



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN CIENCIAS FORESTALES

**ACUMULACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE
BIOMASA EN *Pinus cembroides* ZUCC.
Y *P. orizabensis* D.K. BAILEY &
HAWKSW. EN RESPUESTA AL
DÉFICIT HÍDRICO**

SERGIO ALVA RODRÍGUEZ

**T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2019

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y
DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe, "Sergio Alva Rodríguez", Alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor "Javier López Upton", por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "Acumulación y distribución de biomasa en *Pinus cembroides* Zucc. y *P. orizabensis* D.K. Bailey & Hawksw. en respuesta al déficit hídrico", y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Campus Montecillo, a Enero 2019

Sergio Alva Rodríguez

Dr. Javier López Upton

La presente tesis titulada: "Acumulación y distribución de biomasa en *Pinus cembroides* Zucc. y *P. orizabensis* D.K. Bailey & Hawksw. en respuesta al déficit hídrico" realizada por el alumno: "Sergio Alva Rodríguez" bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
CIENCIAS FORESTALES

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Javier López Upton

ASESOR



Dr. J. Jesús Vargas Hernández

ASESORA



Dra. Lucero del Mar Ruiz Posadas

Montecillo, Texcoco, Estado de México, enero de 2019

ACUMULACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE BIOMASA EN *Pinus cembroides* ZUCC. Y *P. orizabensis* D.K. BAILEY & HAWKSW. EN RESPUESTA AL DÉFICIT HÍDRICO

Sergio Alva Rodríguez , M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2019

RESUMEN

Se determinó la resistencia a sequía de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* y el efecto del déficit de humedad en la resistencia a bajas temperaturas, la longitud de acículas y la densidad de estomas. Se utilizaron plantas de 16 meses de edad de tres procedencias de cada especie. Se estableció un experimento con dos niveles de humedad que duró 11 meses. Tubos de PVC de 10 cm de diámetro por 100 cm de longitud se usaron como macetas. La humedad del sustrato fluctuó de 45 a 38 % en S0 (riego) y de 36 a 30 % en S1 (sequía). En S1 el incremento de altura, diámetro y longitud de raíz y el número total de ramas fue menor en 20, 46, 30 y 31.2 %, respectivamente, que en S0. Se redujo la acumulación de biomasa aérea, del tallo, acículas, ramas y raíz en un 32, 43, 26, 33 y 50 %, respectivamente, mientras que la relación de biomasa aérea/radical aumentó 33 %. En S0, *P. cembroides* presentó mayor proporción de plantas con hojas secundarias (79.5 vs. 66 %), biomasa de tallo (6 vs. 5.18 g) y de raíz (12.9 vs. 10.2 g) que *P. orizabensis*. En sequía, *P. cembroides* tuvo mayor incremento en diámetro (3.26 vs. 2.76 mm), número de ramas (8.0 vs. 5.8), biomasa de ramas (0.99 vs. 0.84 g) y de raíz (6.34 vs. 5.20 g) que *P. orizabensis*. La relación biomasa parte aérea/raíz resultó 21 y 12 % mayor en *P. orizabensis* en riego y sequía, respectivamente. Entre procedencias hubo diferencias en todas las variables. En la primera prueba (en invierno) de la resistencia a bajas temperaturas, el índice de daño (ID) fue 16.6 % mayor en las plantas bajo sequía; el ID aumentó 18 % en *P. cembroides* y 15 % en *P. orizabensis*. En una segunda prueba el ID fue 12 % mayor en S1; el aumento entre la primera y segunda fue de 11.6% en S0 y de 7% en S1. En la tercera prueba se encontró también un efecto negativo del estrés hídrico, pero solo diferencias significativas entre los estados fenológicos en las plantas bajo riego (55.7 % de daño en las plantas en elongación y 41.6 % en las plantas con yemas en reposo). La procedencia de Colón de *P. cembroides*, menos dañada en las primeras pruebas, fue igual de sensible que la de Tepeyahualco de *P. orizabensis*; sin embargo, en sequía, las de Colón que formaron yema terminal fueron más tolerantes que las de Tepeyahualco, pero lo contrario en las plantas que no formaron yema. El tratamiento de S1 impuesto disminuyó el tamaño del estoma en 11.7 % y la longitud de la acícula en 23 %, lo que incremento en 14 % la densidad estomatal por mm lineal. El efecto de la sequía impuesto en las acículas y estomas fue similar entre las dos especies y las seis procedencias probadas.

Palabras clave: crecimiento, déficit hídrico, *Pinus cembroides*, piñoneros, procedencias, estomas, bajas temperaturas, fenología.

**ACCUMULATION AND DISTRIBUTION OF BIOMASS IN *Pinus cembroides* ZUCC.
AND *P. orizabensis* D.K. BAILEY & HAWKSW. IN RESPONSE TO THE WATER
DEFICIT**

Sergio Alva Rodríguez, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

Drought resistance of *Pinus cembroides* and *P. orizabensis*, and the effects of water deficit on the resistance to low temperatures needle length and stomata density were determined. Plants of 16 months of age from three provenances of each pine were used. An experiment was established with two humidity levels that lasted 11 months. PVC tubes of 10 cm diameter by 100 cm length were used as pots. The humidity of the substrate fluctuated from 45 to 38 % in S0 (control, normal irrigation) and from 36 to 30 % in S1 (water deficit). In S1 the increment in height, diameter and root length and the total number of branches were 20, 46, 30 and 31.2 % lower, respectively, than in S0. Aerial, stem, needles, branches and root biomass accumulation was reduced by 32, 43, 26, 33 and 50 %, respectively, whereas the ratio of aerial / root biomass increased 33 %. In S0, *P. cembroides* presented a higher proportion of seedlings with secondary needles (79.5 vs. 66 %), stem (6 vs. 5.18 g) and root biomass (12.9 vs. 10.2 g) than *P. orizabensis*. In drought, *P. cembroides* had greater increase in diameter (3.26 vs. 2.76 mm), number of branches (8.0 vs. 5.8), branch (0.99 vs. 0.84 g) and root biomass (6.34 vs. 5.20 g) than *P. orizabensis*. The aerial / root biomass ratio was 21 and 12 % higher in *P. orizabensis* in control and in drought, respectively. There were differences in all the variables among provenances. In the winter test of resistance to low temperature, the damage index (DI) was 16.6% higher in plants under drought; DI increased 18% in *P. cembroides* and 15 % in *P. orizabensis*. In a second test DI was 12 % higher in S1, and DI increased by 11.6 % in S0 and 7 % in S1 when compared with the first test. In the third test, a negative effect of the drought stress was found, but there were only significant differences among the phenological stages in S0, 55.7 % in elongation to 41.6 % when plants were in dormancy. The Colón provenance of *P. cembroides*, less damaged in the initial tests, was as sensible as the Tepeyahualco of *P. orizabensis*; however, in drought, seedling from Colón with developed bud were more tolerant than those from Tepeyahualco but the opposite occurred in seedlings with no bud development. The S1 treatment decreased stomata length by 11.7 % and needle length by 23%, which increased stomata density per mm by 14 %. The effect of the imposed drought in the needles and stomata was similar among the two pinyon pines and the six tested provenances.

Palabras clave: increased, water deficit, *Pinus cembroides*, pinyon pines, provenances, stomata, low temperatures, phenology.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada durante mi formación como Maestro en Ciencias.

Al Colegio de Postgraduados (COLPOS) Campus Montecillo, por acogerme durante mi proceso de formación.

Al Postgrado en Ciencias Forestales, por brindarme la oportunidad de formar parte esta familia y otorgarme las herramientas necesarias para formarme como Maestro en Ciencias Forestales.

A los miembros del consejo particular: Dr. Javier López Upton, Dr. J. Jesús Vargas Hernández, Dra. Lucero del Mar Ruiz Posadas, por haber compartido sus conocimientos durante mi formación.

Al sinodal, Dr. Tomas Martínez Trinidad, por sus comentarios, sugerencias y por dedicarme su tiempo en la revisión de este proyecto de investigación.

A los trabajadores del Vivero Forestal Aurelio, Lauro, Alejandro, Manuel, Rogelio, Rubén y Raúl, por brindarme su amistad y apoyo.

A mis amigos y amigas Alexis, Elvira, Eleazar, Saraí, Liliana, Oscar, Benjamín, Alfredo, por su compañía y por coincidir en las escaleras de la superación.

DEDICATORIA

A mis padres Ernesto y Zenaida por brindarme su cariño, dedicación y apoyo en todo momento en este camino a la superación personal y profesional “un ejemplo a seguir”.

A mi novia Estefanía por su cariño, apoyo y dedicación, tanto en el trabajo de investigación como personalmente, emprendimos un viaje con diferentes metas y una meta en común que conjuntamente logramos culminar y ahora emprendemos un viaje con múltiples retos que con dedicación y trabajo lograremos superar.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
CAPÍTULO I BIOMASA Y CRECIMIENTO EN <i>Pinus cembroides</i> ZUCC. Y <i>P. orizabensis</i> D.K. BAILEY Y HAWKSWORTH EN RESPUESTA AL DÉFICIT HÍDRICO	4
Resumen	4
Introducción	5
Materiales y Métodos.....	7
Germoplasma utilizado	7
Establecimiento del experimento	8
Variables evaluadas	10
Análisis estadístico	11
Resultados.....	12
Respuesta al déficit hídrico en variables morfológicas.....	12
Discusión	19
Conclusiones	22

CAPÍTULO II DAÑOS POR BAJAS TEMPERATURAS EN <i>Pinus cembroides</i> ZUCC. Y <i>P. orizabensis</i> D.K. BAILEY Y HAWKSWORTH, EN RESPUESTA AL DÉFICIT HÍDRICO.	23
Resumen	23
Introducción	24
Materiales y Métodos.....	27
Selección de germoplasma	27
Prueba de daño por bajas temperaturas.....	28
Evaluación del daño ocasionado por la temperatura	29
Resultados.....	33
Discusión	37
Conclusiones	40
CAPÍTULO III DENSIDAD ESTOMÁTICA EN ACÍCULAS DE <i>Pinus cembroides</i> ZUCC. Y <i>P. orizabensis</i> D.K. BAILEY Y HAWKSWORTH EN RESPUESTA AL DÉFICIT HÍDRICO.	41
Resumen	41
Introducción	42
Establecimiento del experimento	44
Evaluación de características anatómicas	45
Densidad y tamaño de estomas	46
Análisis	47
Resultados.....	48

Conclusiones	53
CONCLUSIONES GENERALES.....	54
LITERATURA CITADA.....	56

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.1. Ubicación de las procedencias de <i>Pinus cembroides</i> y <i>P. orizabensis</i> incluidas en el presente estudio.	7
Cuadro 1.2. Valor de significancia del análisis de varianza para las variables de incremento de <i>Pinus cembroides</i> y <i>P. orizabensis</i> en dos niveles de humedad.	12
Cuadro 1.3. Media y error estándar para las variables de crecimiento por tratamiento de niveles de humedad y de <i>Pinus cembroides</i> y <i>P. orizabensis</i> por tratamiento.	13
Cuadro 1.4. Medias y error estándar del incremento en altura, diámetro y longitud de raíz de las procedencias de <i>Pinus cembroides</i> y <i>P. orizabensis</i> sometidas a riego y sequía.	15
Cuadro 1.5. Análisis de varianza para las características de biomasa, así como la relación de peso seco aéreo/peso seco de raíz para los tratamientos de riego y sequía para las procedencias de <i>Pinus cembroides</i> y <i>P. orizabensis</i>	16
Cuadro 1.6. Medias y error estándar para las variables de biomasa por tratamiento de niveles de humedad y por especie en cada tratamiento.	17
Cuadro 1.7. Medias y error estándar de características de biomasa de tallo y raíz de las procedencias de <i>Pinus cembroides</i> y <i>P. orizabensis</i> sometidos a riego y sequía.	18
Cuadro 2.1. Análisis de varianza con el modelo de medidas repetidas para el índice de daño en la pruebas de tolerancia a heladas realizadas el 11 de febrero y el 9 de marzo en plantas de las procedencias de <i>Pinus cembroides</i> y <i>P. orizabensis</i> , creciendo en dos condiciones de humedad del suelo.	33
Cuadro 2.2. Resultados del análisis de varianza realizado en la tercera prueba de bajas temperaturas (22 de marzo) considerando tres fases fenológicas presentes en las plantas de dos poblaciones (una de <i>Pinus cembroides</i> y otra de <i>P. orizabensis</i>) creciendo en dos condiciones de humedad (S0 y S1).	35

Cuadro 2.3. Valores medios y error estándar del índice de daño obtenidos en la tercera prueba de bajas temperaturas (22 de marzo) considerando tres fases fenológicas de las plantas de dos poblaciones creciendo en condiciones de riego y sequía.....	36
Cuadro 2.4. Valores medios y error estándar del índice de daño en la tercer prueba a heladas considerando tres estados fenológicos de plantas de <i>Pinus cembroides</i> y <i>P. orizabensis</i> creciendo bajos dos niveles de humedad.	36
Cuadro 3.1. Ubicación de las procedencias de <i>Pinus cembroides</i> y <i>P. orizabensis</i> utilizadas en el estudio.	44
Cuadro 3.2. Valor de significancia (P) del análisis de varianza para las variables de longitud de acícula, tamaño de estomas y densidad de estomas en plantas de <i>Pinus cembroides</i> y <i>P. orizabensis</i> en dos condiciones de humedad del suelo.	48
Cuadro 3.3. Medias y error estándar de las variables de longitud de acícula, tamaño de estoma y densidad de estomas en plantas de <i>Pinus cembroides</i> y <i>P. orizabensis</i> creciendo en dos condiciones de humedad del suelo.	49

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Mapa de la localización de las procedencias de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* empleadas en el presente estudio..... 8
- Figura 1.2.** Fluctuación del contenido de humedad del sustrato empleado para los tratamientos de S0 (riego) y S1 (sequía). C.C.: Capacidad de campo y P.M.P.: Punto de marchites permanente..... 9
- Figura 2.1.** Descenso paulatino utilizado en el tratamiento de bajas temperaturas en tres fechas para varias procedencias de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis*. 29
- Figura 2.2.** Índice de daño (%) por bajas temperaturas en plantas de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* creciendo en dos condiciones de humedad en las pruebas de tolerancia a bajas temperaturas en febrero (primera prueba) y en marzo (segunda prueba)..... 34
- Figura 3.1.** Efecto de los tratamientos de riego y sequía en la longitud de acícula (A), tamaño de estoma (B) y densidad de estomas (C) en acículas primarias de plantas de 27 meses de edad de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* en dos condiciones de humedad (S0 y S1). 49
- Figura 3.2.** Cambios en la densidad de estomas en plantas de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* al modificarse las condiciones de humedad del suelo de S0 a S1)..... 50

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las repoblaciones artificiales en México tienen escaso éxito, a tal grado que la supervivencia puede llegar a menos de 50 % en el primer año de establecimiento, con valores bastante menores posteriormente (Vargas y Venegas, 2012). Este deceso continuo ocurre en parte al elegir especies inadecuadas para las condiciones edafoclimáticas del sitio (Burney *et al.*, 2015). El déficit hídrico y las heladas son causantes principales de la distribución y desarrollo adecuado de las plantas debido a que limitan su supervivencia (Ewers *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2018). Ambos son factores de estrés que afectan a los procesos fisiológicos importantes de la planta (Mayr *et al.*, 2006), particularmente en coníferas el transporte del agua dentro de la planta y el intercambio de gases, que generalmente se ve disminuido por la embolia producida por las heladas y el cierre de estomas provocado por la sequía (Willson y Jackson, 2006). En consecuencia, la productividad y la hidratación de los vegetales se reducen, a tal grado que las afectaciones a las actividades fisiológicas pueden dañar la planta y causar su muerte (McDowell, 2011). Sin embargo, esto ocurre principalmente cuando las plantas adaptadas a cierto ambiente son trasladadas fuera de su área de distribución natural (Pokman y Sperry, 1997).

El déficit hídrico influye en el mantenimiento de la turgencia, necesaria para los procesos fisiológicos y el crecimiento celular (Kramer y Boyer, 1995); además, causa que la densidad estomática se reduzca en proporción a la intensidad del déficit hídrico (Franks y Beerling, 2009). Las plantas utilizan mecanismos de adaptación al déficit hídrico y a las heladas, habilidad que difiere entre especies, incluso entre procedencias geográficas (Cregg *et al.*, 2000). La forma de resistir las heladas es mediante el endurecimiento, el cual comienza una vez que la temperatura disminuye paulatinamente y las horas de luz por día se acortan (Li *et al.*, 2003).

En México existen 47 especies del género *Pinus*, alrededor de 40 % de las especies a nivel mundial; y la mayor cantidad de especies del género con megagametofito y embrión comestible (piñones) (Farjon y Styles, 1997). Los pinos piñoneros además de fuente de leña proveen semillas de alto valor económico, de alto consumo con un aporte de beneficios alimenticios por sus niveles nutrimentales altos (Bailey y Hawksworth, 1992; Luna *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2011).

La especie de piñonero más abundante en México es *P. cembroides* Zucc., que se distribuye en Sonora, Chihuahua, Coahuila, Durango, Zacatecas, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo y al noroeste de Veracruz, incluso en Arizona, Texas y Nuevo México en EE.UU., con un rango de distribución altitudinal de 1700 a 2400 m (Perry, 1991; Bailey y Hawksworth, 1992; Farjon y Styles, 1997). Por otro lado, *P. orizabensis* D.K. Bailey y Hawksworth es un pino similar en morfología al anterior, natural de Puebla, Tlaxcala y centro oeste de Veracruz (Perry, 1991). Este piñonero forma parte de la transición del bosque templado y matorral xerófilo (Granados *et al.*, 2015), en un intervalo altitudinal de 2300 a 2700 m (Bailey y Hawksworth, 1992). Si bien ambas especies son similares, Bailey y Hawksworth (1992) y Hernández *et al.* (2018) señalan diferencias en árboles adultos y a nivel de plántulas. *P. cembroides* se encuentra en la lista roja de la (IUCN, 2018) como preocupación menor, mientras *P. orizabensis* como en peligro de extinción.

Pinus cembroides y *Pinus orizabensis* no son simpátricas (Bailey, 1983; Bailey y Hawksworth, 1992), lo que sugiere diferencias adaptativas entre estos dos pinos. Ambas están amenazadas por la sobre explotación del piñón, el aumento de la frontera agrícola y particularmente el sobrepastoreo por el ganado caprino, que deja desnudo el suelo, lo que propicia la erosión hídrica. Esta situación ha generado reforestaciones para proteger el suelo y producir árboles para la producción de piñón. Sin embargo, la falta de control en el movimiento del germoplasma usado para generar las plantas ha provocado problemas de adaptación por el estrés hídrico o por heladas al repoblar lugares más secos o más altos de lo debido por su origen.

Por su similitud morfológica y al estar separadas geográficamente, *Pinus cembroides* y *Pinus orizabensis* son confundidas; debido a que ambas producen piñones rosados, lo que provoca que sean recolectados sin distinción, para producir planta en los programas de reforestación, alterando el área de distribución de estas especies, incluso de sus procedencias. Por las diferencias geográficas se esperarían diferencias adaptativas a factores de estrés, como lo es el déficit hídrico y las heladas (Espinoza *et al.*, 2016). Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar diferencias en la adaptación a sequía, evaluando en vivero la tasa de crecimiento en altura y en diámetro de plántulas de 16 meses de edad sometidas a dos

niveles de humedad. Además, determinar el efecto de la sequía en la resistencia a bajas temperaturas y en la densidad estomática de diferentes procedencias de *P. cembroides* y *P. orizabensis*.

CAPÍTULO I BIOMASA Y CRECIMIENTO EN *Pinus cembroides* ZUCC. Y *P. orizabensis* D.K. BAILEY Y HAWKSWORTH EN RESPUESTA AL DÉFICIT HÍDRICO

Resumen

El movimiento del germoplasma fuera de la distribución natural, aunado al cambio climático alteran la supervivencia y el crecimiento de los árboles de acuerdo con la adaptabilidad de cada especie y procedencia. El objetivo del presente estudio fue determinar la adaptación a la sequía de plantas de 16 meses de edad de tres procedencias de *Pinus cembroides* y tres procedencias de *P. orizabensis* con base en el crecimiento y producción de biomasa. Se estableció un experimento de riego y sequía con plantas de 16 meses de edad. Se emplearon como macetas tubos de PVC de 10 cm de diámetro por 100 cm de longitud. La humedad del sustrato fluctuó de 45 a 38 % de humedad en S0 (riego) y de 36 a 30 % en S1 (sequía). Estas condiciones se mantuvieron por 11 meses. Se midió el incremento de altura, diámetro, longitud de raíz, y el número total de ramas, los que fueron 29, 46, 30 y 31 % menor, respectivamente, en S1 vs. S0. La acumulación de biomasa aérea, de tallo, acículas, ramas y raíz en S1 se redujo en un 32, 43, 26, 33 y 50 %, respectivamente, mientras que la relación biomasa aérea/biomasa radical aumentó 33 % en sequía. *P. cembroides* presentó mayor crecimiento en altura y diámetro, biomasa de tallo en riego, y mayor crecimiento en diámetro y biomasa de ramas en sequía que *P. orizabensis*. La biomasa de la raíz resultó mayor en *P. cembroides* en ambos tratamientos de humedad, pero la relación biomasa aérea/raíz fue mayor en *P. orizabensis*. Se encontraron diferencias entre procedencias en el crecimiento y acumulación de biomasa en respuesta al déficit hídrico. La procedencia de *P. cembroides* que mejor se comportó bajo déficit hídrico fue Santiago de Anaya, Hgo. y para *P. orizabensis*, fue El Carmen, Tlax., debido a su buen sistema radical asociado a su mayor crecimiento.

Palabras clave: crecimiento, déficit hídrico, *Pinus cembroides*, *Pinus orizabensis*, piñoneros, procedencias.

Introducción

El principal problema de las repoblaciones artificiales en México es la baja productividad y una supervivencia menor al 50% a un año de establecidas y que desciende en años subsiguientes (Vargas y Venegas, 2012). Lo anterior se debe a varios factores, entre ellos principalmente a la selección de plantas no adaptadas al ambiente y la baja disponibilidad de agua, que alteran los procesos fisiológicos en la planta (Teskey y Hinckley, 1986; Burney *et al.*, 2015). Por ejemplo, el establecimiento de la vegetación está sujeta a las condiciones ambientales, la preparación del sitio y la calidad de la planta (Burney *et al.*, 2015). Además, el establecer plantas en un lugar inadecuado afecta sus rasgos funcionales, siendo la disposición de agua el factor más crítico debido a que afecta la adquisición de nutrientes (Birchler *et al.*, 1998).

Las plantas utilizan una variedad de mecanismos de adaptación al déficit hídrico, el cual difiere entre especies o incluso entre las procedencias geográficas de éstas; las que pertenecen a sitios áridos muestran una mayor eficiencia en el uso del agua (Cregg *et al.*, 2000). Estas adaptaciones hacen posible la selección de especies o procedencias con mayor capacidad de supervivencia al déficit hídrico (Cregg, 1994). Tal es el caso con *Pinus leiophylla*, que se lograron separar sus procedencias por su consumo de agua en dos grupos, uno ahorrador y otro agotador (Martínez *et al.*, 2002).

México posee 47 especies del género *Pinus*; 40 % de las especies conocidas a nivel mundial, y tiene la mayor cantidad de especies que producen semilla que se denomina piñón, cuyo megagametofito y embrión son comestibles (Farjon y Styles, 1997). Los pinos piñoneros (subsección cembroides), se establecieron y formaron grandes extensiones boscosas en el altiplano mexicano durante las glaciaciones del cuaternario (Little, 1987). La principal utilidad de *Pinus cembroides* Zucc. y de *P. orizabensis* D.K. Bailey y Hawksworth son las semillas, las que actualmente son recolectadas y consumidas (Bailey y Hawksworth, 1992; Luna *et al.*, 2008). Ambas especies se ubican cerca de centros de consumo, y aportan beneficios alimenticios y económicos a sus poseedores (Perry, 1991; Hernández *et al.*, 2011).

P. cembroides es el piñonero mexicano de mayor distribución; en EE.UU. se localiza en Arizona, Texas y Nuevo México y en México se localiza en Sonora, Chihuahua, Coahuila, Durango, Zacatecas, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí,

Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, y hasta el noroeste de Veracruz, a una altitud de 1,700 a 2,400 m (Perry, 1991; Bailey y Hawksworth, 1992; Farjon y Styles, 1997). En cambio, *P. orizabensis* es endémico de los estados de Puebla, Tlaxcala y el centro-oeste de Veracruz, por debajo de los 20° de latitud norte (Perry, 1991). Este pino forma parte de la vegetación de transición entre los bosques templados y matorral xerófilo (Granados *et al.*, 2015) y habita en una elevación de 2,300 a 2,700 m (Bailey y Hawksworth, 1992). Por lo tanto *P. orizabensis* se ubica en condiciones más australes, pero en mayor elevación que *P. cembroides*.

P. cembroides y *P. Orizabensis* no son simpátricas, con diferencias en sus intervalos de elevación (Bailey, 1983; Bailey y Hawksworth, 1992), por lo que se supondría diferencias adaptativas entre ellas. *P. cembroides* se encuentra en la lista roja de la (IUCN, 2018) como preocupación menor, y *P. orizabensis* se encuentra en la categoría de peligro de extinción. Ambas son afectadas por el sobrepastoreo, principalmente el caprino, la sobre explotación en la cosecha del piñón, y el aumento de la frontera agrícola, que inciden negativamente en su permanencia. Las dos especies son muy parecidas, aunque Bailey y Hawksworth (1992) señalan diferencias en árboles maduros, en tanto que Hernández *et al.* (2018) las describen a nivel de plántulas. Sin embargo, al estar separadas físicamente se les confunde; ambas producen piñones rosados y se les recolecta indistintamente para los programas de reforestación. Al establecer reforestaciones con la especie o la procedencia incorrecta alteraría la distribución natural de éstas, además de que se afectaría el desarrollo y supervivencia de las plantas por las diferencias adaptativas, por ejemplo, al déficit hídrico o a bajas temperaturas (Espinoza *et al.*, 2016).

Establecer reforestaciones con el piñonero equivocado alteraría la distribución, así como la supervivencia y productividad de los piñoneros. Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar las diferencias en la tasa de crecimiento en altura y en diámetro y la producción de biomasa aérea y radicular en plántulas de diferentes procedencias de *P. cembroides* y *P. orizabensis* sometidas a dos niveles de humedad, uno con déficit hídrico, y determinar la interacción genotipo x ambiente de humedad en el suelo en estas características.

Materiales y Métodos

Germoplasma utilizado

El germoplasma se recolectó en procedencias naturales de *P. cembroides* y de *P. orizabensis* en los años 2014 y 2015 (Cuadro 1.1). Se recolectaron conos de 15 árboles sanos, con buena conformación de copa, por población, ubicados a una distancia mínima de 50 m entre ellos. La semilla se sembró el 15 de enero del 2016 en charolas de plástico de 330 cm³. El sustrato estuvo compuesto de corteza de pino composteada, aserrín y agrolita con una proporción de 1:1:1, al cual se le agregó fertilizante de liberación lenta (nutricote 17-7-12) en una dosis de 7 kg por m³. Posteriormente las plantas se dejaron bajo condiciones de riego normal, hasta el 30 de mayo del 2017, a los 16 meses de edad.

Cuadro 1.1 Ubicación de las procedencias de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* incluidas en el presente estudio.

Procedencias	Latitud N [†]	Longitud O	Altitud	Temp ‡°C	PP (mm) [†]
<i>Pinus cembroides</i>					
El Carrizal, Colón, Qro.	20° 52' 40"	100° 05' 07"	2,159	16.0	626
La Laja, Cadereyta, Qro.	20° 48' 44"	99° 38' 19"	2,831	14.2	890
La Florida, Santiago de Anaya, Hgo.	20° 28' 36"	98° 59' 02"	2,002	17.3	511
<i>P. orizabensis</i>					
Tepeyahualco, Tepeyahualco, Pue.	19° 30' 26"	97° 30' 26"	2,417	13.8	491
Rancho Domínguez, El Carmen, Tlax.	19° 24' 01"	97° 42' 44"	2,671	15.3	565
Las Cuevas, Alzayanca, Tlax.	19° 22' 44"	97° 43' 02"	2,479	14.0	573

[†]Datos obtenidos en cada población con un geoposicionador Garmin® Etrex 10 Datum WGS84.

[‡] Temperatura media anual y precipitación media anual se obtuvo mediante el software ANUSPLIN, que modela datos en superficies geográficas considerando la latitud (Sáenz-Romero, 2011).

Establecimiento del experimento

El experimento se estableció el 30 de mayo del 2017 con seis procedencias (Figura 1.1) tres de cada especie, en el invernadero del Postgrado en Ciencias Forestales, del Colegio de Postgraduados, en Texcoco, Estado de México.

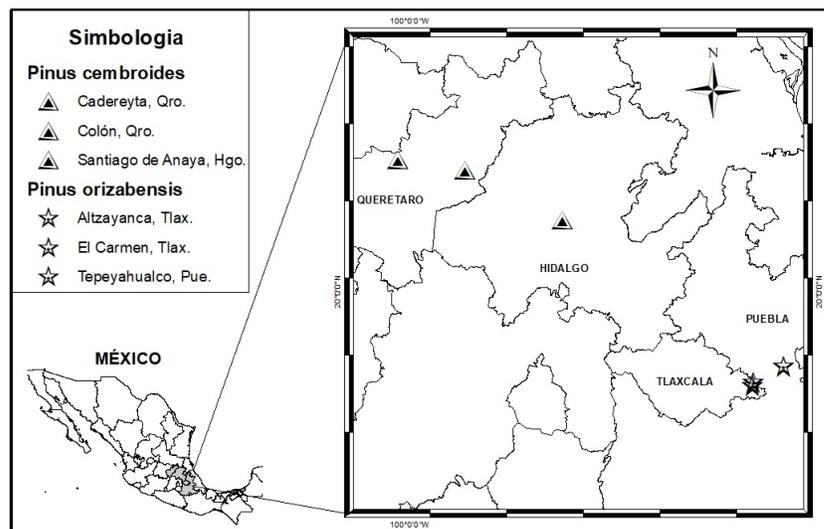


Figura 1.1. Mapa de la localización de las procedencias de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* empleadas en el presente estudio.

Se realizó una selección de plantas en cada población, para que tuvieran un tamaño homogéneo (Martíñón *et al.*, 2010). Se emplearon 480 tubos de PVC de 10 cm de diámetro y 100 cm de longitud, con el fin de no tener limitado el crecimiento de la raíz. Las plantas escogidas se trasplantaron a estos tubos. Se utilizó un diseño experimental en dos ambientes de humedad [S0 (riego) y S1 (sequía)], con las repeticiones (bloques) anidadas dentro de ellos; en cada bloque se evaluaron las seis poblaciones (tres por especie), con 10 plantas por unidad experimental, por lo que se tuvieron 60 plantas por repetición y 240 plantas por ambiente de humedad. Se colocaron otros 136 tubos con plantas como bordo experimental.

El sustrato utilizado se compuso de material de aserrío composteado y tepetzil en una proporción de 1:1, el cual fue mezclado y esterilizado previamente a una temperatura de 90 °C por 5 horas. Al sustrato no se le añadió fertilizante debido a que éste ocasiona interacción en la tolerancia al estrés (Villar *et al.*, 2013). En el Laboratorio de Física de Suelos en el Colegio de Postgraduado se realizaron análisis del sustrato:

el pH del sustrato resultó de 6.6, la conductividad eléctrica de 1.5 dSm^{-1} , y el contenido de materia orgánica de 14.4 %, nitrógeno de 0.13 %, fósforo de 0.01 mg Kg^{-1} , sodio de $0.08 \text{ cmol (+) Kg}^{-1}$ y de potasio $0.15 \text{ cmol (+) Kg}^{-1}$. Con la finalidad de determinar los niveles de humedad en cada tratamiento, se determinó la capacidad de campo (0.03 MPa) y el punto de marchites permanente (1.5 MPa).

Para determinar el momento oportuno de riego se utilizó el método gravimétrico. En S0 (riego) se permitió que la humedad fluctuara de 45 a 38 % de humedad, mientras que en S1 (sequía) fluctuó de 36 a 30 % de humedad. El agua se repuso cuando se alcanzó el mínimo de humedad permitido para cada tratamiento, condiciones que se mantuvieron durante 11 meses (Figura 1.2).

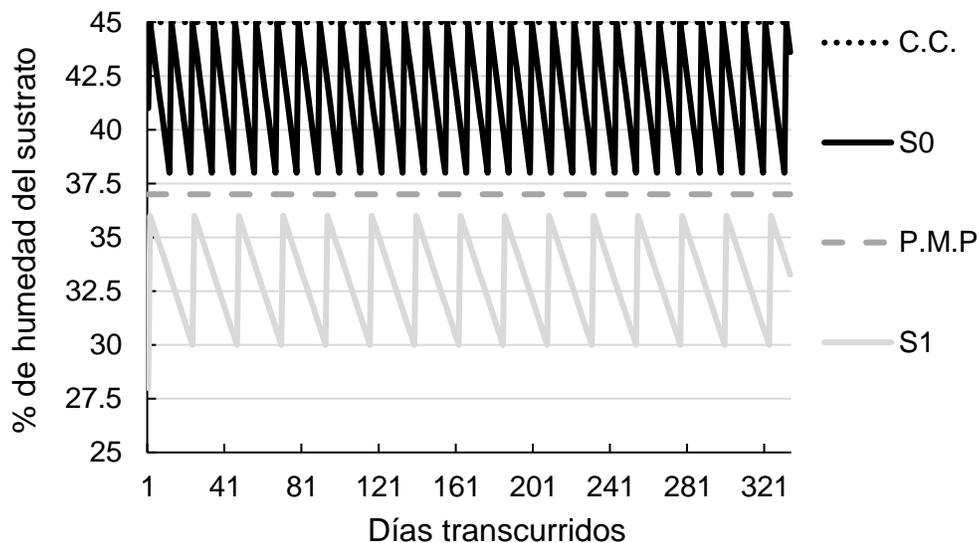


Figura 1.2. Fluctuación del contenido de humedad del sustrato empleado para los tratamientos de S0 (riego) y S1 (sequía). C.C.: Capacidad de campo y P.M.P.: Punto de marchites permanente.

Variables evaluadas

Al inicio del experimento, y posteriormente cada mes, se determinó la altura, el diámetro y la presencia o ausencia de hojas secundarias en cada una de las plantas. Además, se contabilizó el número de ramas y la longitud inicial de la raíz que fue igual a la longitud del tubete. La diferencia entre los valores iniciales y finales de las variables de crecimiento se consideró el incremento en cada una de ellas. Se utilizó una regla graduada al mm y un vernier digital marca Mitutoyo® con aproximación al mm. Para la presencia de hojas secundarias se empleó la proporción de plantas con hojas secundarias en cada parcela. Al inicio y final del experimento también se muestrearon 40 plantas de cada procedencia y tratamiento, separando la parte aérea (tallos, hojas y ramas) y la raíz, para determinar la biomasa total de cada uno de ellos. El sistema radical fue lavado cuidadosamente. Ambas secciones se depositaron en bolsas de papel, y se colocaron en una estufa de secado a 60 ° C hasta alcanzar un peso constante. De la parte aérea se separaron las acículas de las ramillas y se pesaron por separado en una balanza analítica. También se realizaron correlaciones de Pearson con todas las variables analizadas, ubicación geográfica, variables climáticas.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza en conjunto de las dos condiciones de humedad con el procedimiento MIXED de SAS (SAS Institute, 2003). Para las variables en las que se usaron los datos individuales por planta se utilizó el siguiente modelo lineal:

$$Y_{ijklm} = \mu + S_i + \beta_{j(i)} + E_k + SE_{ik} + \beta E_{j(i)k} + P_{l(k)} + SP_{il(k)} + \beta P_{j(i)l(k)} + e_{ijklm}$$

Donde Y_{ijklm} es el valor observado en el m-ésimo individuo de la l-ésima procedencia dentro de la k-ésima especie, en el j-ésimo bloque anidado en el i-ésimo ambiente de humedad; μ es la media poblacional, S_i es el efecto fijo del i-ésimo nivel de sequía, $\beta_{j(i)}$ es el efecto aleatorio de bloque anidado en el nivel de sequía \sim NID (0, $\sigma^2_{B(S)}$), E_k es el efecto fijo de la k-ésima especie, SE_{ik} es el efecto fijo de la interacción del nivel de sequía por especie; $\beta E_{j(i)k}$ es el efecto aleatorio de la interacción bloque por especie \sim NID (0, σ^2_{BE}), $P_{l(k)}$ es el efecto fijo de la l-ésima procedencia dentro de la k-ésima especie, $SP_{il(k)}$ es el efecto fijo de la interacción nivel de sequía por procedencia dentro de especie, $\beta P_{j(i)l(k)}$ es el efecto aleatorio de la interacción bloque anidado en el nivel de sequía por procedencia dentro de especie \sim NID (0, σ^2_{BP}), y e_{ijklm} es el error de muestreo dentro de parcelas \sim NID (0, σ^2_e); $i = S_0$ y S_1 ; $j = 1, 2, 3$ y 4 bloques; $k = P. cembroides$ y $P. orizabensis$; $l = 1, 2, 3$ procedencias por especie, $m = 1, \dots, 10$ plantas por parcela. En las variables en que se usaron valores promedio por parcela, se utilizó un modelo similar reducido (i.e., sin incluir el error de muestreo dentro de las parcelas).

Resultados

Respuesta al déficit hídrico en variables morfológicas

El análisis de varianza mostró diferencias significativas con $p < 0.05$ entre los tratamientos de riego y sequía en el incremento en altura, incremento en diámetro, el número de ramas y en el incremento en longitud de raíz (Cuadro 1.2). A nivel de especies sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el incremento en diámetro y en el número de ramas. Para las procedencias de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todas las variables excepto número de ramas. La interacción de los niveles de humedad con especie resultó no significativa salvo en el porcentaje de plantas con hojas secundarias. En la interacción de procedencias por los niveles de humedad se detectaron diferencias en el incremento en altura y diámetro ($p < 0.06$).

Cuadro 1.2 Valor de significancia del análisis de varianza para las variables de incremento de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* en dos niveles de humedad.

Fuente de variación	G.L.	Incremento en altura (cm)	Incremento en diámetro (mm)	Número de ramas	Longitud de raíz (cm)	Plantas con hojas secund. (%)
Tratamiento	1	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	ns
Especie	1	ns	0.0001	0.0079	ns	ns
Trat*Especie	1	ns	ns	ns	ns	0.0322
Procedencia(Esp)	4	0.0001	0.0001	ns	0.000	0.0435
Trat*Proc(Esp)	4	0.0002	0.0001	ns	ns	ns

El crecimiento fue menor en las plantas que se encontraban en sequía, aunque no se modificó el porcentaje de plantas con presencia de acículas secundarias. Las variables de incremento en altura, diámetro y longitud de raíz, y el número total de ramas fueron menores en sequía en 20, 46, 30 y 31 %, respectivamente, que en riego normal. En *P. cembroides* el incremento en altura, diámetro y longitud de raíz, y el número total de ramas fue menor en sequía en 33, 45, 29 y 23 %, mientras que en *P.*

orizabensis estas mismas variables lo fueron en 25, 47, 31 y 40 % (Cuadro 1.3). En *P. cembroides* fue mayor la reducción de la altura por efectos de la sequía que en *P. orizabensis*, aunque en ésta última especie fue mayor el efecto en el número de ramas, pero en ninguna de estas variables fue significativo el efecto de la interacción tratamiento por especie. En ambas especies el efecto del déficit hídrico en el diámetro del tallo fue mayor que en la altura de la planta. Por otro lado, La sequía afectó de manera distinta a las dos especies en el desarrollo de las hojas secundarias, ya que mientras en *Pinus cembroides* se redujo la proporción de plantas con hojas secundarias, en *Pinus orizabensis* no hubo un cambio significativo en esta variable (Cuadro 1.3).

Cuadro 1.3 Media y error estándar para las variables de crecimiento por tratamiento de niveles de humedad y de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* por tratamiento.

Tratamiento/ Especie	Incremento en altura (cm)	Incremento de diámetro (mm)	Longitud de raíz (cm)	Número de ramas	Plantas con hojas secund. (%)
S0	19.5 ±0.55a	5.5 ±0.07a	96.12 ±1.81a	10.0 ±0.3a	72.8 ±2.6a
S1	13.8 ±0.55b	3.0 ±0.07b	67.05 ±1.81b	6.9 ±0.3b	68.2 ±2.6a
Riego (S0)					
<i>P. cembroides</i>	20.58 ±0.73a	5.89 ±0.11a	96.08 ±2.49a	10.49 ±0.48a	79.5 ±3.7a
<i>P. orizabensis</i>	18.42 ±0.73b	5.22 ±0.11b	96.15 ±2.49a	9.66 ±0.48a	66.1 ±3.7b
Sequía (S1)					
<i>P. cembroides</i>	13.86 ±0.73a	3.26 ±0.11a	67.81 ±2.49a	8.04 ±0.48a	65.9 ±3.7a
<i>P. orizabensis</i>	13.82 ±0.73a	2.76 ±0.11b	66.30 ±2.49a	5.79 ±0.48b	70.5 ±3.7a

Valores promedio seguidos de letras distintas son diferentes entre sí (p=0.05).

Las variables no mostraron diferencias significativas entre especies con excepción del porcentaje de plantas con hojas secundarias en el tratamiento de riego, en donde *P. cembroides* (PCem) tuvo 79.5 % y *P. orizabensis* (POri) 66.15 %, mientras que en el tratamiento de sequía tuvieron valores similares.

Las variables mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para las procedencias en crecimiento entre tratamientos S0 (riego) y S1 (sequía). Las procedencias de mayor crecimiento en altura en S0 fueron Santiago de Anaya (PCem) y El Carmen (POri) con una media de 24.3 y 23.5 cm, respectivamente. Las procedencias de menor crecimiento en riego fueron Colón (PCem) y Tepeyahualco (POri), con una media de 16.8 y 14.7 cm, respectivamente. La procedencia de mayor crecimiento de altura en S1 fue Santiago de Anaya (PCem) con una media de 16.0 cm. La de menor crecimiento fue Colón (PCem) con una media de 12.3 cm (Cuadro 1.4). Colón tuvo la mayor reducción en el crecimiento de raíz de todas las procedencias. (36%) y Santiago de Anaya la menor reducción, solo 22 %.

En el tratamiento de S0 las procedencias de mayor incremento en diámetro fueron Santiago de Anaya (PCem) y El Carmen (Pori). Las que menos crecieron fueron Alzayanca (Pori) y Tepeyahualco (Pori). La procedencia de mayor incremento en diámetro en S1 fue Santiago de Anaya (Pcem), y las de menor incremento fueron Alzayanca (Pori) y Tepeyahualco (Pori) (Cuadro 1.4). El incremento en longitud de raíz en riego fue mayor en la procedencia de Colón (PCem) y el menor fue para Tepeyahualco (POri). En sequía la procedencia Santiago de Anaya (PCem) fue la de mayor incremento y Colón la de menor (PCem).

Cuadro 1.4 Medias y error estándar del incremento en altura, diámetro y longitud de raíz de las procedencias de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* sometidas a riego y sequía.

Proced [†]	Incremento					
	Altura (cm)		Diámetro (mm)		Longitud de raíz (cm)	
	Riego	Sequía	Riego	Sequía	Riego	Sequía
S.Anaya	24.3 ±1.3a	15.7 ±1.3a	6.23 ±0.19a	3.61 ±0.19a	99.5 ±3.1 ^a	77.7 ±3.1a
Cader	20.7 ±1.3b	13.3 ±1.3b	5.78 ±0.19b	2.96 ±0.19b	95.8 ±3.1ab	66.4 ±3.1bc
Colón	16.8 ±1.3c	12.3 ±1.3b	5.68 ±0.19b	3.20 ±0.19b	92.9 ±3.1b	59.3 ±3.1d
Tepeya	14.7 ±1.3c	13.9 ±1.3ab	4.70 ±0.19c	2.47 ±0.19c	92.4 ±3.1b	65.0 ±3.1bc
El Carm	23.5 ±1.3a	14.4 ±1.3ab	6.16 ±0.19a	3.06 ±0.19b	100.1 ±3.1a	70.6 ±3.1b
Altzayan	17.1 ±1.3c	13.1 ±1.3b	4.80 ±0.19c	2.74 ±0.19c	95.9 ±3.1ab	63.3 ±3.1c

^{††}Procedencias: S.Anaya: Santiago de Anaya, Cader: Cadereyta, Tepeya: Tepeyahualco, El Carm: El Carmen, y Altzan: Altzayanca. Letras iguales no hay diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Las primeras tres procedencias pertenecen a *P. cembroides* y las últimas a *P. orizabensis*.

Respuesta al déficit hídrico en variables de acumulación de biomasa

Existieron diferencias significativas entre tratamientos de humedad en todas las variables de biomasa, así como en la relación peso seco aéreo/peso seco de raíz. Las especies también difirieron en la mayoría de las variables, excepto en la biomasa de acículas y ramas. En cambio, la interacción especie*nivel de humedad sólo fue significativa en la biomasa de raíz. A nivel de procedencias se encontraron diferencias en todas las variables de biomasa, pero la interacción procedencia x niveles de humedad solo fue significativa en la biomasa del tallo y de la raíz (Cuadro 1.5).

Cuadro 1.5 Análisis de varianza para las características de biomasa, así como la relación de peso seco aéreo/peso seco de raíz para los tratamientos de riego y sequía para las procedencias de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis*.

Fuente de variación	Biomasa					Relación
	aérea	tallo	acícula	ramas	raíz	aérea/raíz
Tratamiento	0.0001	0.0002	0.0005	0.0001	0.0001	0.0001
Especie	0.0488	0.0005	ns [†]	ns	0.0001	0.0012
Tratamiento*Especie	ns	ns	ns	ns	0.0019	ns
Procedencia(Especie)	0.0001	0.0009	0.0003	0.0055	0.0001	0.0002
Tratam*Proc(Especie)	ns	0.08	ns	ns	0.0253	ns

[†] n.s. No significativo.

El estrés hídrico redujo la acumulación de biomasa en la parte aérea, de tallo, acículas, ramas, y raíz en un 33, 43, 26, 33, y 50 %, respectivamente. La mayor reducción en la raíz con respecto a la parte aérea, ocasionó que la relación biomasa área/biomasa radical aumentara 34 % en condiciones de sequía. En *P. cembroides* la restricción de humedad redujo la acumulación de biomasa aérea, de tallo, acículas, ramas, y raíz en un 32, 44, 24, 26, y 51 %, respectivamente y la relación biomasa aérea/radical aumentó en 39 %. Mientras que en *P. orizabensis* la acumulación de biomasa se redujo en 34, 42, 28, 41, y 49 %, respectivamente, en las mismas variables y la relación biomasa aérea/radical incrementó en 29 %. Así, el efecto de la sequía en la biomasa de las ramas fue mayor en *P. orizabensis*, y la relación biomasa aérea/radical se incrementó más en *P. cembroides*, aunque la interacción no fue estadísticamente diferente (Cuadro 1.5).

Cuadro 1.6 Medias y error estándar para las variables de biomasa por tratamiento de niveles de humedad y por especie en cada tratamiento.

Trat/ Esp [†]	Biomasa (g)					Relación aérea/raíz
	aérea	tallo	acícula	ramas	raíz	
S0	16.06±0.37a	5.60±0.22a	9.08±0.24a	1.38±0.05a	11.56±0.39a	1.46±0.04b
S1	10.80±0.37b	3.18±0.22b	6.70±0.24b	0.92±0.05b	5.77±0.39b	1.95±0.04a
Riego (S0)						
Pc	16.43±0.47a	6.02±0.25a	9.06±0.32a	1.34±0.07a	12.89±0.42a	1.32±0.05b
Po	15.70±0.47a	5.18±0.25b	9.09±0.32a	1.42±0.07a	10.23±0.42b	1.60±0.05a
Sequía (S1)						
Pc	11.25±0.47a	3.36±0.25a	6.89±0.32a	0.99±0.07a	6.34±0.42a	1.84±0.05b
Po	10.36±0.47a	3.00±0.25a	6.50±0.32a	0.84±0.07b	5.20±0.42b	2.06±0.05a

[†] Trat: Tratamiento de sequía, Esp: Especie; Pc: *Pinus cembroides*; Po: *P. orizabensis*.

P. cembroides presentó mayor biomasa de tallo y de raíz en riego y mayor biomasa de ramas y de raíz en sequía que *P. orizabensis*. La relación biomasa aérea/raíz resultó mayor en *P. orizabensis* en ambos tratamientos (Cuadro 1.6).

La procedencia de *P. cembroides* que mostró mayor acumulación de biomasa en S0 fue Cadereyta para tallo y raíz, y Tepeyahualco de *P. orizabensis* fue la de menor cuantía. En el tratamiento de sequía, la procedencia que almacenó mayor biomasa en tallo y raíz fue Santiago de Anaya (*P. cembroides*), mientras que la de menor acumulación de biomasa en tallo y raíz fue Alzayanca (*P. orizabensis*) (Cuadro 1.7).

Cuadro 1.7 Medias y error estándar de características de biomasa de tallo y raíz de las procedencias de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* sometidos a riego y sequía.

Procedencias	Biomasa de tallo		Biomasa de raíz	
	Riego (S0)	Sequía (S1)	Riego (S0)	Sequía (S1)
Cadereyta †	6.65 ±0.35a	3.63 ±0.35a	14.34 ±0.58a	6.60 ±0.58ab
Santiago de A. †	6.07 ±0.35a	3.55 ±0.35ab	13.82 ±0.58ab	7.18 ±0.58a
Colón†	5.34 ±0.35b	2.89 ±0.35b	10.51 ±0.58c	5.25 ±0.58b
El Carmen¶	6.32 ±0.35a	3.29 ±0.35ab	12.67 ±0.58b	5.84 ±0.58b
Altzayanca¶	5.17 ±0.35b	2.84 ±0.35b	9.10 ±0.58d	4.85 ±0.58b
Tepeyahualco¶	4.05 ±0.35c	2.87 ±0.35b	8.93 ±0.58d	4.91 ±0.58b

† pertenecen a *Pinus cembroides*, ¶ pertenecen a *P. orizabensis*.

Discusión

La intensidad y la época en que ocurre la sequía causan impactos diferentes. Un déficit hídrico durante finales de primavera y principios de verano consigue afectar los brotes del año en curso, en tanto que un déficit hídrico a finales de verano afectará los brotes del año siguiente (Michelot *et al.*, 2012), además de afectar el alargamiento de la raíz (Dobbertin *et al.*, 2010). En este estudio se provocó una sequía prolongada, que abarcó desde inicios de verano del 2017 hasta verano del 2018, por lo que la afectación fue para los brotes creados en verano del primer año, mientras que en los brotes del 2018 no se evaluó el efecto durante todo su ciclo de crecimiento.

Los ambientes limitantes, en particular por el déficit hídrico, reducen el crecimiento de los árboles por la disminución de la fotosíntesis (Matías y Jump, 2012). El tratamiento de sequía hizo que se redujera el crecimiento y la biomasa de las plantas (Vernon *et al.*, 2018). Las plantas de las especies evaluadas en el presente estudio redujeron su crecimiento y acumulación de biomasa entre 20 y 50 %, dependiendo de la variable y componente del crecimiento, por efecto del estrés hídrico. Estas reducciones en crecimiento son similares a los valores obtenidos por Eilmann y Rigling (2012) en *Larix decidua* Mill., *Pinus nigra* y *Pseudotsuga menziesii* Mirb. var. *menziesii*, lo que fue adjudicado al cierre de estomas y a una falla hidráulica, lo que afecta el intercambio gaseoso y la asimilación de carbono de las plantas (Ripullone *et al.*, 2007)

La variable más afectada fue el diámetro, la cual redujo su crecimiento en 54 %. El crecimiento en altura solo se redujo un 20 %, quizá fue menos afectada debido a que ya estaba formado el brote del 2017 y no se evaluó el efecto completo en el brote de 2018. El efecto de los brotes del 2018 se podrá ver reflejado posteriormente (Michelot *et al.*, 2012). En cambio, la biomasa de la raíz fue afectada en un 50 %. Estas reducciones de crecimiento y de biomasa fueron menores a las reportadas por Martínez *et al.* (2002), probablemente porque ellos utilizaron una especie más sensible al déficit de humedad.

El estrés hídrico habitualmente aumenta la biomasa radical a expensas de la biomasa aérea; se ha especulado que es para que la planta acceda a las fuentes de agua más profundas (Matías *et al.*, 2014). Sin embargo, en el presente estudio ocurrió

mayor reducción en la biomasa radical en ambas especies. La relación de biomasa área / biomasa radical aumentó 33 % en el tratamiento de sequía, mismo fenómeno reportado en el experimento con *Pinus pinea* L., otro pino piñonero, en donde la raíz es más afectada en su crecimiento que la parte aérea, por lo que hay una mayor inhibición de la raíz con respecto al crecimiento de los brotes (Villar *et al.*, 2013). Esto puede ser debido al momento de ocurrencia del déficit hídrico en relación con la estación de crecimiento, de acuerdo con lo que han señalado Michelot *et al.* (2012).

Pinus cembroides tuvo mayor biomasa radical, lo que sugiere mayor adaptación a sequía que *P. orizabensis*. Entre procedencias hubo diferencias, siendo las de Santiago de Anaya (*P. cembroides*) y El Carmen (*P. cembroides*) las que obtuvieran las raíces con mayor longitud, así como de mayor crecimiento en diámetro y altura y acumulación de biomasa en el tratamiento de sequía. Las plantas con mayor sistema radical y biomasa se consideran más resistentes al estrés hídrico (Simeonova y Hans, 2011). No se encontró asociación de la ubicación geográfica o alguna variable climática con el desempeño de las procedencias, salvo que las poblaciones de lugares más cálidos (en general las de *P. cembroides*) tuvieron más diámetro en la base del tallo, al presentar correlaciones positivas con la temperatura media anual y la temperatura media del mes más frío o la suma de días con temperaturas $>5^{\circ}\text{C}$ ($r=0.78$, $p=0.066$; $r=0.82$, $p=0.042$; $r=0.78$, $p=0.067$, respectivamente).

En lugares que muestran déficit hídrico es importante elegir árboles y procedencias con atributos que les den resistencia a sequía y que puedan mantener tasas de crecimiento superiores a otras que sean susceptibles al déficit hídrico. Además, los árboles bajo condiciones de estrés hídrico se debilitan (Allen *et al.*, 2015), y son más susceptibles al ataque por patógenos e insectos (Weed *et al.*, 2013). Por lo anterior, en un ambiente que presenta déficit hídrico si se volviera más seco por el cambio climático convendría elegir especies con las características de *Pinus cembroides* ya que obtiene una mayor biomasa radicular en sequía en comparación con *P. orizabensis*. Sin embargo, dentro de cada especie hubo una procedencia con mejor desempeño en sequía, lo que implica que hay variación intra-específica en la capacidad de adaptación a sequía en ambas especies. La procedencia de Santiago de Anaya de *P. cembroides* y El Carmen de *P. orizabensis* serían menos afectadas por

ser más resistentes al estrés hídrico. Contrario a lo esperado, no se encontraron correlaciones positivas entre la resistencia al estrés hídrico con la precipitación media anual y temperatura media del lugar de origen de las poblaciones; sin embargo, el número de poblaciones de cada especie incluidas en el estudio fue reducido.

Conclusiones

El déficit hídrico afectó negativamente las variables de crecimiento en altura, diámetro y longitud de raíz y el número total de ramas, así como todos los componentes de la acumulación de biomasa en las plantas. La acumulación de biomasa en la raíz fue la más afectada, con una reducción de 50 %.

En condiciones favorables de humedad se detectaron diferencias entre especies en el porcentaje de plantas con hojas secundarias y en la relación biomasa aérea/raíz. Entre procedencias hubo diferencias importantes en el incremento en altura, diámetro, y longitud de raíz, así como en la acumulación de biomasa en tallo y raíz. En condiciones de déficit hídrico se determinaron diferencias entre especies en la acumulación de biomasa en raíz, y entre procedencias en el incremento en altura, diámetro y longitud de raíz, y en la biomasa de tallo y de raíz. *P. cembroides* presentó mayor crecimiento en altura y diámetro, mayor biomasa de tallo y raíz en riego, y mayor crecimiento en diámetro, biomasa de ramas y de raíz en sequía que *P. orizabensis*. La relación biomasa aérea/raíz resultó mayor en *P. orizabensis* en ambas condiciones de humedad.

Los resultados muestran que hay una variación intra-específica en la respuesta del crecimiento y acumulación de biomasa al déficit hídrico. Las procedencias que mejor se comportaron en las dos condiciones de humedad fueron Santiago de Anaya para *P. cembroides* y El Carmen para *P. orizabensis*, debido a su buen sistema radical asociado a su mayor crecimiento.

**CAPÍTULO II DAÑOS POR BAJAS TEMPERATURAS EN *Pinus cembroides*
ZUCC. Y *P. orizabensis* D.K. BAILEY Y HAWKSWORTH, EN RESPUESTA AL
DÉFICIT HÍDRICO.**

Resumen

El movimiento de germoplasma a lugares más secos o fríos, fuera de su área de distribución natural genera alteraciones en el crecimiento y supervivencia de las plantas. La falta de agua reduce el vigor de las plantas, las que pueden ser más susceptibles al daño por bajas temperaturas. El objetivo del presente estudio fue determinar la tolerancia a bajas temperaturas de dos especies de piñoneros con tres procedencias cada una, cuando se encontraban en los tratamientos de riego (S0) y sequía (S1). Se realizaron dos pruebas de bajas temperaturas, el 11 de febrero 2018 (invierno) y el 9 de marzo (finales de invierno), para evaluar diferencias entre las procedencias y especies; y una más el 22 de marzo (primavera) para evaluar la tolerancia al frío en plantas con distinta fase fenológica (sin formación de yema, yema en letargo y yema en elongación) usando dos poblaciones (una por especie) con tolerancia contrastante entre ellas. En las dos primeras pruebas el índice de daño por el frío fue mayor en el ambiente de sequía (21.6 y 33 en S0 vs. 38 y 45 en S1) y aumentó de la primera a la segunda evaluación, lo que se asocia por un lado efecto del estrés hídrico y, por el otro, al inicio del crecimiento de las plantas. En ambas pruebas no se encontraron diferencias estadísticas entre especies. En la tercera prueba de baja temperatura se encontró también un efecto negativo del estrés hídrico, con diferencias significativas entre los estados fenológicos sólo en las plantas bajo riego (55.7 % de daño en las plantas en elongación y 41.6 % en las plantas con yemas en reposo). La procedencia de Colón de *P. cembroides*, menos dañada en las primeras pruebas, fue igual de sensible que la de Tepeyahualco de *P. orizabensis*; sin embargo, en sequía, las plantas de Colón que formaron yema terminal fueron más tolerantes que las de Tepeyahualco, pero ocurrió lo contrario en las plantas que no formaron yema.

Palabras clave: fenología, piñoneros, resistencia a bajas temperaturas, sequía

Introducción

Las heladas, así como el déficit hídrico son factores que limitan la supervivencia (Ewers *et al.*, 2003), así como la distribución de las especies en los ecosistemas (Fernández *et al.*, 2018). Ambos son factores de estrés que afectan los procesos fisiológicos importantes de las plantas (Mayr *et al.*, 2006), particularmente el transporte de agua dentro de la planta, así como el intercambio de gases, que generalmente se ve disminuido por la embolia producida por las heladas y el cierre de estomas provocado por el déficit hídrico (Willson y Jackson, 2006). Debido a que la hidratación se reduce, la planta se puede dañar, reducir su productividad y eventualmente morir (McDowell, 2011).

El establecimiento de plantas fuera de su área de distribución altitudinal o latitudinal, específicamente a lugares mas fríos, ocasiona daños en las plantas por heladas (Pokman y Sperry, 1997). Debido al embolismo en el xilema por congelamiento, este proceso ocurre cuando el agua presente en los tejidos celulares se congela y los gases que se encuentran disueltos en los tejidos son liberados por su nula solubilidad en el hielo (Sperry y Sullivan, 1992). Por otra parte, cuando ocurre el descongelamiento incita a la alteración de las membranas celulares mediante la deshidratación celular, que puede provocar la ruptura de las membranas celulares (Charrier *et al.*, 2015; Wesley *et al.*, 2015), y ocurre la desnaturalización de proteínas (Siddiqui y Cavicchioli, 2006). Esta desnaturalización es útil en la evaluación de daño, debido a los electrolitos liberados aumentan la conductividad eléctrica del agua destilada (Svejgaard y Douglas, 2004).

Las plantas poseen mecanismos de manera natural para resistir las heladas, como lo es el endurecimiento, que comienza durante el crecimiento a medida que la temperatura disminuye y la duración del día se acorta al acercarse el invierno (Li *et al.*, 2003). Estas señales desencadenan una serie de cambios fisiológicos de las plantas, como el disminuir la cantidad de agua disponible en sus tejidos (Gusta *et al.*, 2004), el cese de crecimiento, la formación de yema, la entrada a latencia y como consecuencia, el inicio de la aclimatación (Li *et al.*, 2005).

Ciertas especies son preferidas para las reforestaciones, esto genera que su germoplasma se mueva indiscriminadamente como es el caso de *Pinus cembroides* Zucc., un pino piñonero de amplia distribución en el territorio mexicano, que crece naturalmente en los estados de Sonora, Chihuahua, Coahuila, Durango, Zacatecas, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo hasta el noroeste de Veracruz, y a una altitud de 1700-2400 m (Perry, 1991; Bailey y Hawksworth, 1992; Farjon y Styles, 1997). Este pino es similar a *P. orizabensis* D.K. Bailey y Hawksworth, que es endémico de los estados de Puebla, Tlaxcala y el centro de Veracruz, por debajo de los 20° de latitud norte (Perry, 1991). Este pino forma parte de la vegetación de transición entre los bosques templados y matorral xerófilo (Granados *et al.*, 2015) y habita en una elevación de 2,300 a 2,700 m (Bailey y Hawksworth, 1992), mayor a la de *P. cembroides*.

La diferencia en latitud así como de los intervalos de elevación de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* hacen que no sean simpátricas (Bailey, 1983; Bailey y Hawksworth, 1992); lo anterior, promueve una distinta adaptabilidad o tolerancia a sequía y heladas (Kreyling *et al.*, 2014). Es importante que se mantengan en sus intervalos de distribución altitudinal debido a posibles diferencias en adaptación a la exposición a las heladas y la tolerancia a la misma (Guillaume *et al.*, 2013). Incluso al establecer reforestaciones con la procedencia incorrecta se alteraría la distribución natural de éstas, además de que se afectaría el desarrollo y supervivencia de las plantas por las diferencias de adaptación al déficit hídrico o a bajas temperaturas (Espinoza *et al.*, 2016).

De acuerdo con la lista roja de la IUCN (2018), *P. cembroides* se encuentra en la categoría de preocupación menor, y *P. orizabensis* en la categoría de peligro de extinción. Ambas están amenazadas por el sobrepastoreo, principalmente caprino, la sobre explotación en la cosecha del piñón, y el aumento de la frontera agrícola, que inciden negativamente en su permanencia. Las dos especies son muy similares, aunque Bailey y Hawksworth (1992) señalan diferencias en árboles maduros y Hernández *et al.*, (2018) a nivel de plántulas. Sin embargo, al estar separados físicamente, a estos piñoneros se les confunde. Ambos producen piñones rosados y se les recolecta indistintamente para los programas de reforestación.

El establecer reforestaciones con germoplasma de un piñonero fuera de la región alteraría la distribución geográfica y por lo tanto su supervivencia. Con base en lo anterior el objetivo de este trabajo fue determinar las diferencias en la tolerancia a heladas de plantas de *P. cembroides* y *P. orizabensis*, creciendo en dos condiciones de humedad (riego y sequía). Se incluyeron varias procedencias de ambos pinos para determinar diferencias geográficas en el nivel del daño ocasionado por las bajas temperaturas.

Materiales y Métodos

Selección de germoplasma

El germoplasma se recolectó en poblaciones naturales de *P. cembroides* y de *P. orizabensis* en los años 2014 y 2015 (Cuadro 1). Se recolectaron conos de 15 árboles sanos de buena conformación de copa, que se encontraran a una distancia mínima de 50 m entre ellos. La semilla se sembró el 15 de enero del 2016 en charolas de plástico de 330 cm³. El sustrato estuvo compuesto de corteza de pino composteada, aserrín y perlita con una proporción de 1:1:1, al cual se le agregó fertilizante de liberación lenta (nutricote 17-7-12) en una dosis de 7 kg por m³. Posteriormente las plantas se dejaron bajo condiciones de riego normal, hasta el 30 de mayo del 2017.

Las plantas se obtuvieron de tres procedencias de *Pinus cembroides* y tres de *P. orizabensis* integradas en un experimento de riego y sequía que se estableció el 30 de mayo del 2017 en un invernadero del Postgrado en Ciencias Forestales, en Texcoco, Estado de México (Capítulo 1).

Las pruebas de tolerancia a bajas temperaturas se realizaron en tres fechas del 2018, el 11 de febrero, 9 de marzo y 22 de marzo. En las dos primeras fechas se utilizaron las seis procedencias (Capítulo 1), mientras que en la última prueba se utilizaron las dos procedencias con daños extremos en las pruebas anteriores. En la primera y segunda prueba se seleccionaron cuatro plantas sin formación de yema de cada población por tratamiento (riego y sequía), ya que cada población tuvo muy pocas plantas con yema formada. De cada planta se extrajeron cinco acículas primarias. En la segunda prueba se utilizaron las mismas plantas que en la primera.

En la tercera prueba se eligieron dos procedencias de cada tratamiento (riego y sequía) que cumplieran con dos criterios, que presentaran plantas en tres estados fenológicos distintos (sin formación de yema, con yema en reposo y con yema en estado de elongación) y que fueran diferentes estadísticamente en el índice de daño por frío que se calculó en las dos primeras pruebas. Con base en esto se eligieron las dos procedencias extremas en resistencia a bajas temperaturas: Colón de *P. cembroides*, la más resistente y Tepeyahualco de *P. orizabensis*, la más susceptible.

De estas dos procedencias se seleccionó una planta de cada repetición por estado fenológico y se extrajeron 20 acículas primarias de cada una de ellas, para las pruebas de tolerancia a bajas temperaturas y determinar el índice de daño (ID).

Prueba de daño por bajas temperaturas

Las acículas se cortaron con una navaja Gillette®, posteriormente se colocaron en una bolsa de plástico con papel humedecido para evitar la deshidratación (Prada, 2015). Cada bolsa se etiquetó con el nombre de la procedencia, la repetición y el tratamiento S0 o S1. Posteriormente se lavaron las acículas con agua destilada para eliminar cualquier impureza. Una vez lavadas se procedió a cortar cada acícula en tres secciones de 1 cm (Sutinen *et al.*, 1992), y nuevamente se volvieron a lavar.

En las primeras dos pruebas se incluyeron las dos especies con sus tres procedencias x 2 tratamientos de humedad x 4 repeticiones. Cada repetición incluyó las cinco acículas de las cuatro plantas seleccionadas por parcela. La prueba tres incluyó 2 procedencias x 2 tratamientos de humedad x 3 estados fenológicos x 4 repeticiones. En este caso, cada repetición se formó con la muestra de 20 acículas de una planta.

En las tres pruebas cada muestra (repetición) se dividió en dos grupos (sub-muestras) de diez acículas. Un grupo se usó como control y el otro en el tratamiento de exposición a bajas temperaturas (Guillaume *et al.*, 2013). Cada sub-muestra se colocó en un tubo de ensayo con su identificación respectiva. Una de las sub-muestras de cada par se expuso a una temperatura mínima de -20 °C para evaluar la tolerancia a bajas temperaturas, mientras que la sub-muestra control se mantuvo a 5 °C. La temperatura mínima fue seleccionada con base en pruebas preliminares realizadas con el mismo material biológico.

Los tubos de ensayo del tratamiento de tolerancia a bajas temperaturas se colocaron en una cámara de congelamiento controlado donde se configuraron las siguientes condiciones: temperatura de 5 °C por 30 minutos, posteriormente la temperatura descendió a una tasa de 5 °C por hora durante 5 horas y cuando alcanzó la temperatura mínima objetivo (-20 °C) se mantuvo en esta durante 1 hora (Figura 2.1),

periodo de tiempo recomendado para causar daño en otras especies de coníferas (Carles *et al.*, 2008). El tiempo total de la prueba fue de seis horas con 30 minutos.

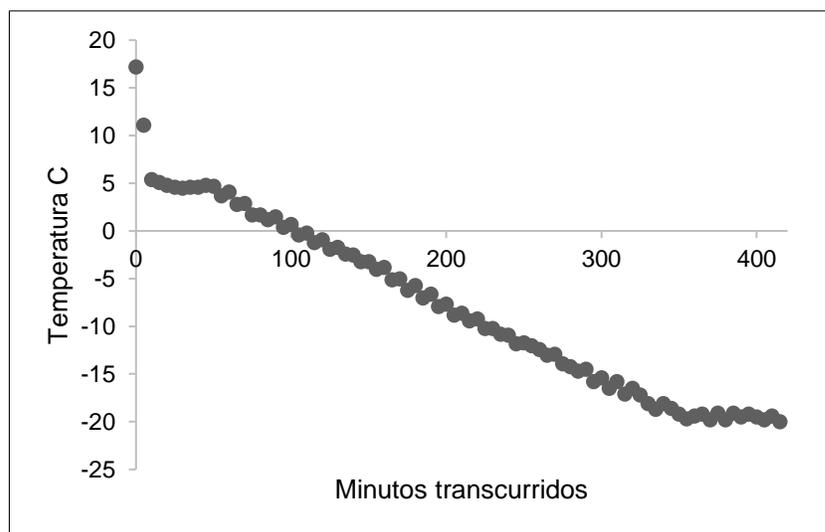


Figura 2.1. Descenso paulatino utilizado en el tratamiento de bajas temperaturas en tres fechas para varias procedencias de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis*.

Evaluación del daño ocasionado por la temperatura

Después de la exposición a bajas temperaturas se dejaron pasar 24 horas para sacar los tubos de ensayo de la cámara y agregarles 35 ml de agua destilada a cada uno de ellos, al igual que a los tubos control. Los dos grupos de sub-muestras se dejaron reposar 23 horas para permitir la liberación de electrolitos. Los tubos se agitaron durante 10 segundos, cada 10 minutos, durante una hora antes de realizar la primera medición de conductividad eléctrica para las sub-muestras del tratamiento (C_{t1}) y del control (C_{c1}).

Tomando como referencia la metodología de Guillaume *et al.* (2013), modificada para el presente estudio, después de la primera medición las sub-muestras se dejaron reposar 12 horas y una vez cumplido el tiempo se procedió a colocarlas en baño maría en un roto-vapor a una temperatura de 90 °C por 30 minutos. Después se dejaron reposar dos horas y se procedió a realizar la segunda medición de conductividad eléctrica (C_{t2} , C_{c2}). La fuga de electrolitos para los dos tipos de sub-muestras se midió

con base en los datos de conductividad relativa, estimada con la siguiente fórmula, ejemplificada para CR_t :

$$CR_t = \frac{C_{t1}}{C_{t2}} * 100$$

Donde CR_t = conductividad eléctrica relativa de las sub-muestras sometidas al tratamiento de bajas temperaturas, C_{t1} = primera medición de conductividad eléctrica, C_{t2} = medición final de conductividad eléctrica, después de someter las sub-muestras al baño maría. Con los datos de CR_t y CR_c (estimada para las sub-muestras control) se calculó el índice de daño para cada muestra de follaje (Flint *et al.*, 1967).

$$ID = \frac{CR_t - CR_c}{1 - \left(\frac{CR_c}{100}\right)}$$

Donde ID = índice de daño, CR_t = conductividad relativa de la sub-muestra sometida al tratamiento, y CR_c = conductividad relativa de la sub-muestra control.

Análisis estadístico de los datos

En el análisis de los datos de las primeras dos pruebas de tolerancia a las bajas temperaturas se utilizó un modelo de medidas repetidas, en donde los factores ambiente de Sequía (S), Bloques anidados dentro de sequía (B), Especies (E) y Procedencias dentro de Especies (P), con sus interacciones representan el análisis de varianza entre sujetos, y el factor fecha de la prueba (F) y las interacciones de este factor con los anteriores representan el análisis de varianza dentro de sujetos (las medidas repetidas en los mismos individuos). De esta manera, el modelo lineal es:

$$Y_{ijklm} = \mu + S_i + B_{j(i)} + E_k + SE_{ik} + \beta E_{j(i)k} + P_{l(k)} + SP_{il(k)} + \beta P_{j(i)l(k)} + F_m + SF_{im} + EF_{km} + SEF_{ikm} + PF_{l(k)m} + SPF_{il(k)m} + e_{ijklm}$$

Donde Y_{ijklm} es el valor observado en medición realizada en la m-ésima fecha en el individuo de la l-ésima procedencia dentro de la k-ésima especie en el j-ésimo bloque del i-ésimo ambiente de sequía; μ es la media poblacional, S_i es el efecto fijo del i-ésimo ambiente de sequía, $B_{j(i)}$ es el efecto aleatorio de bloque anidado en el nivel de sequía \sim NID $(0, \sigma^2_{B(S)})$ E_k es el efecto fijo del k-ésima especie, SE_{ik} es el efecto fijo de la interacción del nivel de sequía por especie, $\beta E_{j(i)k}$ es el efecto aleatorio de la interacción bloque por especie \sim NID $(0, \sigma^2_{BE})$, $P_{l(k)}$ es el efecto fijo de la l-ésima procedencia dentro de la k-ésima especie, $SP_{il(k)}$ es el efecto fijo de la interacción nivel de sequía por procedencia dentro de especie, $\beta P_{j(i)l(k)}$ es el efecto aleatorio de la interacción bloque anidado en el nivel de sequía por procedencia dentro de especie \sim NID $(0, \sigma^2_{BP})$, también considerado como error entre sujetos de medición. En el análisis dentro de sujetos, F_m es el efecto fijo de la m-ésima fecha de medición y SF_{im} , EF_{km} , SEF_{ikm} , $PF_{l(k)m}$, y $SPF_{il(k)m}$ son los efectos de interacción de la Fecha de medición con los otros factores descritos anteriormente, y e_{ijklm} es el error experimental \sim NID $(0, \sigma^2_e)$; $i = S_0$ y S_1 ; $j = 1, 2, 3$ y 4 bloques, $k = P. cembroides$ y $P. orizabensis$; $l = 1, 2, 3$ procedencias por especie; $m = 1, 2$ fechas de medición.

En el análisis de los datos de la tercera prueba, se utilizó el siguiente modelo lineal:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + \beta_{j(i)} + P_k + SP_{ik} + \beta P_{j(i)k} + F_l + SF_{il} + PF_{kl} + SPF_{ikl} + e_{ijkl}$$

Donde, Y_{ijkl} es el valor de daño observado en el individuo del l -ésimo estado fenológico de la k -ésima procedencia en el j -ésimo bloque del i -ésimo nivel de sequía; μ es la media poblacional, S_i es el efecto fijo del i -ésimo nivel de sequía, $\beta_{j(i)}$ es el efecto aleatorio de bloque anidado en el nivel de sequía $\sim NID(0, \sigma^2_{B(S)})$, P_k es el efecto fijo de la k -ésima procedencia, SP_{ik} es el efecto fijo de la interacción del nivel de sequía por procedencia; $\beta_{P_{j(i)k}}$ es el efecto aleatorio de la interacción bloque por procedencia $\sim NID(0, \sigma^2_{BP})$, F_l es el efecto fijo del l -ésimo estado fenológico, SF_{il} es el efecto fijo de la interacción nivel de sequía por estado fenológico, PF_{kl} es el efecto fijo de la interacción procedencia por estado fenológico, SPF_{ikl} es el efecto fijo de la interacción nivel de sequía por procedencia y por estado fenológico, y e_{ijkl} es el error experimental $\sim NID(0, \sigma^2_e)$; $i = S_0$ y S_1 ; $j = 1, 2, 3$ y 4 bloques; $k =$ Colón de *P. cembroides*, y Tepeyahualco de *P. orizabensis*; $l =$ tres estado fenológicos: sin yema, yema en letargo y en elongación;

Resultados

Efecto del nivel de sequía en la tolerancia a bajas temperaturas

En las primeras dos pruebas de tolerancia a bajas temperaturas se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en ID entre las condiciones de humedad de las plantas y la fecha en la que se realizó la prueba. En las demás fuentes de variación no se encontraron diferencias significativas (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Análisis de varianza con el modelo de medidas repetidas para el índice de daño en la pruebas de tolerancia a heladas realizadas el 11 de febrero y el 9 de marzo en plantas de las procedencias de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis*, creciendo en dos condiciones de humedad del suelo.

Fuente de variación	Valor de F	Pr > F
<u>Análisis entre sujetos:</u>		
Tratamiento de humedad	9.58	0.0213
Especie	0.81	0.3752
Tratamiento*Especie	0.87	0.3590
Procedencia(Especie)	0.43	0.7886
Tratamiento*Procedencia(Especie)	0.65	0.6316
<u>Análisis dentro de sujetos:</u>		
Fecha	11.98	0.0014
Fecha*Tratamiento	0.73	0.3980
Fecha*Especie	0.69	0.4123
Fecha*Tratamiento*Especie	2.30	0.1382
Fecha*Procedencia(Especie)	0.73	0.5797
Fecha*Tratamiento*Procedencia(Especie)	1.15	0.3488

En la prueba del 11 de febrero, el estrés hídrico impuesto (S1) provocó un aumento de 16.6 % en ID. En condiciones de sequía el ID aumentó 18.1 % en *Pinus cembroides* y 15 % *P. orizabensis* (Figura 4), pero sin diferencias significativas entre ellas. En la segunda prueba, realizada el 9 de marzo, se observó un efecto similar entre los tratamientos de humedad; en este caso la diferencia entre S0 y S1 en ID fue de 12

% (Figura 4). Esta fecha puede considerarse como el de una helada tardía. Sin embargo, ID aumentó 31 % en marzo, con respecto al valor promedio en febrero (Figura 2.2); en riego incrementó 53 %, mientras que en sequía el aumento fue de 18 %. No hubo diferencias significativas entre procedencias y especies, aunque en la gráfica se muestra un mayor daño en *P. cembroides* en la primera fecha de helada tanto en riego como en sequía.

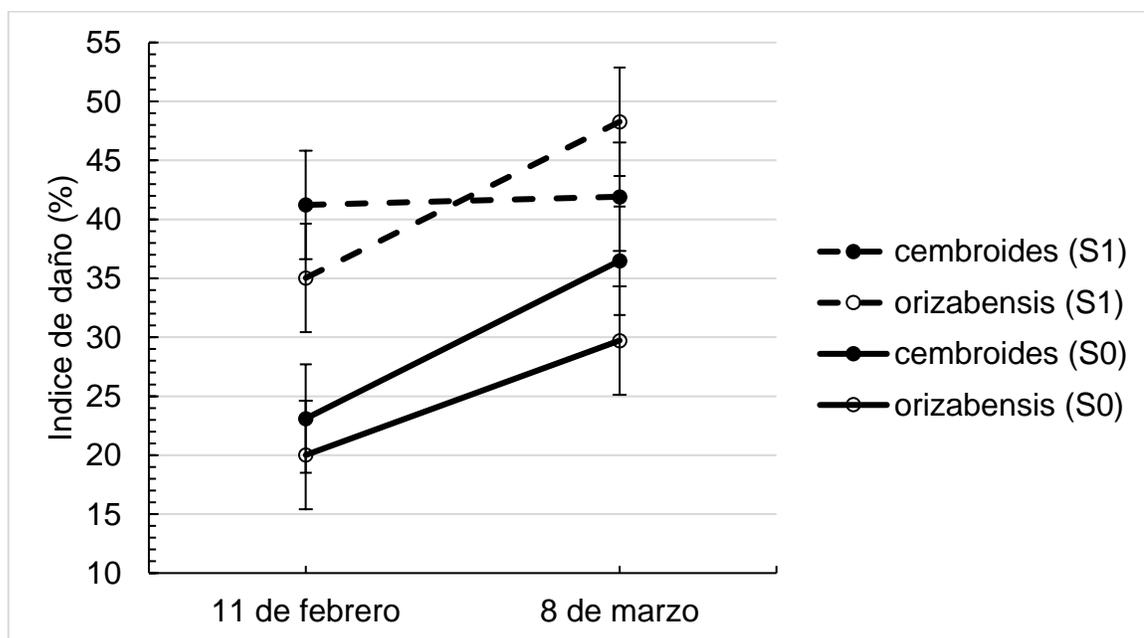


Figura 2.2. Índice de daño (%) por bajas temperaturas en plantas de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* creciendo en dos condiciones de humedad en las pruebas de tolerancia a bajas temperaturas en febrero (primera prueba) y en marzo (segunda prueba).

Efecto del estado fenológico en los daños por bajas temperaturas

En la tercera prueba de bajas temperaturas se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en ID por efecto de la condición de humedad, así como en la interacción de este factor con el estado fenológico y en la interacción de ambos con las poblaciones (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Resultados del análisis de varianza realizado en la tercera prueba de bajas temperaturas (22 de marzo) considerando tres fases fenológicas presentes en las plantas de dos poblaciones (una de *Pinus cembroides* y otra de *P. orizabensis*) creciendo en dos condiciones de humedad (S0 y S1).

Fuente de Variación	Valor de F	Pr>F
Tratamiento	33.36	0.0001
Procedencia	0.40	0.5288
Tratamiento*Procedencia	0.26	0.6145
Fenología	2.34	0.1109
Tratamiento*Fenología	6.69	0.0034
Procedencia*Fenología	0.43	0.6508
Tratamiento*Procedencia*Fenología	6.06	0.0054

En el caso del nivel de humedad, se encontró que en condiciones de sequía las plantas son más susceptibles a las bajas temperaturas (ID = 60 %) que en condiciones de humedad favorable (ID = 49 %). Sin embargo, en condiciones de riego, las plantas con un estado fenológico avanzado (elongación de yema) fueron más dañadas que las plantas que no formaron yema o que estaban con yema en reposo, mientras que, en condiciones de sequía, no hubo diferencias entre los estados fenológicos en ID (Cuadro 2.3). Además, en las plantas en condiciones favorables de humedad, las dos poblaciones se comportaron de manera similar, excepto en las plantas sin formación de yema, en donde la población de Tepeyahualco fue más susceptible al daño por helada. En condiciones de sequía, en cambio, las plantas de la población de Colón (*P. cembroides*) fueron más tolerantes que las de Tepeyahualco cuando presentaron yemas en elongación o letargo, pero más susceptibles cuando no formaron yema (Cuadro 2.4).

Cuadro 2.3. Valores medios y error estándar del índice de daño obtenidos en la tercera prueba de bajas temperaturas (22 de marzo) considerando tres fases fenológicas de las plantas de dos poblaciones creciendo en condiciones de riego y sequía.

Fenología	Índice de daño (ID)	
	Riego (S0)	Sequía (S1)
Elongación	55.74 ± 2.4 a	58.76 ± 2.4 a
Sin formación	49.42 ± 2.4 b	60.01 ± 2.4 a
Letargo	41.68 ± 2.4 c	62.35 ± 2.4 a

Medias en columnas con diferentes letras son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$), comparación entre estado fenológicos dentro de cada nivel de humedad.

Cuadro 2.4. Valores medios y error estándar del índice de daño en la tercer prueba a heladas considerando tres estados fenológicos de plantas de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* creciendo bajos dos niveles de humedad.

Población	Índice de daño (ID) por tipo de estado fenológico de la yema					
	Riego (S0)			Sequía (S1)		
	Elongación	Letargo	Sin yema ⁺	Elongación	Letargo	Sin yema ⁺
Colón [†]	59.7±4.1a	42.6±4.1a	44.2±4.1b	56.0±2.5b	58.2±2.5b	63.4±2.5a
Tepeyahualco [‡]	51.7±4.1a	40.8±4.1a	54.7±4.1a	61.5±2.5a	66.4±2.5a	56.5±2.5b

⁺ Sin yema: Sin formación de yema. [†]*Pinus cembroides* y [‡]*P. orizabensis*. Medias en columnas con diferentes letras son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$), comparación entre especies dentro de cada estado fenológico y nivel de humedad.

Discusión

El daño por heladas puede aumentar cuando las plantas están bajo estrés hídrico (Medeiros y Pockman, 2010), pero esto difiere de acuerdo a la especie. Se ha comentado que estas diferencias se deben al diámetro medio del conducto vascular, ya que entre mayor sea el diámetro mayores posibilidades tienen los árboles de sufrir daño (Feild y Brodribb, 2001). En la prueba del 11 de febrero (invierno), el tratamiento de sequía tuvo mayor índice de daño, 16.6 % más en relación al tratamiento de riego (38.1 vs. 21.5), mientras que en la prueba del 9 de marzo el índice de daño en condiciones de sequía fue 36% más que en humedad favorable (45.1 vs 33.1) y en la tercera prueba el índice de daño en sequía aumentó 25 % más en relación con el daño en condiciones de humedad (49 vs 60.3) por lo que fue consistente. Lo anterior concuerda con lo indicado por Villar *et al.* (2013) de que las sequías extremas incrementan el daño por bajas temperaturas.

La mayoría de las especies entran en letargo en el invierno y salen del mismo en primavera (Morin *et al.*, 2007). Al comparar las pruebas realizadas en las diferentes fechas se constató que el índice de daño promedio aumentó de 29.8 % en la primera evaluación a 39.1 % en la segunda y 54.7 % en la tercera. Aunque en la tercera evaluación no se incluyeron todas las poblaciones incluidas en las pruebas anteriores, si consideramos el daño promedio en las plantas de las dos procedencias en común en todas las pruebas (30.3, 41.7, 54.6 %) se observa el mismo patrón. Estos cambios se pueden deber a que durante el invierno las plantas son menos susceptibles a las heladas debido al estado de latencia, pero conforme se acerca la primavera son más susceptibles por la salida del letargo de los tejidos meristemáticos y el aumento de la actividad metabólica (Guillaume *et al.*, 2013)

El aumento a la resistencia a heladas comienza cuando se acerca el invierno, disminuye el fotoperiodo y la temperatura desciende (Li *et al.*, 2003), provocando una serie de reacciones fisiológicas durante el proceso asociado con la entrada en letargo de las yemas en las plantas (Li *et al.*, 2005). La importancia del estado fenológico del brote terminal y su relación con el estrés hídrico en la tolerancia a las bajas temperaturas se constató en la tercera evaluación, en la que se encontraron diferencias

debidas al estado fenológico de las plantas solo en condiciones de humedad favorable, pero no en condiciones de sequía. En condiciones favorables de humedad, las plantas en estado de letargo sufrieron menos daño por heladas (41.7 %) que las que iniciaron el crecimiento del brote terminal (55.7 %); al parecer, el efecto negativo del estrés hídrico sobre la tolerancia al daño por bajas temperaturas anuló por completo el efecto de la fenología del brote terminal, pues el daño promedio en estas condiciones fue similar para todos los estadios fenológicos (de 58.8 a 62.3 %).

Las dos procedencias contrastantes por su resistencia a las bajas temperaturas en las primeras pruebas continuaron con un comportamiento similar en la prueba realizada al inicio de la primavera. Sin embargo, en la prueba del 22 de marzo el comportamiento de las dos procedencias varió en función del ambiente de humedad y del estadio fenológico de las plantas. En humedad favorable, las plantas de Colón que no formaron yema fueron menos susceptibles que las de Tepeyahualco, pero en condiciones de estrés hídrico ocurrió lo contrario. En los otros estadios fenológicos no se encontraron diferencias entre las procedencias en ID en condiciones de humedad favorable, pero en sequía la procedencia de Colón fue menos susceptible. La procedencia de Colón tiene una rápida respuesta en el mantenimiento de la turgencia celular lo que permite continuar con los procesos fisiológicos (Kramer y Boyer, 1995); tanto en riego como en sequía, como se determinó en el capítulo dos de este documento, en donde esta procedencia acumuló mayor biomasa de tallo y raíz y mayor incremento en diámetro, en comparación con Tepeyahualco en condiciones de humedad favorable. En condiciones de sequía, Colón tuvo mayor incremento en diámetro pero menor longitud de raíz en comparación con Tepeyahualco; lo que hace suponer que Colón es menos susceptible al daño por bajas temperaturas por el mantenimiento de la turgencia celular.

Si consideramos como un estado normal el formar yema y continuar su alargamiento para iniciar el crecimiento del brote terminal durante la primavera, el elegir procedencias como Colón de *P. cembroides* aumentarían la supervivencia de las plantas en climas propensos a heladas. Sin embargo, los resultados obtenidos con esta prueba no concuerdan con lo esperado por el origen de estas procedencias. Colón, Qro. Se encuentra a menor elevación que Tepeyahualco, Pue., y hay una diferencia de

temperatura media de 2.2 °C entre ambas (16 vs. 13.8), además de diferencias en precipitación total anual (626 vs. 491 mm); las plantas de Colon tienen un mejor manejo de los recursos hídricos de acuerdo al capítulo dos de este documento en donde se demuestra que tiene un mejor desempeño en crecimiento y en acumulación de biomasa en comparación a la procedencia de Tepeyahualco. Al parecer, las diferencias entre las especies son más fuertes que las que pudieran provocar las diferencias ambientales de sus orígenes.

Conclusiones

El déficit hídrico afectó de manera negativa la tolerancia a las heladas en invierno aumentando hasta un 15 % el índice de daño. En primavera ocurrió mayor daño en la prueba de bajas temperaturas que en invierno, el aumento de daño al pasar el invierno resultó mayor en condiciones de riego normal que en la de déficit hídrico, por lo que posiblemente en sequía se encuentre al límite de su tolerancia a heladas. La tolerancia a heladas también dependió del estado fenológico en que se encuentran las plantas, en interacción con el ambiente de humedad; en condiciones de humedad favorable, las plantas con yemas en letargo fueron más tolerantes.

En las primeras pruebas de daños por bajas temperaturas no hubo diferencias entre especies. Sin embargo, en la última prueba realizada, las plantas que formaron yemas en la población de *Pinus cembroides* fueron menos dañadas por el frío que las de la población de *P. orizabensis* en condiciones de estrés hídrico. El establecer reforestaciones con el piñonero más resistente en ambientes propensos a heladas aumentaría la supervivencia de éstas, debiendo considerar la procedencia del germoplasma utilizado.

CAPÍTULO III DENSIDAD ESTOMÁTICA EN ACÍCULAS DE *Pinus cembroides* ZUCC. Y *P. orizabensis* D.K. BAILEY Y HAWKSWORTH EN RESPUESTA AL DÉFICIT HÍDRICO.

Resumen

Un mecanismo para resistir el déficit hídrico es el ajuste osmótico, que mantiene la turgencia de las células; sin embargo, este mecanismo limita el crecimiento celular. Al presentarse una reducción en la cantidad de biomasa se modifica el número de estomas y de células por unidad de área foliar. El objetivo fue determinar diferencias entre varias procedencias de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* en las acículas primarias de plantas de 27 meses de edad. Al final de la prueba de sequía se estableció un experimento de riego y sequía con plantas de 16 meses de edad. Se emplearon como macetas tubos de PVC de 10 cm de diámetro por 100 cm de longitud. La humedad del sustrato fluctuó de 45 a 38 % de humedad en S0 (riego) y de 36 a 30 % en S1 (sequía); estas condiciones se mantuvieron por 11 meses. El estrés hídrico provocó una disminución de 25 % en la longitud de la acícula, de 12 % en el tamaño del estoma, el número de estomas por mm lineal aumentó 14.7 %. Con el tamaño de muestra utilizado no se encontraron diferencias significativas entre especies en ambos tratamientos ni entre las procedencias en las variables evaluadas. En condiciones de humedad favorable, no se encontraron diferencias entre los taxa probados en la longitud de las acículas primarias, ni el tamaño y densidad de los estomas en estas acículas.

Palabras clave: Acículas primarias, estomas, estrés hídrico, *Pinus cembroides*, *Pinus orizabensis*, tamaño de acícula.

Introducción

La selección de plantas inadecuadas para las condiciones hídricas del lugar amenaza la supervivencia (Burney *et al.*, 2015), debido a que el déficit hídrico afecta a los procesos fisiológicos de las plantas (Teskey y Hinckley, 1986). El agua es esencial para el crecimiento de las plantas, y el déficit hídrico resulta en una reducción y reorganización metabólica de la planta, para mantener el metabolismo esencial (Hare *et al.*, 2002). Los árboles sobreviven en entornos de déficit hídrico mediante diversos mecanismos de adaptación (Lubczynski, 2009). La respuesta al déficit hídrico varía entre especies (Flores *et al.*, 2018; Warren *et al.*, 2011) y procedencias de una especie (Martínez *et al.*, 2002; Martiñón *et al.*, 2010; Aranda *et al.*, 2017). Uno de los mecanismos por los que las plantas hacen frente al déficit hídrico es el ajuste osmótico, para mantener la turgencia celular positiva (Kramer y Boyer, 1995) y el crecimiento celular no se vea afectado (Kramer y Boyer, 1995); sin embargo, cuando el déficit hídrico no es totalmente compensado por el ajuste osmótico, el crecimiento de la planta se reduce, el tamaño y densidad de los estomas es afectado debido a que su número está limitado por el área foliar disponible (Franks y Beerling, 2009).

Los estomas controlan el balance del agua en la planta y el intercambio de gases en la hoja, mediante el cierre y la apertura del ostiolo (Düring, 2003). El tamaño y la densidad de estomas varía en las superficies abaxial y adaxial de la acícula, además su función reguladora de intercambio de gases es afectada por los factores ambientales como la temperatura, luz, humedad relativa, y la disponibilidad de agua, (Rahnama *et al.*, 2010). En las plantas existe una considerable variación en la frecuencia y tamaño de los estomas (Zarinkamar, 2007). Se ha demostrado que las especies con estomas grandes y menor densidad tienen una mayor eficiencia en el uso del agua, contrario con las especies que tienen mayor densidad y estomas de menor tamaño (Drake *et al.*, 2013). Incluso los estomas son utilizados como indicadores de cambios ambientales (Case, 2006), ya que su densidad aumenta o disminuye de acuerdo a la disponibilidad de agua y la fluctuación de la temperatura, lo que se ha relacionado además a su ubicación geográfica o procedencia de una especie (Edward y Meidner, 1978; Retallack, 2001).

Existen especies arbóreas que han evolucionado para soportar ciertos niveles de déficit hídrico, entre ellos los pinos piñoneros, entre los que destacan *Pinus cembroides* Zucc. y *P. orizabensis* D.K. Bailey y Hawksworth, que además producen semillas comestibles muy apreciados por el valor alimenticio. Ambos pinos forman parte de la vegetación de transición entre bosques templados y matorral xerófilo (Pompa y Yerena, 2014; Granados *et al.*, 2015). *P. cembroides* tiene una amplia distribución en México, se localiza a una elevación de 1700 a 2400 m en los estados de Sonora, Chihuahua, Coahuila, Durango, Zacatecas, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo y hasta el noroeste de Veracruz (Perry, 1991; Bailey y Hawksworth, 1992; Farjon y Styles, 1997). *P. orizabensis* habita de 2300 a 2700 m en elevación, se distribuye por debajo de los 20° de latitud norte, endémica de los estados de Puebla, Tlaxcala y el centro de Veracruz (Perry, 1991; Bailey y Hawksworth, 1992). Estos pinos son similares, aunque Bailey y Hawksworth (1992) señalan diferencias en árboles maduros mismas que se observan a nivel de plántulas (Hernández *et al.*, 2018). Sin embargo, al estar separadas físicamente se le confunde, ambos producen piñones rosados y se les recolecta indistintamente para los programas de reforestación. *P. cembroides* se encuentra en la lista roja de la (IUCN, 2018) como preocupación menor, mientras *P. orizabensis* está indicada como en peligro de extinción. Ambas están amenazadas por el sobrepastoreo, el aumento de la frontera agrícola y la sobre explotación del piñón (Luna *et al.*, 2008; Granados *et al.*, 2015).

Los efectos del déficit hídrico en las procedencias pueden ser determinados por cambios en el tamaño y densidad de los estomas. Con base en esta información es factible determinar si es adecuado desplazar las especies y procedencias de su área de distribución, ya que se podría afectar el desarrollo y supervivencia de las plantas (Espinoza *et al.*, 2016). Por lo anteriormente expuesto, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del déficit hídrico en el crecimiento de acículas primarias y el tamaño y frecuencia de estomas en plantas de diferentes procedencias de *P. cembroides* y *P. orizabensis*.

Materiales y Métodos

Se recolectó germoplasma en 2014 y 2015 en seis procedencias naturales de *P. cembroides* y *P. orizabensis* (Cuadro 3.1). En cada localidad se recolectaron 15 árboles con buena conformación de copa, sanos y que estuvieran separados a un mínimo de 50 m entre ellos. La siembra de la semilla se realizó en tubetes de plástico de 330 cm³ el 15 de enero del 2016. El sustrato que se utilizó tuvo una composición de corteza de pino composteada, aserrín y agrolita con una proporción 1:1:1 respectivamente, con fertilizante de liberación lenta (nutricote 17-7-12) con una proporción de 7 kg por m³. Las plantas de mantuvieron en riego normal hasta el 30 de mayo del 2017. Para fines de esta evaluación se seleccionaron plántulas de las 6 procedencias.

Cuadro 3.1. Ubicación de las procedencias de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* utilizadas en el estudio.

Procedencias	Latitud N	Longitud O	Altitud	PP (mm) [†]
<i>Pinus cembroides</i>				
El Carrizal, Colón, Qro.	20° 52' 40"	100° 05' 07"	2,159	626
La Laja, Cadereyta, Qro.	20° 48' 44"	99° 38' 19"	2,831	890
La Florida, Santiago de Anaya, Hgo.	20° 28' 36"	98° 59' 02"	2,002	511
<i>Pinus orizabensis</i>				
Tepeyahualco, Tepeyahualco, Pue.	19° 30' 26"	97° 30' 26"	2,417	491
Rancho Domínguez, El Carmen, Tlax.	19° 24' 01"	97° 42' 44"	2,671	565
Las Cuevas, Altzayanca, Tlax.	19° 22' 44"	97° 43' 02"	2,479	573

[†]Datos obtenidos en cada población con un geoposicionador Garmin® Etrex 10 Datum WGS84.

[‡] Temperatura media anual y precipitación media anual se obtuvo mediante el software ANUSPLIN, que modela datos en superficies geográficas considerando la latitud (Sáenz-Romero, 2011).

Establecimiento del experimento

El experimento se inició el 30 de mayo del 2017 en un invernadero en Texcoco, Estado de México. Se realizó una selección de plantas de altura homogénea (Martiñón *et al.*, 2010). Como envases de crecimiento se utilizaron tubos de PVC de 10 cm de

diámetro y 100 cm de longitud, con la finalidad de no suprimir el crecimiento radical. El diseño utilizado fue en parcelas divididas, con dos niveles de riego S0 (riego) y S1 (sequía), 480 plantas experimentales en total.

El sustrato utilizado se compuso de material de aserrío composteado y tepezil en una proporción de 1:1, el cual fue mezclado y esterilizado previamente a una temperatura de 90 °C por 5 h. El sustrato no incluyó la adicción de fertilizante debido a que éste ocasiona interacción en la tolerancia al estrés (Villar *et al.*, 2013). En el Laboratorio de Física de Suelos en el Colegio de Postgraduados se realizó el análisis del sustrato. Se determinó la capacidad de campo (0.03 MPa) y el punto de marchites permanente (1.5 MPa) con la finalidad de determinar los niveles de humedad en cada nivel de riego. Además, se determinó el pH (6.6), conductividad eléctrica (1.5 dSm⁻¹), % de materia orgánica (14.4 %), nitrógeno (0.13 %), fósforo (0.01 mg Kg⁻¹), sodio (0.08 cmol (+) Kg⁻¹) y potasio (0.15 cmol (+) Kg⁻¹).

Para determinar el momento oportuno de riego se utilizó el método gravimétrico. En S0 (riego) se permitió que la humedad fluctuara de 45 a 38 % de humedad, mientras que en S1 (sequía) fluctuó de 36 a 30 % de humedad. El agua se repuso cuando se alcanzó el mínimo de humedad permitido para cada tratamiento, condiciones que se mantuvieron durante 11 meses.

Evaluación de características anatómicas

Después de 11 meses de crecimiento bajo los dos niveles de humedad, se realizaron pruebas preliminares para determinar la zona de muestreo dentro de las acículas. Se determinó que la densidad estomática se mantenía estable en la parte media de la superficie adaxial de la acícula, por lo que se definió como área a muestrear.

De cada tratamiento S0 (riego) y S1 (sequía) se seleccionaron 24 plantas de manera aleatoria; cuatro plantas de cada una de las seis poblaciones. De la parte media de cada planta seleccionada se extrajeron tres acículas jóvenes completamente desarrolladas. Se midió la longitud de la acícula con una regla graduada en mm y posteriormente, en la parte media de la superficie adaxial de cada acícula se aplicó

pegamento de secado rápido Kola Loka®, e inmediatamente fueron colocadas sobre un portaobjetos durante 20 segundos. Al retirar las acículas queda una impresión de la epidermis en el portaobjetos.

Densidad y tamaño de estomas

Las mediciones y conteo de células se realizaron con un microscopio óptico marca ZEISS®, utilizando el objetivo de 40X. Para obtener el tamaño de los estomas se utilizó una reglilla ocular que fue posteriormente calibrada en milímetros mediante el uso de una regla micrométrica. Las mediciones de cada acícula fueron realizadas en tres campos diferentes y los estomas medidos fueron seleccionados al azar a lo largo y ancho de la impresión de epidermis, en total de cada impresión se midieron 3 estomas, o sea 12 estomas por tratamiento por procedencia; los valores obtenidos se reportaron en μm , tomando como referencia la metodología de Lopez y Muñoz (1991) modificada para el presente estudio.

Para obtener la densidad de estomas, se contó el número de estomas de manera lineal en tres campos por acícula. Posteriormente se midió el diámetro del campo para determinar el número de estomas por mm lineal.

Análisis

Los valores de los tres campos por acícula y las tres acículas medidas en cada planta se promediaron, por lo que se obtuvieron 48 datos por variable. Con estos datos para cada una de las cuatro variables determinadas (longitud de acícula, tamaño de estomas, densidad de estomas y número total de estomas por acícula) se realizó un análisis de varianza con el procedimiento MIXED de SAS (SAS Institute, 2002). Se utilizó el siguiente modelo lineal:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + E_j + SE_{ij} + P_{k(j)} + SP_{ik(j)} + e_{ijkl}$$

Donde, Y_{ijkl} es el valor promedio observado en el l -ésimo individuo de la k -ésima procedencia dentro de la j -ésima especie en el i -ésimo ambiente de humedad; μ es la media poblacional, S_i es el efecto fijo del i -ésimo nivel de sequía, E_j es el efecto fijo de la j -ésima especie, SE_{ij} es el efecto fijo de la interacción del nivel de sequía por especie, $P_{k(j)}$ es el efecto fijo de la k -ésima procedencia dentro de la j -ésima especie, $SP_{ik(j)}$ es el efecto fijo de la interacción nivel de sequía por procedencia dentro de especie, y e_{ijkl} es el error asociado a dichos efectos $\sim NID(0, \sigma_e^2)$; $i = S_0$ y S_1 ; $j = P. cembroides$ y $P. orizabensis$; $k = 1, 2, 3$ procedencias por especie (6 en total), $l = 1, \dots, 4$ plantas.

Resultados

El análisis de varianza mostró solo diferencias significativas ($p < 0.01$, Cuadro 3.2) entre los tratamientos de riego y sequía para las variables evaluadas (longitud de acícula, tamaño de estomas y densidad estomatal. Entre especies, procedencias y las interacciones de ambas con los niveles de humedad no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables.

Cuadro 3.2. Valor de significancia (P) del análisis de varianza para las variables de longitud de acícula, tamaño de estomas y densidad de estomas en plantas de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* en dos condiciones de humedad del suelo.

Fuente de variación	Longitud de acícula (mm)	Tamaño de estoma (μm)	Densidad de estomas [†]
Tratamiento de humedad	0.0001	0.0001	0.0003
Especie	0.1522	0.5591	0.7803
Tratamiento*Especie	0.9764	0.6399	0.6305
Procedencia(Especie)	0.5701	0.7986	0.9250
Tratam*Procedencia(Esp)	0.8598	0.4033	0.2563

†. No. de estomas por mm lineal.

El estrés hídrico provocó una disminución de 25 % en la longitud de acícula, mientras que el tamaño de estomas se redujo en un 12 %, (Cuadro 3.3, Figura 3.1).

Cuadro 3.3. Medias y error estándar de las variables de longitud de acícula, tamaño de estoma y densidad de estomas en plantas de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* creciendo en dos condiciones de humedad del suelo.

Trat/Esp [†]	Longitud de acícula (mm)	Tamaño de estoma (μm)	Densidad de estomas [†]
Riego	39.62 ±1.03 a	33.84 ±0.62 a	15.30 ±0.39 b
Sequía	29.58 ±1.03 b	29.84 ±0.62 b	17.54 ±0.39 a
Riego			
<i>P. cembroides</i>	40.67 ±1.23 a	33.37 ±0.88 a	15.36 ±0.56 a
<i>P. orizabensis</i>	38.58 ±1.23 a	34.31 ±0.88 a	15.24 ±0.56 a
Sequía			
<i>P. cembroides</i>	30.58 ±1.23 a	29.79 ±0.88 a	17.33 ±0.55 a
<i>P. orizabensis</i>	28.58 ±1.23 a	29.90 ±0.88 a	17.75 ±0.55 a

†. No. de estomas por mm lineal.

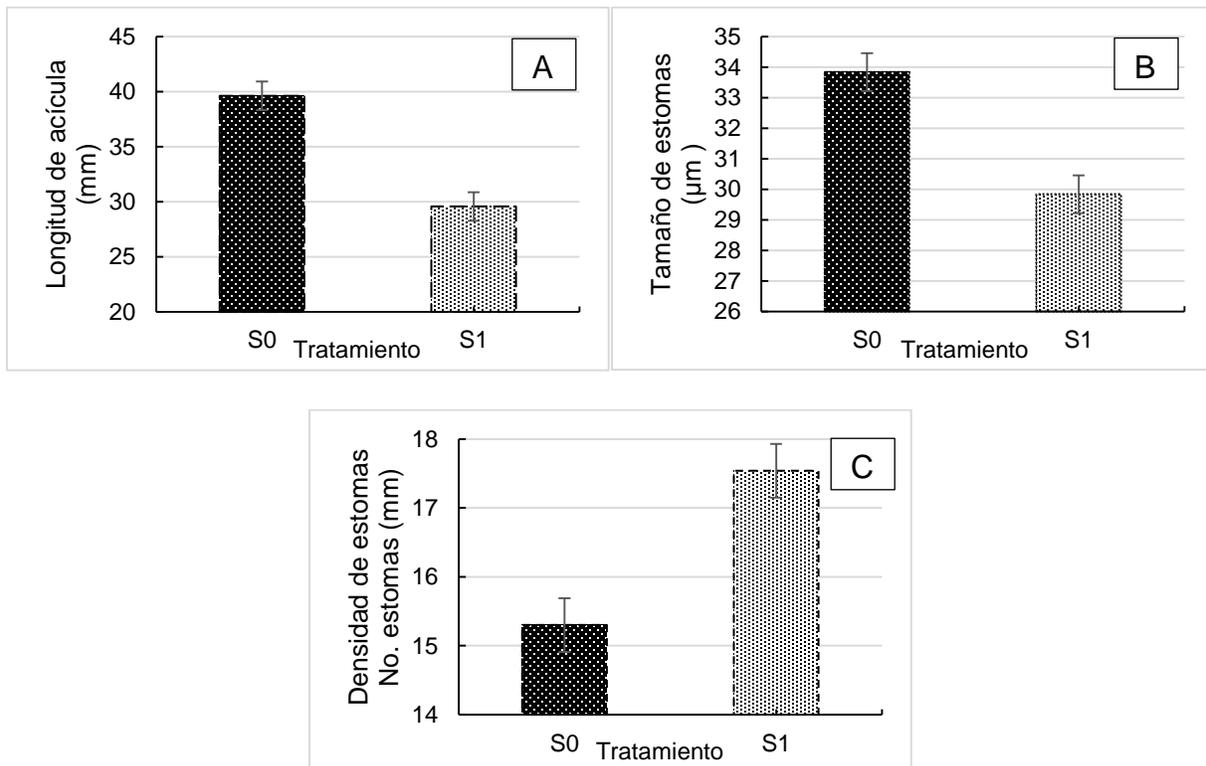


Figura 3.1. Efecto de los tratamientos de riego y sequía en la longitud de acícula (A), tamaño de estoma (B) y densidad de estomas (C) en acículas primarias de plantas de 27 meses de de edad de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* en dos condiciones de humedad (S0 y S1).

En el tratamiento de riego normal, las plantas de *Pinus cembroides* presentaron valores promedio de 40.6 mm, 33.3 μm y 15.3 en las variables de longitud de acícula, tamaño de estoma, densidad de estomas, respectivamente, mientras que *P. orizabensis* obtuvo 38.5 mm, 34.3 μm y 15.2, en las mismas variables. En el tratamiento de sequía, las plantas de *Pinus cembroides* presentaron valores promedio de 30.5 mm, 29.7 μm y 17.3 en las variables de longitud de acícula, tamaño de estoma y densidad de estomas, respectivamente, mientras que *P. orizabensis* obtuvo 28.5 mm, 29.9 μm , y 17.7, en las mismas variables.

No se encontraron diferencias significativas en la variable de densidad de estomas por mm lineal entre especies en ambas condiciones de humedad S0 y S1, por lo que ambas especies en condiciones de riego normal mantienen la densidad estomática, mientras en condiciones de sequía aumenta la densidad, respondiendo de manera similar al cambio en las condiciones de humedad del suelo (Figura 3.2)

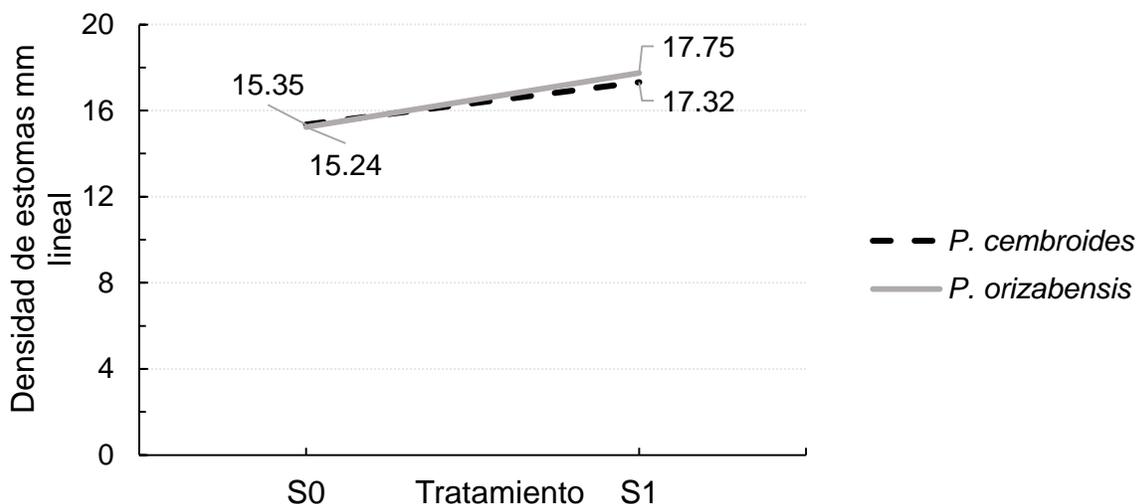


Figura 3.2. Cambios en la densidad de estomas en plantas de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis* al modificarse las condiciones de humedad del suelo de S0 a S1).

Discusión

Debido a los cambios climáticos que se han observado en los últimos años, resulta de vital importancia conocer las respuestas fisiológicas de especies y procedencias que han sido trasladadas a lugares fuera de su origen de distribución. En la presente investigación se observó que el estrés hídrico provocó una disminución en la longitud de las acículas y tamaño los estomas, así como un incremento en el número de estomas por mm lineal; Cuando las plantas se encuentran expuestas a sequía desencadenan adaptaciones fisiológicas como el ajuste osmótico, que les permita seguir desarrollando y creciendo normalmente. A medida que el estrés hídrico se hace más severo, la planta deja de crecer y el tamaño de las células disminuye, el crecimiento de una planta en condiciones de estrés deja de ser prioridad y se inician otros procesos que asegurarán la permanencia de la especie, como la floración y formación de semillas (Grill *et al.*, 2004). Con la reducción el área foliar se reduce el tamaño de los estomas, se ha reportado que ésta adaptación es clave para la resistencia al déficit hídrico (Aasamaa *et al.*, 2001), debido a que los estomas más pequeños limitan la tasa de transpiración al limitar la difusión de vapor de agua, pero también limitan la cantidad de CO₂ disponible resultando en una menor biomasa total de la planta en comparación con aquellas plantas que crecen en condiciones óptimas, (Chaves *et al.*, 2009).

Osakabe *et al.*, (2014) menciona que debido a estas modificaciones morfológicas producto de una tensión ambiental, se afecta la absorción de carbono y por tanto su crecimiento, esto es evidente, ya que si el estoma se encuentra parcialmente abierto para reducir la pérdida de agua por transpiración, la difusión de co₂ al interior de la planta también disminuye, lo que lleva necesariamente a una reducción en la producción de biomasa según Carvalho *et al.* (2017) la reducción de la longitud de las acículas es producto de la reducción en el tamaño y anchura de las células. Estas adaptaciones contribuyen a que se aumente la eficiencia del uso del agua en condiciones de sequía por la reducción de la pérdida de agua por transpiración. Lo

anterior concuerda con lo encontrado, en donde la densidad de estomas por mm aumentó debido a la reducción del tamaño de los mismos (Osakabe *et al.*, 2014).

Los árboles sobreviven al déficit hídrico mediante diversos mecanismos de adaptación (Lubczynski, 2009). Esta adaptabilidad varía entre procedencias de una especie (Aranda *et al.*, 2017). En el presente estudio y bajo el tamaño de muestra utilizado, no se encontraron diferencias entre las especies, ni entre las procedencias dentro de cada una de ellas, en las características de longitud de la acícula, y en el tamaño y densidad de estomas de las acículas primarias, lo que puede indicar que la sequía impuesta ocasionó el mismo efecto en ambas taxa o que realizan la misma estrategia para soportar el déficit hídrico. Después de todo, ambos pinos son morfológicamente similares y pertenecen al mismo grupo de pinos piñoneros, sección Parrya. En los capítulos anteriores si se encontraron diferencias en la resistencia a sequía de las especies, así que las diferencias entre ambas especies y sus procedencias debe involucrar otras características del funcionamiento de los estomas, o la morfológicas del tallo y las raíces como se probó, así como presumiblemente características fisiológicas. Otros trabajos con los mismos materiales han mostrado diferencias entre las especies y estas mismas procedencias (Hernández *et al.*, 2018).

Mediante la regulación de la apertura y cierre del ostiolo, los estomas controlan el balance hídrico de la planta, así como el intercambio gaseoso (Düring, 2003). La reducción en tamaño de los estomas constituye un mecanismo para hacer frente al déficit hídrico que, junto con el mantenimiento de la turgencia celular, son importantes para el crecimiento celular (Kramer y Boyer 1995).

Conclusiones

El déficit hídrico disminuyó el tamaño celular por lo que disminuyó el tamaño del estoma y la longitud de las acículas primarias en cambio, al disminuir el tamaño celular se aumentó la densidad de estomas por mm lineal.

Bajo el tamaño de muestra utilizado no se encontraron diferencias significativas entre especies ni entre las procedencias en la longitud de acículas primarias, el tamaño de estomas y la densidad estomatal en las plantas de 27 meses de edad que crecieron por 11 meses en dos condiciones de humedad del suelo.

CONCLUSIONES GENERALES

El déficit hídrico provocó una disminución en el tamaño del estoma y posiblemente el de las células, lo que provocó que longitud de acícula se redujera, aumentando la densidad estomática. A su vez, al parecer hubo una disminución en la tasa de absorción de CO₂, por lo que se redujo el crecimiento en altura, diámetro, longitud de raíz y número total de ramas, disminuyendo las variables de biomasa aérea, del tallo, de las acículas, de ramas y de la raíz. Así mismo, el déficit hídrico afectó de manera negativa la tolerancia a las heladas obteniendo un 15 % más de daño en invierno en comparación del tratamiento de riego, mientras que en la transición de invierno a primavera en el tratamiento de sequía se mantuvo el mismo efecto en la resistencia al frío; esto es, el estrés hídrico hace menos resistentes al frío a las plantas de estos pinos.

Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre especies en las variables de porcentaje de plantas con presencia de hojas secundarias, acumulación de biomasa radical y resistencia a heladas para ambos tratamientos S0 y S1. *Pinus cembroides* en cada una de estas variables obtuvo resultados mayores, por lo que podríamos aseverar que tendría más posibilidades de supervivencia en una sequía más pronunciada en comparación con *P. orizabensis*.

No se encontraron diferencias entre las procedencias probadas en el tamaño de estomas y densidad estomática en ambos tratamientos; esto podría deberse al tamaño de muestra utilizado por lo que habría que aumentar el tamaño de muestra en estudios posteriores. Sin embargo en S0 los estomas de mayor tamaño fueron de Alzayanca de *P. orizabensis* y los más pequeños de Santiago de Anaya de *P. cembroides*. Mientras que en S1 los estomas de mayor tamaño fueron de Tepeyahualco de *P. orizabensis* y los de menor tamaño de Alzayanca de *P. orizabensis*. en S0 la mayor densidad la obtuvo Santiago de Anaya y la de menor densidad la de Colón, ambas de *P. cembroides*. En cambio, en el tratamiento de S1 la mayor densidad la obtuvo Alzayanca de *P. orizabensis* y la menor Santiago de Anaya de *P. cembroides*. Por lo que esto podría estar relacionado con la productividad de las procedencias, debido a que las de mejor comportamiento al déficit hídrico, así como la disponibilidad de agua

son Santiago de Anaya de *P. cembroides* y El Carmen de *P. orizabensis*, esto debido al parecer a su mayor sistema radical, asociado a una mayor productividad. Para la resistencia a heladas se concluyó que Colón es la procedencia más resistente, y que la tolerancia a las heladas depende del estado fenológico en el que se encuentran las plantas, cuando se encuentran en letargo son más resistentes, mientras que cuando no se presenta formación de yemas son medianamente resistentes, y cuando se encuentran en elongación de brote es cuando son menos resistentes.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que hay una variabilidad geográfica entre procedencias en respuesta al déficit hídrico en crecimiento y biomasa, en cambio en la resistencia a heladas hubo diferencias entre especies, de acuerdo al estado fenológico en el que se encontraban. Pero no la hubo en las variables de longitud de las acículas primarias y de estomas y en la densidad estomática. Los capítulos II y III demostraron diferencias en resistencia a sequía, así que las diferencias entre ambas especies y sus procedencias debe involucrar otras características del funcionamiento de los estomas, además de las características morfológicas del tallo y las raíces como se probó, así como presumiblemente otras características fisiológicas. Otros trabajos con los mismos materiales han mostrado diferencias a nivel plántulas entre las especies y estas procedencias (Hernández *et al.*, 2018).

LITERATURA CITADA

- Aasamaa, K., A. Sober and M. Rahi. 2001. Leaf anatomical characteristics associated with shoot hydraulic conductance, stomatal conductance and stomatal sensitivity to changes of leaf water status in temperate deciduous trees. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 765-774.
- Allen, D. C., D. D. Breshears and N. G. McDowell. 2015. On Underestimation of global vulnerability to tree mortality and forest die-off from hotter drought in the Anthropocene. *Ecosphere* 6: 1-55.
- Aranda, I., D. Sánchez-Gómez, M. Miguel, J. A. Mancha, M. Angeles G., E. Cadahía and M. B. Fernández S. 2017. *Fagus sylvatica* L. provenances maintain different leaf metabolic profiles and functional response. *Acta Oecologica* 82: 1-9.
- Bailey, D. K. 1983. A new allopatric segregate form and a new combination in *Pinus cembroides* Zucc. at its southern limits. *Phytologia* 54: 90.
- Bailey, D. K. and F. G. Hawksworth. 1992. Change in status of *Pinus cembroides* subsp. *orizabensis* (Pinaceae) from central México. *Novon* 2: 306-307.
- Birchler, T., R. W. Rose, A. Royo y M. Pardos. 1998. La planta Ideal: Revisión del concepto, parámetros definitorios e implementación práctica. *Investigación Agraria, Sistemas y Recursos Forestales* 7: 109-121.
- Burney, O., A. Aldrete, R. Álvarez-Reyes, J. A. Prieto-Ruíz, J. R. Sánchez-Velázquez and J. G. Mexal. 2015. México-Addressing challenges to reforestation. *Journal of Forestry* 113: 404-413.
- Carles, S., M. S. Lamhamedi., D. C. Stowe., H. A. Magnolis., P. Y. Bernier, L. Veilleux and B. Fecteau. 2008. Frost tolerance of two-year-old *Picea glauca* seedlings grown under different irrigation regimes in a forest nursery. *Scandinavian Journal of Forest Research* 23: 137-147.
- Carvalho, A., I. Pavia, C. Fernandes, J. Pires, C. Correia, E. Bacelar, J. Moutinho P., M. J. Gaspar, J. Bento, M. E. Silva, J. L. Lousada and J. Lima B. 2017. Differential

- physiological and genetic responses of five European Scots pine provenances to induced water stress. *Journal of Plant Physiology* 215: 100-109.
- Case, S. B. 2006. Leaf stomata as bioindicators: stimulating student research. *American Biology Teacher* 68: 88-91.
- Charrier, G., J. Ngao, M. Saudreau and T. Améglio. 2015. Effects of environmental factors and management practices on microclimate, winter physiology, and frost resistance in trees. *Frontiers in Plant Science* 6: 1-18.
- Chaves, M. M., J. Flexas and C. Pinheiro. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103: 551-560.
- Cregg, B. M. 1994. Carbon allocation, gas exchange, and needle morphology of *Pinus ponderosa* genotypes known to differ in growth and survival under imposed drought. *Tree Physiology* 14: 883-898.
- Cregg, B. M., J. M. Olivas-García and T. C. Hennessey. 2000. Provenance variation in carbon isotope discrimination of mature ponderosa pine trees at two locations in the Great Plains. *Canadian Journal of Forest Research* 30: 428-439.
- Dobbertin, M., B. Eilmann., P. Bleuler., A. Giuggiola., E. Graf P., W. Landolt., P. Schleppi and A. Rigling. 2010. Effect of irrigation on needle morphology, shoot and stem growth in a drought-exposed *Pinus sylvestris* forest. *Tree Physiology* 30: 346-360.
- Drake, L. P., R. H. Froend and P. J. Franks. 2013. Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. *Journal of Experimental Botany* 64: 495-505.
- Düring, H. 2003. Stomatal and mesophyll conductances control CO₂ transfer to chloroplasts in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis* 42: 65-68.
- Edwards, M. and H. Meidner. 1978. Stomatal response to humidity and the water potentials of epidermal and mesophyll tissue. *Journal of Experimental Botany* 29:771-780.

- Eilmann, B. and A. Rigling. 2012. Tree-growth analyses to estimate tree species drought tolerance. *Tree Physiology* 32: 178-187.
- Espinoza, E. S., C. R. Magni., R. E. Santelices, M. Ivković and A. M. Cabrera. 2016. Changes in drought tolerance of *Pinus radiata* in Chile associated with provenance and breeding generation. *Annals of Forest Science* 73: 267-275.
- Ewers, F. W., M. C. Lawson, T. J. Bowen and S. D. David. 2003. Freeze/thaw stress in *Ceanothus* of southern California Chaparral. *Ecophysiology* 136: 213-219.
- Farjon, A. y B. Styles. 1997. *Pinus* (Pinaceae). *Flora Neotropica* 75. The New York Botanical Garden, Bronx, Nueva York. 291 p.
- Feild, T. S. and T. Brodribb. 2001. Stem water transport and freeze-thaw xylem embolism in conifers and angiosperms in a Tasmanian treeline heath. *Oecologia* 127: 314-320.
- Fernández, P. L., P. Villar S., J. Martínez V., A. Toca and M. A. Zavala. 2018. Distribution of pines in the Iberian Peninsula agrees with species differences in foliage frost tolerance, not with vulnerability to freezing-induced xylem embolism. *Tree Physiology* 38: 507-516.
- Flint, L. H., B. R. Boyce and D. J. Beattie. 1967. Index of injury – a useful expression of freezing injury to plant tissues as determined by the electrolytic method. *Canadian Journal of Plant Science* 47: 229-230.
- Flores, A., J. Climent, V. Pando, J. López-Upton and R. Alía. 2018, Intraspecific variation in pines from the Trans-Mexican Volcanic belt grown under two watering regimes: Implications for management of genetic resources. *Forests* 9 (71): 1-16.
- Franks, J. P. and D. J. Beerling. 2009. Maximum leaf conductance driven by CO₂ effects on stomatal size and density over geologic time. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 10343-10347.
- Granados, V., R. L., D. Granados S. y A. Sánchez G. 2015. Caracterización y ordenación de los bosques de pino piñonero (*Pinus cembroides* subsp.

- orizabensis*) de la cuenca oriental (Puebla, Tlaxcala y Veracruz). *Madera y Bosques* 21: 23-42.
- Grill, D., M. Tausz., U. Pollinger, M. S. Jiménez and D. Morales. 2004. Effects of drought on needle anatomy of *Pinus canariensis*. *Flora – Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 199: 85-89.
- Guillaume, C., C. Hervè and A. Thierry. 2013. Evaluation of the impact of frost resistances on potential altitudinal limit of trees. *Tree Physiology* 33: 891-902.
- Gusta, L. V., M. Wisniewski, N. T. Nesbitt and M. L. Gusta. 2004. The effect of water, sugars, and proteins on the pattern of ice nucleation and propagation in acclimated and nonacclimated canola leaves. *Plant Physiology* 153: 1642-1653.
- Hare, D. P., W. A. Cress and J. van Staden. 2002. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell and Environment* 21: 535-553.
- Hernández, A., A. L., J. López Upton, C. Ramírez Herrera. y A. Romero Manzanarez. 2018. Variación en germinación y vigor de semillas de *Pinus cembroides* y *P. orizabensis*. *Agrociencia* 52: 1161-1178.
- Hernández, M., M. M., J. Islas G. y V. Guerra C. 2011. Márgenes de comercialización del piñón (*Pinus cembroides* subsp. *orizabensis* en Tlaxcala, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 12: 265-279.
- IUCN, 2018. Red List of Threatened Species: <http://www.iucnredlist.org/search>
- Kramer, P. and J. Boyer. 1995. *Water Relation of Plants and Soils*. Academic Press. San Diego, California. 495 p.
- Kreyling, J., S. Schmid and G. Aas. 2015. Col tolerance of tree species is related to the climate of their native ranges. *Journal of Biogeography* 42: 156-166
- Li, C., A. Welling, T. Puhakainen, A. Vihera-Aarnio, A. Ernsten, O. Junttila, P. Heino and E. T. Palva. 2005. Differential responses of silver birch (*Betula pendula*) ecotypes to short-day photoperiod and low temperature. *Tree Physiology* 25: 1563-1569.

- Li, C., O. Junttila, A. Ernstsén, P. Heino and E. T. Palva. 2003. Photoperiodic control of growth, cold acclimation and dormancy development in silver birch (*Betula pendula*) ecotypes. *Physiologia Plantarum* 117: 206-212.
- Little, E. 1987. Los pinos piñoneros de los Estados Unidos: su pasado y futuro. *In*: M. Passini, D. Cibrián T. y T. Eguluz P. II Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México. pp: 21-28.
- López, U. J. y A. Muñoz O. 1991. Selección familiar por tolerancia a sequía en *Pinus greggii* Engel I: evaluación en plántula. *Agrociencia* 2: 111-123.
- Lubczynski, W. M. 2009. The hydrogeological role of trees in water-limited environments. *Hydrogeology Journal* 17: 247-259.
- Luna, C., M., A. Romero M. y E. García M. 2008. Afinidades de la flora genérica de piñonares del norte y centro de México: un análisis fenético. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 79: 449-458.
- Martínez, T. T., J. J. Vargas H., J. López U. y A. Muñoz O. 2002. Respuesta al déficit hídrico en *Pinus leiophylla*: acumulación de biomasa, desarrollo de hojas secundarias y mortandad de plántulas. *Terra Latinoamericana* 20: 291-301.
- Martiñón, M., R. J., J. J. Vargas H., J. López U., A. Gómez G. y H. Vaquera H. 2010. Respuesta de *Pinus pinceana* Gordon a estrés por sequía y altas temperaturas. *Revista Fitotecnia Mexicana* 33: 239-248.
- Matías, L. and A. Jump S. 2012. Interactions between growth, demography and biotic interaction in determining species range limits in a warming world: The case of *Pinus sylvestris*. *Forest Ecology and Management* 282: 10-22.
- Matías, L., P. González D. and A. S. Jump 2014. Larger investment in roots in southern range-edge populations of Scot pine is associated with increased growth and seedling resistance to extreme drought in response to simulated climate change. *Environmental and Experimental Botany* 105: 32-38.

- Mayr, S., U. Hacke, P. Schmid., F. Schwienbacher and A. Gruber. 2006. Frost drought in conifers at the alpine timberline: xylem dysfunction and adaptations. *Ecology* 87: 3175-3185.
- McDowell, G. N. 2011. Mechanisms linking drought, hydraulics, carbon metabolism, and vegetation mortality. *Plant Physiology* 155: 1051-1059.
- Medeiros, S. J. and W. T. Pockman. 2010. Carbon gain and hydraulic limits on water use between size classes of *Larrea tridentata*. *Journal of Arid Environments* 74: 1121-1129.
- Michelot, A., N. Brénda., C. Damesin and E. Dufrêne. 2012. Differing growth responses to climatic variations and soil water deficits of *Fagus sylvatica*, *Quercus petraea* and *Pinus sylvestris* in temperate forest. *Forest Ecology and Management* 265: 161-171.
- Morin, X., T. Améglio., R. Ahas., C. Kurz B., F. Lebourgeois, F. Miglietta and I. Chuine. 2007. Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. *Tree Physiology* 27: 817-825.
- Osakabe, Y., K. Osakabe., K. Shinozaki and L. Sonp T. 2014. Response of plant to water stress. *Plant Physiology* 5: 86.
- Perry, J. P. 1991. *The Pines of México and Central America* Timber Press. Portland Oregon. 231 p.
- Pokman, W. T. and J. S. Sperry. 1997. Freezing-induced xylem cavitation and the northern limit of *Larrea tridentada*. *Oecologia* 109: 19-27.
- Pompa, G. M. y J. I. Yerena Y. 2014. Concentración de carbono en *Pinus cembroides* Zucc: Fuente potencial de mitigación del calentamiento global. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 20: 169-175.
- Prada O., E. M. 2015. *Pinus pinaster* Ait: resistencia a heladas bajo condiciones controladas. Tesis de Doctorado. Universidad de Vigo. 179 p.

- Rahnama, A., R. A. James., K. Poustini and R. Munns. 2010. Stomatal conductance as a screen for osmotic stress tolerance in durum wheat growing in saline soil. *Functional Plant Biology* 37: 255-263.
- Retallack, J. G. 2001. A 300-million-year record of atmospheric carbon dioxide from fossil plant cuticle. *Nature International Journal of Science* 411: 287-290.
- Ripullone, F., M. R. Guerrieri, A. Nole, F. Magnani and M. Borghetti. 2007. Stomatal conductance and leaf water potential responses to hydraulic conductance variation in *Pinus pinaster* seedlings. *Trees* 21: 371-378.
- Sáenz-Romero, C. 2011. Guía para mover altitudinalmente semillas y plantas de *Pinus oocarpa*, *P. devoniana* (= *P. michocana*), *P. pseudostrobus*, *P. patula* y *P. hartwegii* para restauración ecológica, conservación, plantaciones comerciales, y adaptación al cambio climático. Grupo de Trabajo sobre Recursos Genéticos Forestales, Comisión Forestal de América de Norte (COFAN). CONAFOR. 6 p. (<http://www.fs.fed-us/global/nafc/genetics/activities.htm>).
- SAS Institute. 2003. The SAS System for Windows 9.0. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA.
- Siddiqui, K. S. and R. Cavicchioli. 2006. Cold-adapted enzymes. *Annual Review of Biochemistry* 75: 403-433.
- Simeonova, N. P. and C. Z. Hans P. 2011. Combining tree-ring analyses on stems and coarse roots to study the growth dynamics of forest trees: a case study on Norway spruce (*Picea abies* [L.] H. Karst). *Trees* 25: 859-872.
- Sperry, J. S. and J. E. M. Sullivan. 1992. Xylem embolism in response to freeze-thaw cycles and water stress in ring-porous, diffuse-porous and conifer species. *Plant Physiology* 100: 605-613.
- Sutinen, L. M., J. Palta P. and P. Reich B. 1992. Seasonal differences in freezing stress resistance of needles of *Pinus nigra* and *Pinus resinosa*: evaluation of the electrolyte leakage method. *Tree Physiology* 11: 241-254.

- Svejgaard, J. J. and J. Douglas D. 2004. Late autumn frost resistance of twelve north European provenances of *Quercus* species. *Scandinavian Journal of Forest Research* 19: 390-399.
- Teskey, R. O. and T. M. Hinckley. 1986. Moisture: Effects of water stress on trees. *In*: T. C. Hennessey, P. M. Dougherty, S. V. Kossuth and J. D. Johnson (Eds.). *Stress Physiology and Forest Productivity*. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp: 9-33.
- Vargas, P., E. y M. Vanegas L. 2012. Evaluación complementaria del PROCOREF-CONAFOR Ejercicio Fiscal 2011. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Méx. 325 p.
- Vernon, J. M., R. L. Sherriff, P. V. Mantgem and J. M. Kane. 2018. Thinning, tree-growth, and resistance to multi-year drought in a mixed-conifer forest on northern California. *Forest Ecology and Management* 422: 190-198.
- Villar, S., P., J. L. Peñuelas and D. F. Jacobs. 2013. Nitrogen nutrition and drought hardening exert opposite effects on the stress tolerance of *Pinus pinea* L. seedlings. *Tree Physiology* 33: 221-232.
- Warren, R. C., I. Aranda and F. J. Cano. 2011. Responses to water stress of gas exchange and metabolites in *Eucalyptus* and *Acacia* spp. *Plant, Cell y Environment* 34: 1609-1629.
- Weed, S. A., M. P. Ayres and J. A. Hicke. 2013. Consequences of climate change for biotic disturbances in North America forests. *Ecological Monographs* 83: 441-470.
- Wesley, S. J., C. Walters., N. W. Pammenter and P. Berjak. 2015. Why is intracellular ice lethal? A microscopical study showing evidence of programmed cell death in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*. *Annals of Botany* 115: 991-100.
- Willson, J. C. and R. B. Jackson. 2006. Xylem cavitation caused by drought and freezing stress in four co-occurring *Juniperus* species. *Physiologia Plantarum* 127: 374-382.

Zarinkamar, F. 2007. Stomatal observation in Dicotyledons. Pakistan Journal of Biological Sciences 10: 199-219.