants. *Plant Physiology*, 131(2), 454-462.
- Tognetti, R., Michelozzi, M., & Giovannelli, A. (1997). Geographical variation in water relations, hydraulic architecture and terpene composition of Aleppo pine seedlings from Italian provinces. *Tree Physiology*, 17(4), 241-250.
- Valladares, F., Vilagrosa, A., Peñuelas, J., Ogaya, R., Camarero, J. J., Corcuera, L., ... & Gil-Pelegrín, E. (2004). Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*, 2, 165-192.
- Vance, N. C., & Zaerr, J. B. (1990). Analysis by high-performance liquid chromatography of free amino acids extracted from needles of drought-stressed and shaded *Pinus ponderosa* seedlings. *Physiologia Plantarum*, 79(1), 23-30.

Verbruggen, N., & Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino acids*, 35(4), 753-759.

Yoshida, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1997). Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant and Cell Physiology*, 38(10), 1095-1102.