



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**Instituto de Investigaciones Agropecuarias y  
Forestales**

**Programa Institucional de Maestría en Ciencias  
Biológicas**

**VARIACIÓN GENÉTICA EN *Abies religiosa* (Kunth)  
Schltdl. et Cham. A LO LARGO DE UN GRADIENTE  
ALTITUDINAL EN RESPUESTA AL ESTRÉS POR  
SEQUÍA**

Tesis que como requisito parcial para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias Biológicas**

presenta:

**BIÓL. CECILIA ZAMORA SÁNCHEZ**

Director:

**DR. CUAUHTÉMOC SÁENZ ROMERO**

Co-Director:

**DR. ROBERTO A. LINDIG CISNEROS**



**Morelia Michoacán, febrero 2020.**

## AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis el Dr. Cuauhtémoc Sáenz Romero, por su confianza, por instruirme, por siempre compartir su conocimiento y hacerse un tiempo para aclarar mis dudas, por siempre buscar la mejor manera para que se desarrollaran los experimentos, por su paciencia, gracias.

A mi co-director, el Dr. Roberto A. Lindig Cisneros, por su gran apoyo y disposición para prestarnos su laboratorio y materiales, por su gran aportación en este proyecto y por siempre estar dispuesto a ayudar.

Al Dr. José Arnulfo Blanco García, por sus valiosas contribuciones, por su entusiasmo y siempre tener una actitud positiva ante cualquier situación.

A la Dra. Mariela Gómez Romero, por su apoyo y valiosas aportaciones, gracias por tu tiempo.

Al Dr. Philippe Lobit, por ayudarme a diseñar uno de los experimentos, por compartir su gran conocimiento, por su paciencia y entrega.

Al Dr. Christian Wehenkel, por permitirme realizar una estancia en su laboratorio, gracias a esta oportunidad aprendí muchas cosas, tuve nuevas experiencias y conocí a personas muy valiosas.

A Ana, por ayudarme a analizar los cientos de muestras en laboratorio, por tu bella amistad, por tu ayuda y tu tiempo, muchas gracias.

A Erika por su gran entusiasmo, por siempre estar dispuesta a ayudar y hacerme reír, por esos abrazos, gracias.

A Esme, mi compañera en esta gran aventura, de principio a fin, por soportarme todo

este tiempo y compartir tantos momentos llenos de emociones ¡tan variadas!, por ayudarme siempre que tenía dudas, por darme ánimos y no dejarme sola, por tu gran apoyo, muchas gracias.

A Esteban y Martha, mis amigos desde la Facultad, por siempre estar al pendiente, apoyándome y dándome ánimos, por su valiosa amistad, gracias.

A mi hermana Nila, mis sobrinas (Sofía y Camila) y mi cuñado Alejandro, por apoyarme de una u otra manera, por siempre estar al pendiente de mí, por acompañarme en este proceso, siempre les estaré agradecida.

A mi hermana Lucy y mi hermano Vicente, que aun en la distancia se hacen presentes, siempre apoyándome y siguiendo cada uno de mis pasos.

A mis padres, por su apoyo incondicional, por confiar en mí, por ser ese pilar que me sostiene, ese motor que activa mis días, los admiro y los quiero mucho.

A Adolfo por ser esa luz que ilumina mi camino, por guiarme, motivarme, ayudarme a crecer y no dejarme caer, por tu gran apoyo para que este trabajo se concluyera de la mejor manera, por tu enorme paciencia, por acompañarme y ser mi cómplice, mil gracias.

Y a todos los que de una u otra forma fueron parte de este proyecto, les agradezco infinitamente.

## CONTENIDO

RESUMEN GENERAL.....	1
SUMMARY .....	2
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
HIPÓTESIS .....	6
OBJETIVOS .....	7
Objetivo general.....	7
Objetivos particulares.....	7
CAPÍTULO I.....	8
RESUMEN .....	8
ABSTRACT .....	10
INTRODUCCIÓN .....	11
MATERIALES Y MÉTODOS .....	14
CAMPO .....	14
LABORATORIO (CÁMARAS DE CRECIMIENTO) .....	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
Campo.....	24
Cámaras de crecimiento.....	26
DISCUSIÓN .....	30
CONCLUSIONES .....	33
LITERATURA CITADA.....	34
CAPÍTULO II.....	39
RESUMEN .....	39
ABSTRACT .....	40
INTRODUCCIÓN .....	41
MATERIALES Y MÉTODOS .....	44
Análisis estadístico. ....	47
RESULTADOS.....	48
Demanda evapotranspirativa: .....	48
Daño por sequía: .....	50
DISCUSIÓN .....	53
CONCLUSIONES .....	54
LITERATURA CITADA.....	55
DISCUSIÓN GENERAL.....	58
CONCLUSIONES GENERALES .....	59

LITERATURA GENERAL ..... 60

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colecta de acículas en el sitio Los Ailes. ....	16
Figura 2. Acomodo de la planta en las cámaras de crecimiento. ....	17
Figura 3. Tubos de ensaye con las acículas maceradas junto con el ácido sulfosalicílico, ácido de ninhidrina y ácido acético gracial .....	18
Figura 4. a) Embudo de separación con la muestra. b) Centrifugación de las muestras. c) Espectrofotómetro para hacer las lecturas.....	19
Figura 5. Tubos de ensaye para la curva de calibración. ....	20
Figura 6. Separación del contenido de un tubo de ensaye para la curva de calibración.....	21
Figura 7. Curva de calibración para determinar el contenido de prolina. ....	22
Figura 8. Acumulacion de prolina por temporadas en el sitio Los Ailes.....	24
Figura 9. Producción de prolina por temporadas en Las Palomas. ....	25
Figura 10. Acumulación de prolina por tratamiento (nodriza y a cielo abierto). ....	25
Figura 11. Regresión de la proporción del incremento de prolina durante la temporada de secas respecto a la de lluvias. ....	26
Figura 12. Cantidad de prolina por tratamiento en cámaras de crecimiento.....	27
Figura 13. Porcentaje de supervivencia de individuos durante el experimento. ....	28
Figura 14. Porcentaje de la supervivencia por procedencia. ....	28
Figura 15. Ejemplo del daño por sequía de algunas plantas, mostrando valores diferentes de dicho daño .....	49
Figura 16. Promedio del consumo de agua de las tres repeticiones para cada procedencia.....	50
Figura 17. Consumo de agua a partir del octavo día del experimento.....	46
Figura 18. Relación entre el consumo de agua y el índice de sequía promedio por procedencia.....	51
Figura 19. Relación entre el peso seco y el consumo de agua promedio por procedencia....	52

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Reactivos y cantidades usadas en cada tubo de ensaye para la determinación de prolina.....	19
Cuadro 2. Absorbancias de la curva de calibración. ....	21
Cuadro 3. Altitud de origen de las siete procedencias utilizadas.....	44
Cuadro 4. Análisis de varianza comparando el tratamiento (con y sin polietilenglicol) con base en el índice de sequía. ....	48
Cuadro 5. ANOVA comparando las siete procedencias, así como las tres repeticiones bajo el tratamiento de polietilenglicol con base en el índice de sequía. ....	48

## RESUMEN GENERAL

El oyamel (*Abies religiosa*) es una especie de gran importancia, tanto económica como ecológica, pues juega un rol muy importante para numerosas especies, entre ellas la mariposa monarca. Desafortunadamente, el cambio climático complica cada vez más la situación de los recursos forestales. Las proyecciones indican que en las próximas décadas habrá temperaturas más cálidas y menor precipitación. Ya se están reflejando las consecuencias del cambio climático en bosques de todo el mundo, donde se ha registrado la muerte masiva de numerosas especies forestales. Las poblaciones de árboles ubicadas en el límite inferior de la distribución natural de una especie (límite xérico) son las que ya están sufriendo un creciente estrés debido a los efectos del cambio climático. Por ello se consideró importante evaluar si las poblaciones ubicadas en el límite xérico responden de manera diferenciada en comparación con poblaciones de otras altitudes ante el estrés hídrico. Para ello se utilizaron la prolina y el polietilenglicol (PEG). En lo que se refiere a la prolina, se evaluó el contenido de este aminoácido en plantas de *A. religiosa* expuestas a estrés hídrico y en plantas que tuvieron suministro normal de agua. Con el polietilenglicol se indujo la sequía a la mitad de las plantas utilizadas y se midió la evapotranspiración para de esta forma ver el efecto que tiene el PEG sobre las plantas de oyamel, también se midió el estrés por sequía en una escala visual del 1 al 6. En ambos casos (prolina y PEG) no hubo diferencia genética significativa entre procedencias, únicamente entre tratamientos. En conclusión, las plantas responden al estrés hídrico produciendo mayor cantidad de prolina que las plantas con riego normal; y las plantas con polietilenglicol bajaron su evapotranspiración en relación con las plantas sin PEG; pero tal respuesta no es diferencial entre procedencias. En lo que se refiere al índice de sequía, las plantas con PEG mostraron valores más altos en dicho índice, es decir, sufrieron más daños que las plantas sin polietilenglicol.

Palabras clave: oyamel, límite xérico, procedencias, prolina, polietilenglicol.

## SUMMARY

*Abies religiosa* is a specie of great importance, both economic and ecological, because it plays a very important role for many species, including the Monarch butterfly. Unfortunately, climate change is complicating the situation of forest resources. Projections indicate that in the coming decades there will be warmer temperatures and less precipitation. The consequences of climate change are already being reflected in forests around the world, where numerous forest species have been died massively. Tree populations located at the lower limit of the natural distribution of a species (xeric limit) are already suffering increasing stress due to the effects of climate change. Therefore, it was important to assess whether populations located at the xeric limit respond differently compared to populations of other altitudes in response to water stress. Proline and polyethylene glycol (PEG) were used for this purpose. As far as proline is concerned, the content of this amino acid was evaluated in plants of *A. religiosa* exposed to water stress and in plants that had normal water supply. With polyethylene glycol, drought was induced to half of the plants used and the other half served as a control lot; evapotranspiration was measured to see the effect that PEG has on this plants and also assessed drought stress on a visual scale of 1 to 6. In both cases (proline and PEG) there was no significant genetic difference between provenances, only between treatments. In conclusion. plants respond to water stress producing more proline than plants with normal irrigation, although such response is not different among provenances; and plants with polyethylene glycol reduced their evapotranspiration in relation to PEG-free plants.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Durante las últimas décadas, se han manifestado con mayor frecuencia los efectos del cambio climático en los bosques de todo el mundo, debido al estrés hídrico y a las temperaturas cada vez más cálidas. Se han encontrado ya afectaciones en África, donde la mayor mortalidad de árboles relacionada con la sequía y el calor incluye bosques húmedos tropicales y árboles de sabana mésicos, entre otros. En Asia la mortalidad de los bosques incluye los bosques húmedos tropicales de Borneo, tanto en Malasia como en Indonesia (algunas especies son *Abies koreana* y *Abies cilicica*, entre otras) (Allen *et al.* 2010). En Australia se ha desencadenado la muerte generalizada de *Eucalyptus* y *Corymbia*, mientras que en Europa aumentó la mortalidad de las especies de encinos, abetos, hayas y pinos después de la ola de calor extremo y la sequía durante el verano de 2003. La sequía y el calor en el oeste de América del Norte han provocado extensos brotes de insectos y mortalidad, afectando a 20 millones de hectáreas y muchas especies de árboles desde 1997, desde Alaska hasta México. En el suroeste de los EE. UU., la desaparición de *Pinus edulis* en más de un millón de hectáreas se vinculó específicamente con la sequía relacionada al cambio climático (Allen *et al.* 2010). Recientemente en Australia han sucedido incendios catastróficos, donde se puede observar el creciente peligro de habitar en los bosques a medida que el cambio climático hace que los incendios forestales sean más frecuentes e intensos (Albeck-Ripka 2020).

La mortalidad de árboles involucra múltiples factores interactivos, que van desde estrés climático e historias de vida, hasta plagas y enfermedades de insectos. La sequía puede actuar como un desencadenante ("factor de incitación") que conduce a la mortalidad en árboles que ya están bajo estrés (por vejez, las malas condiciones del sitio y la contaminación del aire) y sucumben a daños posteriores por agentes bióticos (insectos perforadores de la madera y patógenos fúngicos) en el tallo y la raíz.

Ningún tipo de bosque o zona climática es invulnerable al cambio climático antropogénico, incluso en ambientes que normalmente no se consideran limitados por el agua. Si se produce una gran mortalidad de árboles inducida por el clima, se pueden esperar consecuencias ecológicas y sociales negativas sustanciales, ya que la

mortalidad de los árboles adultos puede provocar cambios en el ecosistema mucho más rápidamente que una transición gradual impulsada por la regeneración y el crecimiento de los árboles (Allen *et al.* 2010).

Con todos estos cambios en el ambiente, la sensibilidad de la mortalidad de los árboles a la temperatura depende de cuál de los dos mecanismos no mutuamente excluyentes predomina: (a) los árboles cierran los estomas para mantener niveles seguros de presión de xilema deteniendo la mayoría de la fotosíntesis; bajo estas circunstancias, dependen de los carbohidratos almacenados para soportar los costos metabólicos de mantener el tejido y se corre el riesgo de inanición de carbono; o (b) los árboles mantienen la conductancia estomática durante la sequía para continuar la fotosíntesis, pero corren el riesgo de que las presiones del xilema excedan repentinamente los umbrales de cavitación más allá de los cuales las burbujas de aire bloquean el transporte del agua del tallo y se produce una falla hidráulica catastrófica (McDowell 2008).

Debido a los aumentos generalizados de temperatura proyectados, se auguran aumentos en el alcance y la frecuencia de la extirpación de la vegetación. Los efectos consecuentes de la extinción regional de los árboles podrían incluir la reducción del hábitat para la vida silvestre, mayores oportunidades para la invasión de especies exóticas, formación de comunidades nuevas, alteraciones del ciclo hidrológico y alteraciones temporales en los bienes y servicios del ecosistema (Breshears *et al.* 2005; Engelbrecht 2007; Williams 2007).

Las poblaciones de árboles dependen de tres mecanismos de interacción para responder al cambio ambiental: adaptación, plasticidad fenotípica y migración (Davis y Shaw 2001; Jump y Peñuelas 2005). Las adaptaciones genéticas que hacen que una población sea más adecuada para la supervivencia se logran a través de cambios en la frecuencia genética a través de varias generaciones (Koski *et al.* 1997). La plasticidad fenotípica se define como la capacidad de un genotipo particular para expresar diferentes fenotipos en diferentes condiciones ambientales (Jonhsen *et al.* 2005; Pigliucci y Murren 2003). Y finalmente, la migración asistida implica el movimiento humano de semillas y plántulas de árboles desde ubicaciones actuales a

sitios en los que se proyecta experimentarán condiciones ambientales análogas en el futuro (Guariguata *et al.* 2008, McLachlan *et al.* 2007).

En este estudio se consideró la necesidad de evaluar la diferenciación genética entre procedencias de *Abies religiosa*, originadas a lo largo de un transecto altitudinal en respuesta al estrés por sequía, mediante mecanismos como la producción de prolina y la modificación de la tasa de evapotranspiración, para de esta forma ver que tan adaptadas están estas procedencias a la sequía, y así tener una herramienta más ante las proyecciones de cambio climático.

## **HIPÓTESIS**

Se espera que las procedencias originadas a menor altitud, cercanas al límite xérico de la distribución natural de la especie, toleren mejor el estrés hídrico. Y que las plantas sometidas a estrés por sequía produzcan mayor cantidad de prolina, así como las que estuvieron expuestas a polietilenglicol consuman menos cantidad de agua y muestren valores más altos en el índice de estrés por sequía.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- Evaluar la variación genética en *Abies religiosa* a lo largo de un gradiente altitudinal en respuesta al estrés por sequía.

### Objetivos particulares

- Determinar si existen diferencias genéticas entre procedencias para la producción de prolina en respuesta al estrés por sequía.
- Determinar si existen diferencias genéticas entre procedencias en la demanda evapotranspirativa en respuesta al estrés por sequía inducido por polietilenglicol (PEG 8000).

## CAPÍTULO I

**“Variación genética en *Abies religiosa* (kunth) schltl. & cham. a lo largo de un gradiente altitudinal para la producción de prolina como respuesta al estrés por sequía en cámaras de crecimiento y campo”.**

### RESUMEN

*Abies religiosa* es una especie forestal de suma importancia. Desafortunadamente, debido al cambio climático, se encuentra amenazada. Las poblaciones en el límite altitudinal inferior de la distribución altitudinal de una especie, son las que ya están sufriendo estrés debido al cambio climático. En este sentido, la prolina está relacionada con la tolerancia de las plantas a condiciones de estrés, actuando como osmoprotector. En este proyecto se evaluó si plántulas de *Abies religiosa* incrementan sus niveles de prolina como respuesta al estrés por sequía, y si esa respuesta difiere entre procedencias, dependiendo de su origen altitudinal, además de observar el papel de las plantas nodriza. Este experimento se llevó a cabo en campo y en laboratorio (cámaras de crecimiento). En campo se colectaron tres acículas por individuo, de un ensayo de procedencias establecido en el 2017 (sitio los Ailes, 3360 m de altitud en el área núcleo dentro de la Reserva de la Biósfera Mariposa Monarca), donde se seleccionaron al azar 30 bloques bajo nodriza y 20 a cielo abierto (300 individuos en total). Se realizaron dos colectas, en la temporada de lluvias (septiembre 2017) y en la de secas (principios de mayo 2018). En las cámaras de crecimiento se colocaron 259 individuos de *A. religiosa* provenientes de seis diferentes altitudes (mismas procedencias que del experimento en campo), asignados al azar a dos cámaras de crecimiento, con dos tratamientos cada cámara: supresión de riego y riego normal (testigo) a la mitad de los individuos; con un fotoperiodo de 14 horas de día y 10 horas de noche. Dos, cuatro, seis y once semanas después de la supresión del riego, se colectaron tres acículas de cada individuo para la determinación de prolina. En lo que se refiere a las procedencias no hubo diferencias genéticas significativas entre ellas, únicamente entre tratamientos, dónde las acículas colectadas en temporada de lluvias

y las que no tenían riego produjeron mayor cantidad de prolina respecto a las acículas colectadas en temporada de lluvias y las que tuvieron riego normal, respectivamente. También se comprobó la importancia de los arbustos como planta nodriza, ya que las acículas colectadas bajo la sombra de arbusto produjeron menos prolina que las colectadas a cielo abierto.

## ABSTRACT

*Abies religiosa* is a very important forest specie. Unfortunately, due to climate change, it is threatened. Populations in the lower altitude limit of the altitude distribution of a species are already suffering stress due to climate change. In this sense, proline is related to the tolerance of plants to stress conditions, acting as osmoprotective. This project assessed whether *Abies religiosa* seedlings increase their proline levels in response to drought stress, and if that response differs between provenances, depending on their altitude origin, in addition to observing the role of the nurse plants. This experiment was conducted in field and in the laboratory (growth chambers). In field, three needles were collected per individual, from a provenance trial established in 2017 (site Los Ailes, 3360 m altitude in the core area within the Monarch Butterfly Biosphere Reserve), where 30 blocks were randomly selected under nurse plants and 20 without nurse plants (300 individuals in total). Two collections were made, in the rainy season (September 2017) and in the dry season (early May 2018). In the growth chambers were placed 259 individuals from *A. religiosa* from six different altitudes (same provenances as the field experiment), randomly assigned to two growth chambers, with two treatments each chamber: suppression of irrigation and normal irrigation (witness lot) to half of individuals; with a photoperiod of 14 hours of day and 10 hours of night. Two, four, six and eleven weeks after irrigation suppression, three needles were collected from each individual for proline determination. As far as provenances were concerned, there were no significant genetic differences between them, only between treatments, where the needles collected in dry season and those without irrigation produced more proline compared to the needles collected in rainy season and those that had normal irrigation, respectively. The importance of shrubs as a nurse plant was also tested, the needles collected under the shrub shadow produced less proline than those collected in open areas.

## INTRODUCCIÓN

El oyamel (*Abies religiosa*) se distribuye principalmente en el Cinturón Volcánico Transmexicano (Eje Neovolcánico mexicano), generalmente en altitudes entre 2400 y 3600 metros de altitud (Rzedowski 1978); casi siempre sobre suelos profundos, bien drenados, ricos en materia orgánica y húmedos durante la mayor parte del año (SEMARNAT 2014). Económicamente también es muy importante, ya que su madera se usa para la fabricación de papel, vigas para la construcción y de tejamanil para techar habitaciones rústicas, entre otras cosas (Martínez 1963). Desafortunadamente, el cambio de uso de suelo y la tala ilegal constituyen las mayores amenazas para los bosques de *Abies religiosa*. Aunado a esto, el cambio climático complica la situación de los recursos forestales ya que, se espera que, a finales del siglo, ecosistemas enteros estén disociados del clima para el cual están adaptados, y numerosas especies de árboles y poblaciones desaparezcan, a menos que se adapten o emigren (Sáenz-Romero *et al.* 2016). En México, la temperatura media anual podría aumentar en 1.5 °C para el año 2030, 2.3 °C en 2060 y 3.7 °C para el 2090; la precipitación anual disminuirá un 6.7% en el año 2030, un 9% en 2060, y 18.2% para el año 2090 (en comparación al periodo de referencia 1961-1960) (Sáenz-Romero *et al.* 2010), por lo cual las proyecciones sugieren que los biomas de climas áridos se expandirán, y los de pino-encino y coníferas disminuirán (Rehfeldt *et al.* 2012). Especies y poblaciones de árboles forestales han evolucionado para adaptarse al entorno en el cual crecen (Rehfeldt 1988).

Por ello, las poblaciones de especies de árboles forestales ampliamente distribuidas, se diferencian genéticamente a lo largo de gradientes altitudinales con el fin de adaptarse a un intervalo específico del clima que les es propicio (Rehfeldt *et al.* 2002), y a los disturbios ecológicos locales que enfrentan (Alfaro *et al.* 2014). La diferenciación genética quiere decir, que las poblaciones de la misma especie pueden diferir entre sí en uno o más rasgos que les permiten sobrevivir, crecer, competir y reproducirse en un entorno determinado, como lo es la resistencia al daño por heladas o al estrés por sequía (Rehfeldt 1988). En *Abies religiosa* Ortiz-Bibian y colaboradores

(2017) encontraron diferencias genéticas entre poblaciones a lo largo del clin ambiental (de elevación y climático) y diferencia significativa entre las poblaciones en términos de caracteres cuantitativos, esto probablemente como resultado de una presión de selección diferencial a lo largo de un gradiente altitudinal.

Existe evidencia de que las poblaciones en el límite altitudinal inferior de la distribución altitudinal de una especie, que se ha llamado límite xérico, son las que primero sufrirán o ya están sufriendo un creciente estrés debido al cambio climático. Estas poblaciones deben conservarse, ya que probablemente se adaptan mejor al estrés hídrico y, por lo tanto, son genéticamente valiosas (Mátyás 2010). Sería importante determinar si individuos de esas poblaciones son más resistentes a sequía que los de poblaciones ubicadas en la parte media o en la parte superior de la distribución altitudinal.

La prolina es un aminoácido que se encuentra en las plantas en cantidades muy pequeñas, en condiciones adecuadas para el desarrollo y crecimiento. Bajo estrés ambiental, se ha reportado que el contenido de prolina libre puede aumentar con el fin de proteger a la planta contra algunos tipos de estrés. Se ha propuesto que la prolina participa con múltiples funciones y que está relacionada con la expresión de genes de tolerancia de las plantas a diferentes condiciones de estrés, particularmente de temperaturas extremas, actuando como osmoprotector (Moreno 2010).

En este sentido, estudios en diversas especies, tales como cebada (Hanson *et al.* 1979), embriones de encino (Prewein 2004), remolacha (Monreal *et al.* 2005), tomate (Claussen 2005), frijol (Cárdenas-Ávila 2006) y garbanzo (Mafakheri *et al.* 2010), entre otras, confirman la presencia de la prolina en respuesta al estrés hídrico. Así mismo, en coníferas, entre las especies estudiadas para la producción de prolina como respuesta al estrés hídrico, se encuentra *Pinus ponderosa* (Vance y Zaerr 1990), *Pinus patula* (Ortíz 2006) y *Pinus radiata* (De Diego-Sánchez 2012). En *Abies religiosa*, Cruzado-Vargas (2017) realizó un ensayo con plántulas de oyamel en condiciones de casa de sombra con exclusión de lluvia y supresión de riego, para establecer las diferencias en producción de prolina entre procedencias, mediante la determinación del contenido de prolina; sus resultados indican que las plantas produjeron en promedio el doble del aminoácido en el tratamiento de sequía (en comparación a un

control), pero no se encontraron diferencias significativas entre procedencias para la concentración de prolina (datos no publicados).

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento consta de dos partes, una en campo (ensayos de procedencias Los Ailes y Las Palomas, dentro de la zona núcleo de la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca, en el Ejido La Mesa, Municipio de San José del Rincón, Estado de México) y otra en cámaras de crecimiento (en el Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Morelia).

### **CAMPO**

*Colecta de material:*

#### **Los Ailes**

Previo al presente trabajo, las plantas utilizadas se obtuvieron por rescate de plántulas de regeneración natural a lo largo de un gradiente altitudinal, dentro del área de la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca (RBMM) en el Estado de México, diferenciando seis procedencias colectadas a lo largo de un gradiente altitudinal: 2960, 3052, 3157, 3239, 3350 y 3450 msnm (Cruzado-Vargas *et al.* 2020). El método de colecta se realizó mediante una búsqueda dentro de cada sitio altitudinal, escogiendo las plántulas recién emergidas (aún con la semilla de la cual germinaron), con presencia de hojas cotiledonares (sin hojas primarias), a modo de asegurar que la plántula es de la época de germinación inmediata anterior a la colecta (inicio de temporada de lluvias del año 2015); es decir, de reciente germinación en condiciones naturales de campo, con tallo delgado y rosado, vigorosas y altura menor a 5 cm.

Las plántulas se trasplantaron en bolsa de polietileno para vivero de 8 x 7 x 17 cm, con tierra de monte como sustrato. Las procedencias se conservaron identificadas, etiquetándolas individualmente. Las plantas se mantuvieron por dos años en un vivero comunitario en la casa de un ejidatario, Sr. Francisco Ramírez Cruz, muy cercano al sitio de origen de la población número seis (2960 msnm), en el Ejido La Mesa, municipio de San José del Rincón, Estado de México. Las plantas se acomodaron bajo un diseño experimental de bloques completos al azar, en seis bloques con las seis procedencias distribuidas al azar en parcelas de 36 individuos (acomodadas en tres hileras de 12 plantas cada una de la misma procedencia). En el lugar se eliminó la

maleza y se cubrió con una casa de malla sombra al 50%, para evitar la depredación por animales, así como evitar la desecación de las plantas por la exposición excesiva directa al sol, vientos fuertes y daños por granizo (Cruzado-Vargas *et al.* 2020).

En julio del 2017 se estableció un ensayo de procedencias en campo (Los Ailes) con bloques ubicados bajo plantas nodrizas y a cielo abierto (Carbajal-Navarro *et al.* 2019). De este ensayo, se seleccionaron al azar 30 bloques bajo nodriza y 20 a cielo abierto (300 individuos en total); cada bloque contiene seis individuos que representan las seis procedencias antes mencionadas (una planta por procedencia por bloque). Se colectaron tres acículas de cada individuo en la temporada de lluvias (septiembre 2017) y nuevamente tres acículas en la de secas (principios de mayo 2018) (Fig. 1).

### **Las Palomas**

Se realizó la colecta de acículas de un ensayo de procedencias establecido en campo en el 2015 (Carbajal-Navarro *et al.* 2019), del cual se seleccionaron cinco bloques ubicados bajo planta nodriza. Cada bloque contiene 36 individuos que representan 10 procedencias colectadas a lo largo de un gradiente altitudinal, entre 3000 y 3450 msnm; de igual forma, se colectaron tres acículas en temporada de lluvias (septiembre 2017) y tres en la de secas (mayo 2018).



*Figura 1. Colecta de acículas en el sitio Los Ailes.*

### **LABORATORIO (CÁMARAS DE CRECIMIENTO)**

De plántulas derivadas del rescate de plántulas de regeneración natural y producidas en vivero (Cruzado-Vargas *et al.* 2020), se colocaron 259 individuos representando las seis procedencias altitudinales (mismas que se utilizaron en Los Ailes), en dos cámaras de crecimiento controlando la temperatura (25 °C) y dos tratamientos de riego (riego a capacidad de campo y suspensión del mismo, a la mitad de los individuos por un periodo de 75 días), con fotoperiodo de 14 horas luz y 10 horas de oscuridad. Se realizaron cuatro colectas de acículas, a las 2, 4, 6 y 11 semanas después de la suspensión de riego. Un subgrupo de plantas se mantuvo con riego como lote testigo, a las cuales también se les determinó el nivel de prolina (Fig. 2).

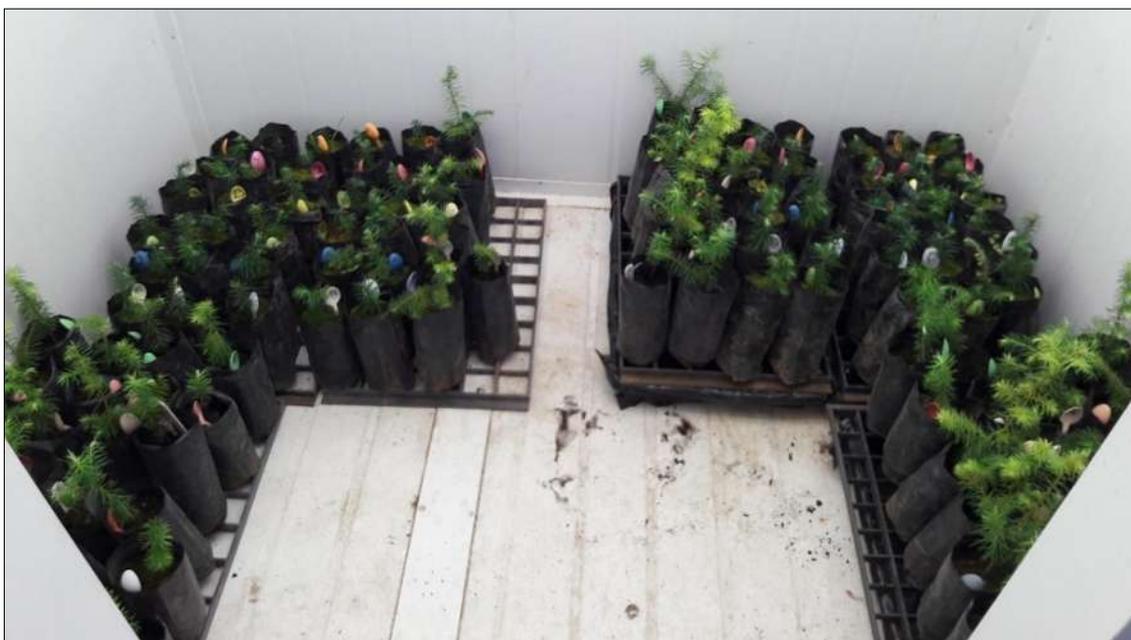
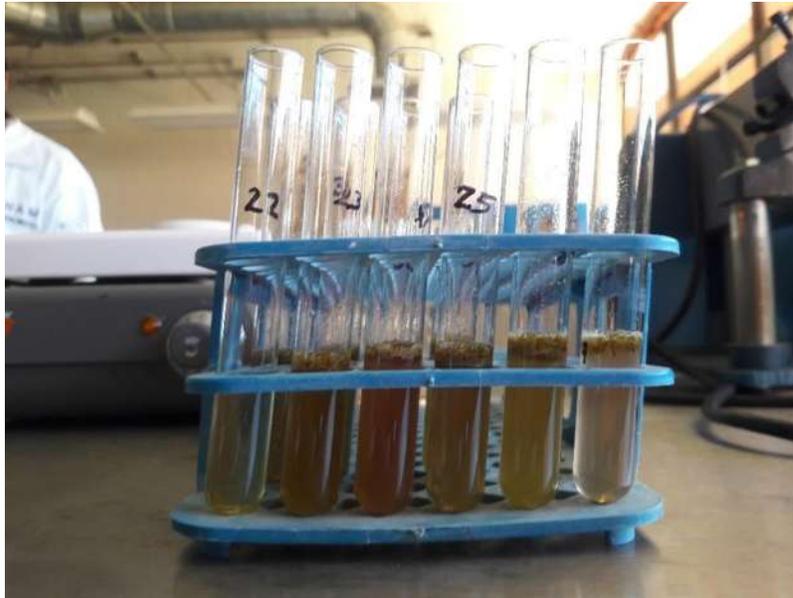


Figura 2. Acomodo de la planta en las cámaras de crecimiento.

#### *Extracción de prolina:*

Las acículas colectadas se pesaron y se colocaron en el congelador por algunos días para después llevar a cabo la determinación de prolina de acuerdo con Bates *et al.* (1973).

El primer paso fue macerar las acículas de cada individuo por separado, agregando 2 ml de ácido sulfosalicílico al 3%. La mezcla se colocó en un tubo de ensaye previamente etiquetado, al cual se le agregó 1 ml de ácido de ninhidrina (su preparación se indica más adelante) y 1 ml de ácido acético glacial (PM 60.05) (Fig. 3). En seguida los tubos de ensaye se colocaron en baño María a 100°C durante una hora, para después suspender la reacción poniendo los tubos en hielo.



*Figura 3. Tubos de ensaye con las acículas maceradas junto con el ácido sulfosalicílico, ácido de ninhidrina y ácido acético glacial.*

Después a cada tubo se le agregó 2 ml de tolueno (PM 92.14), y se pasó a un embudo de separación donde se agitó vigorosamente y después se dejó reposar para que se separara la muestra (Fig. 4a). La fase acuosa del embudo de separación se regresa al tubo de ensaye, y el resto se pone en una celda limpia para después centrifugar las muestras a 2.5 revoluciones por 5 minutos. (Fig. 4b). Posteriormente, se realizó la lectura de cada celda en un espectrofotómetro con una absorbancia de 520 nanómetros (Fig. 4c), usando tolueno como blanco para calibrar.

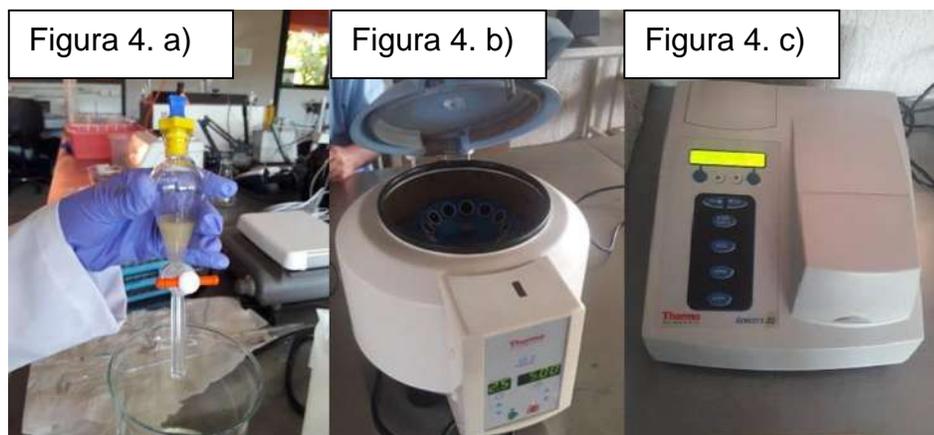


Figura 4. a) Embudo de separación con la muestra. b) Centrifugación de las muestras. c) Espectrofotómetro para hacer las lecturas.

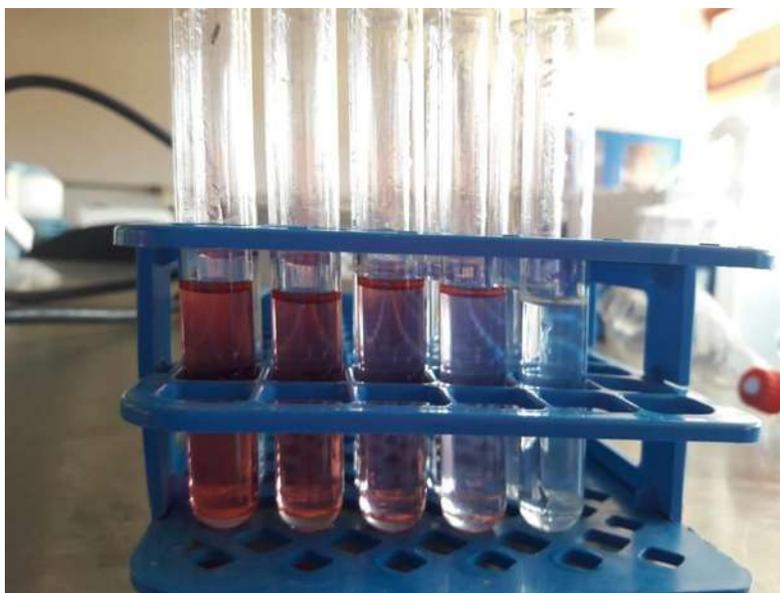
La concentración de prolina se determinó mediante una curva de calibración, la cual según Dosal y Villanueva (2008), es la representación gráfica de una señal que se mide en función de la concentración de un analito (de concentración conocida). Para ello se prepararon 5 tubos de ensaye con las siguientes concentraciones de prolina y otros reactivos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Reactivos y cantidades usadas en cada tubo de ensaye para la determinación de prolina.

<b>Tubo de ensaye</b>	<b>Prolina (ml)</b>	<b>Agua (ml)</b>	<b>Ácido de ninhidrina (ml)</b>	<b>Ácido acético glacial (ml)</b>
1	2.0	0.0	2	2
2	1.5	0.5	2	2
3	1.0	1.0	2	2
4	0.5	1.5	2	2
5	0.0	2.0	2	2

Para la preparación del ácido de ninhidrina se colocaron 6.25 gramos de ninhidrina (PM 178.14) por cada 150 ml de ácido acético glacial y 100 ml de ácido fosfórico (PM 98) con agitación y calentamiento hasta disolverse. Para la prolina se pesaron 0.001 gramos de prolina (PM 115.13) y se le agregaron 10 ml de agua destilada.

Los tubos de la curva de calibración tuvieron el mismo proceso que para las acículas, con la diferencia que en lugar de agregar 2 ml de tolueno antes de ponerlo en el embudo de separación, se le agregó 4 ml de tolueno (Fig. 5). Y se continuó con el mismo proceso de separación (Fig. 6) para después hacer la lectura en el espectrofotómetro.



*Figura 5. Tubos de ensaye para la curva de calibración.*



Figura 6. Separación del contenido de un tubo de ensaye para la curva de calibración.

#### *Análisis estadístico:*

La curva de calibración se realizó a través del ajuste de una regresión lineal, donde la variable independiente está representada por la concentración conocida de prolina y la variable dependiente por la lectura en nanómetros obtenida del espectrofotómetro (Cuadro 2). La recta está definida por una ordenada al origen y una pendiente, mediante la ecuación  $y = b + mx$  (Fig. 7).

Cuadro 2. Absorbancias de la curva de calibración.

<b>Tubo de ensaye</b>	<b>Prolina</b>	<b>Absorbancia</b>
<b>1</b>	0.100	0.568
<b>2</b>	0.075	0.337
<b>3</b>	0.050	0.222
<b>4</b>	0.025	0.135
<b>5</b>	0.000	0.033

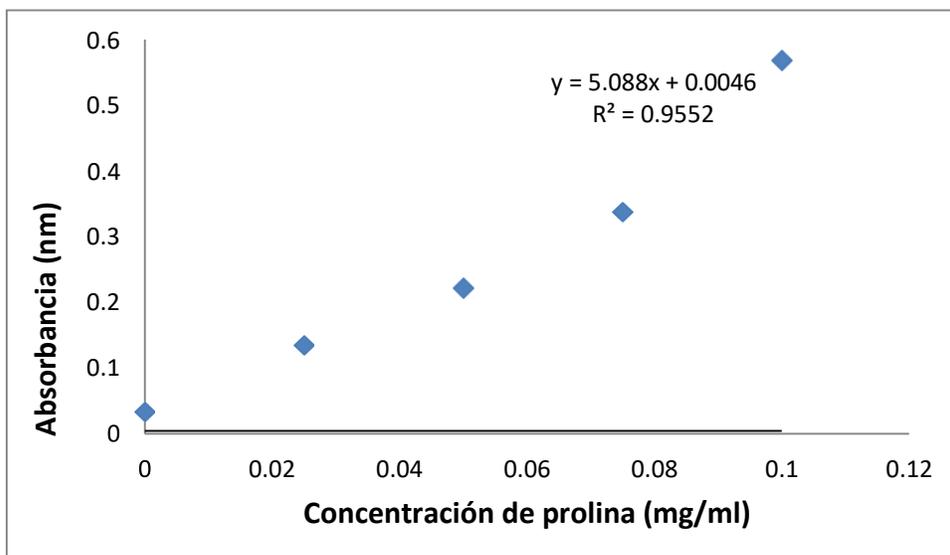


Figura 7. Curva de calibración para determinar el contenido de prolina.

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

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

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

Donde:

$[P]$  = Concentración de prolina

$b$  = Ordenada al origen

$Abs$  = Absorbancia en nanómetros

$m$  = Pendiente

Lo anterior se obtuvo mediante el despeje de la variable  $x$ , que en este caso es la concentración de prolina.

El resultado de la ecuación anterior se multiplicó por 2, debido a que se utilizaron 2 ml de tolueno para extraer el material que se usó para determinar la absorbancia de cada una de las muestras. El resultado de multiplicar por 2, se divide entre los gramos de tejido de cada muestra para poder obtener la concentración en mg/g (Cruzado-Vargas 2017).

Los siguientes análisis se realizaron mediante Proc GLM del paquete estadístico SAS.

❖ Campo

Para las muestras de ambos sitios se realizó un análisis de varianza, comparando las muestras colectadas en el período de lluvias y de secas, el tratamiento (plantas de *Abies religiosa* plantadas bajo la sombra de arbustos utilizados como planta nodriza y plantas a cielo abierto, únicamente de Los Ailes), así como las diferencias entre procedencias.

❖ Cámaras de crecimiento

Se realizó un análisis de varianza, comparando el efecto del riego normal contra la suspensión del mismo y se contrastaron las diferencias entre procedencias.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Campo

Se encontró diferencia significativa para la producción de prolina entre temporadas (lluvias y secas), donde las acículas colectadas en periodo de secas produjeron mayor cantidad de dicho aminoácido (Fig. 8 y 9) en ambos sitios (Los Ailes y Las Palomas).

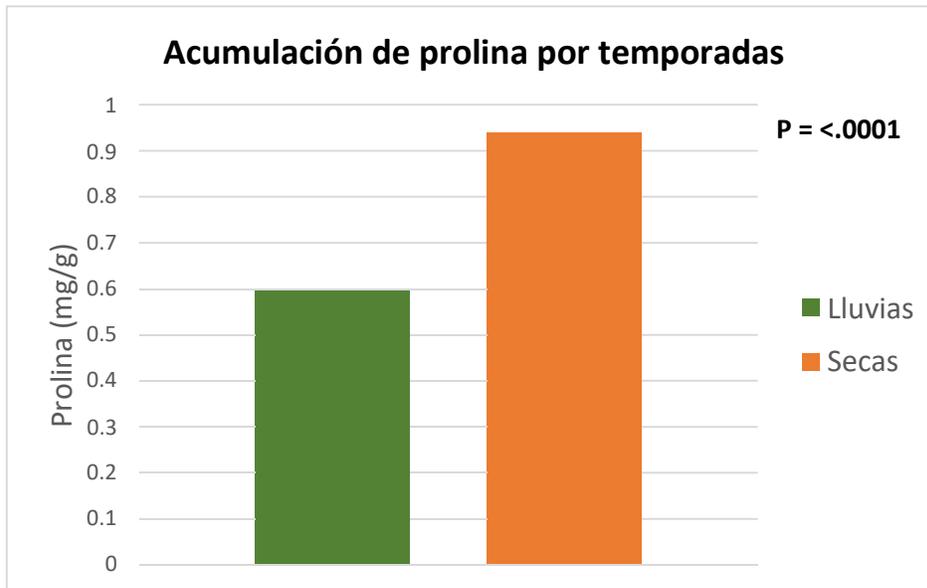


Figura 8. Acumulacion de prolina por temporadas en el sitio Los Ailes.

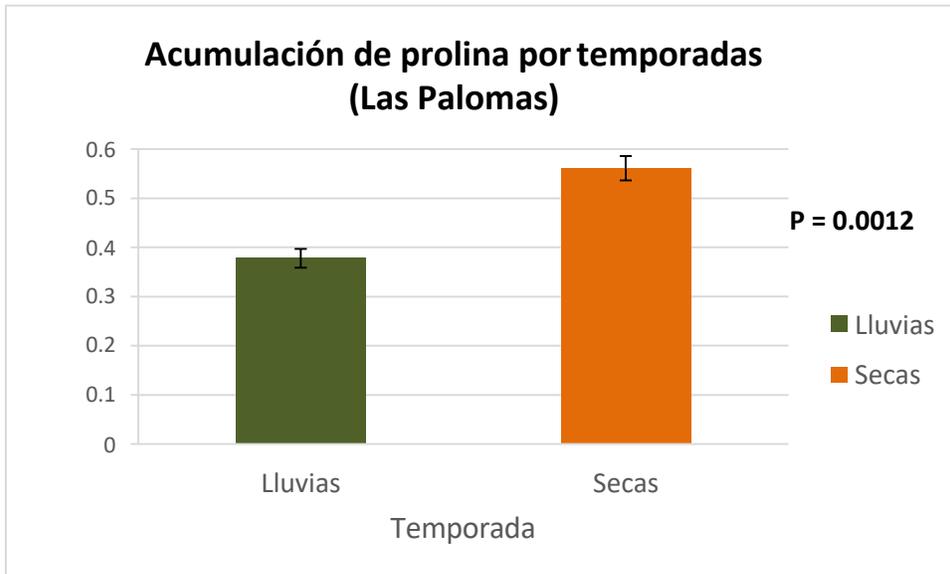


Figura 9. Producción de prolina por temporadas en Las Palomas.

En Los Ailes se tomaron en cuenta los tratamientos bajo nodriza y cielo abierto, donde las acículas colectadas de bloques a cielo abierto presentaron mayor cantidad de prolina (Fig. 10), indicando un mayor estrés por sequía. Las plantas ubicadas en bloques bajo nodriza produjeron menos prolina que las ubicadas a cielo abierto, sobre todo, en temporada de lluvias.

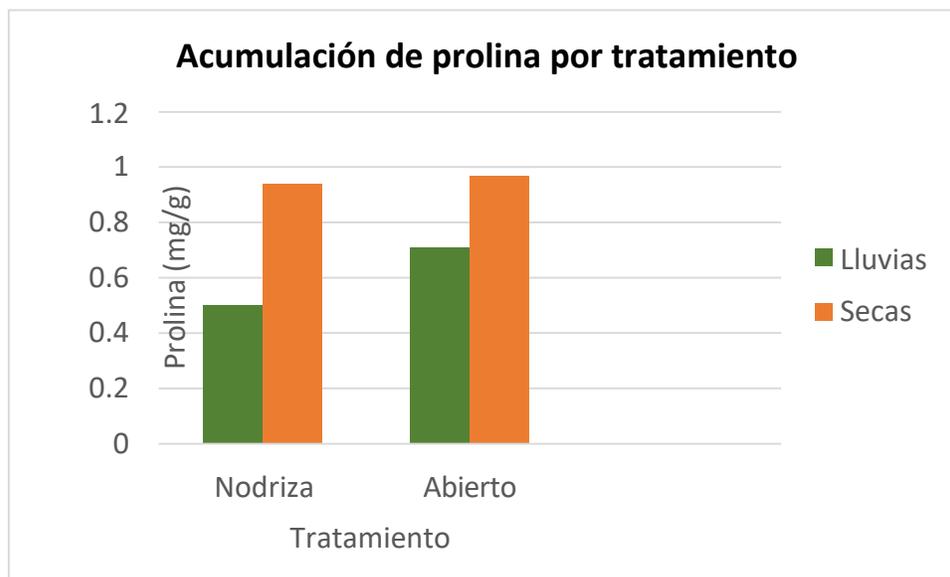


Figura 10. Acumulación de prolina por tratamiento (nodriza y a cielo abierto).

Para el sitio de Las Palomas con los promedios de prolina por procedencia se realizó una relación de la temporada de lluvias respecto a la de secas ((secas-lluvias) /lluvias) y se realizó una regresión para ver el comportamiento de las diferentes procedencias (Fig. 11), donde las procedencias de la parte media son las que producen mayor cantidad de prolina.

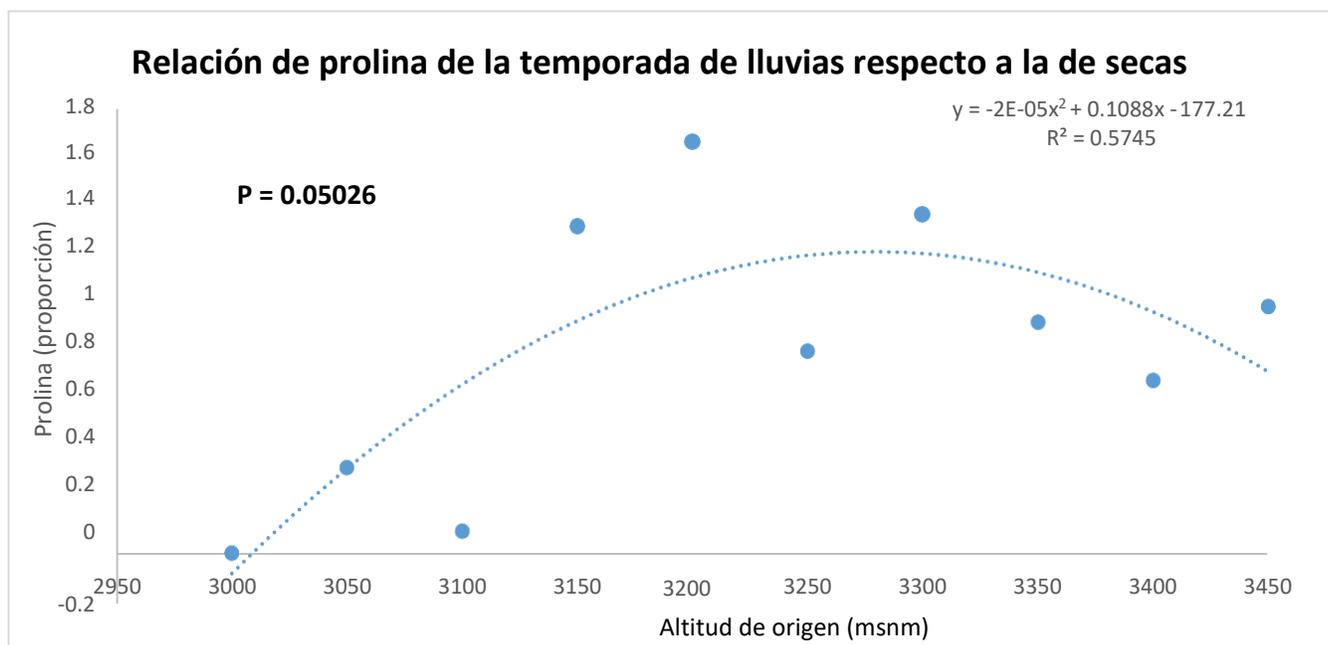


Figura 11. Regresión de la proporción del incremento de prolina durante la temporada de secas respecto a la de lluvias. El valor 0 indica que se produjo la misma cantidad de prolina en ambas temporadas; el 1, indica que se produjo lo doble de prolina en la temporada de secas respecto a la de lluvias.

### Cámaras de crecimiento

De manera similar a los resultados de campo en el experimento llevado a cabo en las cámaras de crecimiento, se produjo mayor cantidad de prolina en las plantas sin riego. La cantidad de prolina disminuyó de la primera evaluación de las acículas (a los 15 días después de suspender riego) hasta la tercera evaluación de las muestras (45 días

después de la suspensión de riego), mientras que para la cuarta evaluación (75 días después) la cantidad de prolina aumenta considerablemente en las plantas sometidas al tratamiento de sequía (Fig. 12).

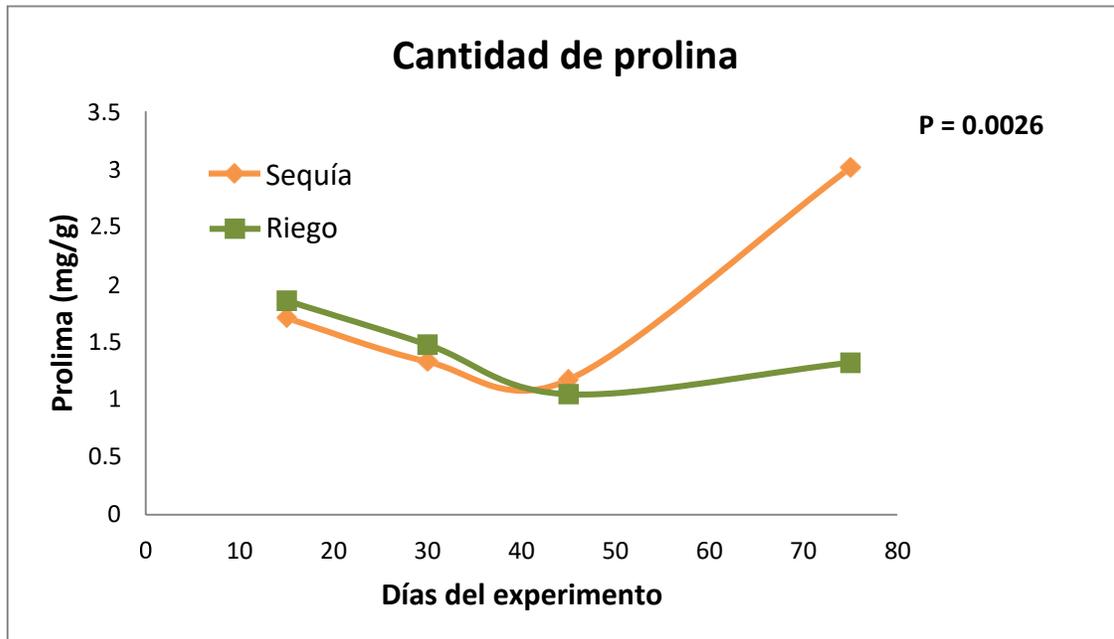


Figura 12. Cantidad de prolina por tratamiento en cámaras de crecimiento.

En lo que se refiere a la supervivencia, inicialmente eran 130 individuos sometidos a riego y 129 a sequía. Al término del experimento, el número de individuos sometidos a riego sobrevivieron en su totalidad, mientras que los individuos que no tuvieron suministro de agua tuvieron mortalidad a partir del día 30 (Fig. 13), quedando para el final del experimento sólo el 22.5% del total. No hubo diferencia significativa en la supervivencia entre procedencias (Fig. 14).

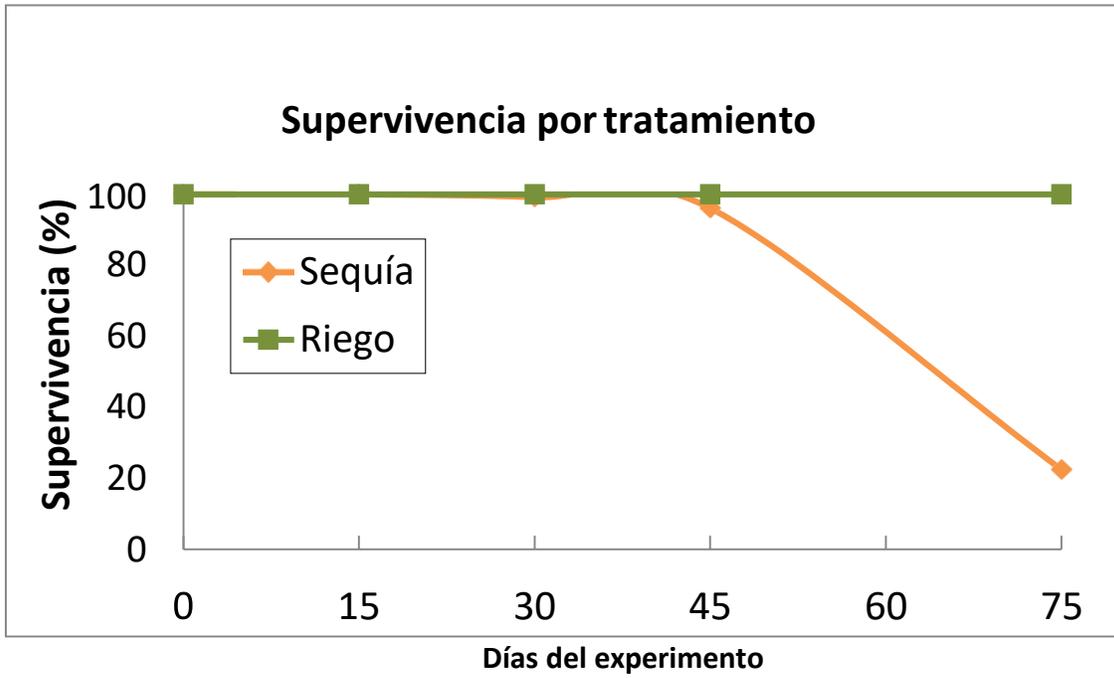


Figura 13. Porcentaje de supervivencia de individuos durante el experimento.

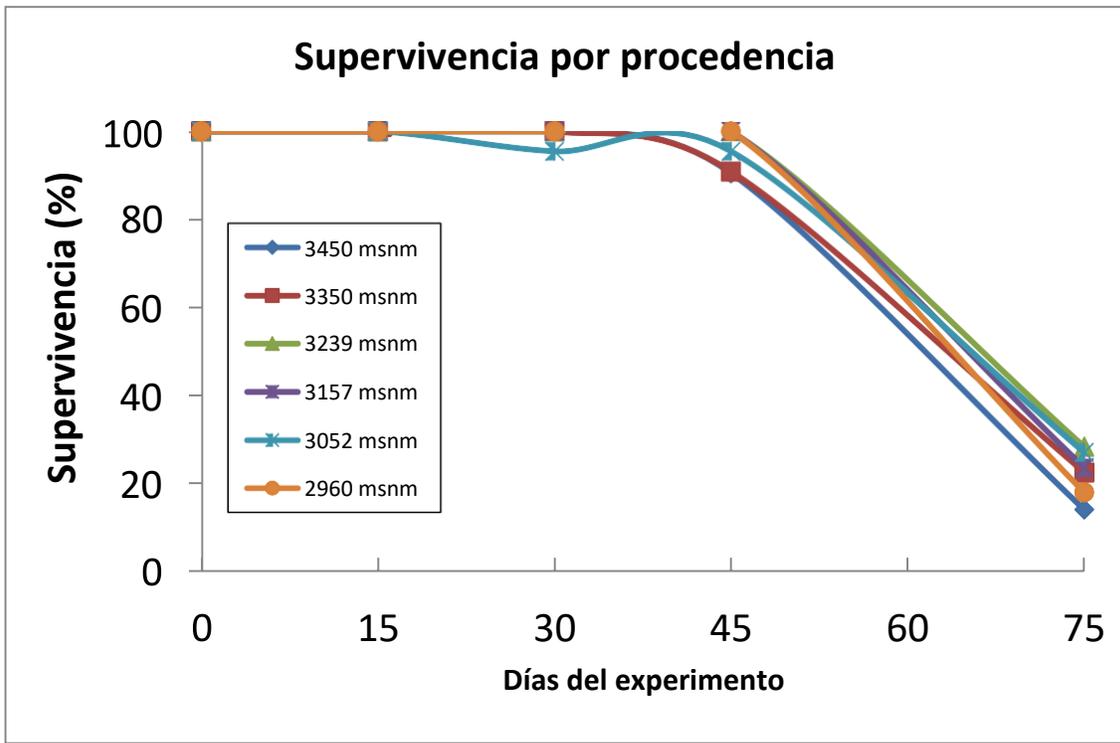


Figura 14. Porcentaje de la supervivencia por procedencia.

De nuevo, de manera similar a los ensayos de campo, en el experimento de cámaras de crecimiento, no se encontraron diferencias genéticas significativas entre procedencias para la producción de prolina como respuesta a la sequía. Sin embargo, al igual que en campo, todas las procedencias producen mayor cantidad de prolina cuando hay escasez de agua, pero no hay un patrón de diferenciación debido a su origen altitudinal.

## DISCUSIÓN

El establecimiento de las plantas en cámaras de crecimiento permitió tener un control sobre la temperatura, fotoperiodo y el riego, y a su vez observar los síntomas de estrés que se fueron dando gradualmente en las plantas sometidas a sequía y ver cómo fueron muriendo en su mayoría al transcurrir los días que estuvieron sin riego. Esto muestra los efectos que la sequía tiene en las especies forestales, tal como lo ha reportado Allen (2010), donde menciona que la mortalidad de la vegetación en asociación con una mayor frecuencia e intensidad de sequías y un aumento de la temperatura ha sido reportada en todos los continentes. Cuando estas observaciones se combinan con las proyecciones de aumento de la temperatura y disminución de la precipitación (Sáenz-Romero *et al.* 2010), surge un panorama en el cual numerosas especies de árboles y poblaciones muy probablemente decaerán (Sáenz-Romero *et al.* 2016).

En las cámaras de crecimiento la supresión de riego aumenta prácticamente al doble el contenido de prolina al final del experimento en comparación con las plantas que sí tuvieron riego, de manera similar a lo reportado por Parra *et al.* (1999) en la zarzamora.

En campo, las plantas responden a la falta de agua, produciendo más prolina en la temporada de secas (de manera similar al experimento de cámaras de crecimiento). Esto seguramente como un mecanismo de protección ante el estrés generado en dicha temporada por la falta de agua. El aumento de producción de prolina es un síntoma de estrés hídrico interno severo en *Abies religiosa*, como también ha sido reportado en cebada (Hanson *et al.* 1979), garbanzo (Mafakheri 2010), frijol (Cárdenas-Ávila 2006), remolacha (Monreal 2005), tomate (Claussen 2005), *Pinus patula*, *P. gregii* (Ortíz 2006), *P. radiata* (Diego-Sánchez 2012), *P. ponderosa* (Vance 1990) y embriones de encino, donde un efecto de deshidratación débil induce una acumulación de prolina (Prewein 2004).

Los arbustos que sirven como planta nodriza dan protección a plántulas de otras especies en un ambiente difícil, mientras estas últimas crecen lo suficiente para enfrentar las condiciones del medio (Cavieres *et al.* 2006; Carbajal-Navarro *et al.*

2019). En Los Ailes, las plantas bajo nodriza produjeron menos prolina que las expuestas a cielo abierto en ambas temporadas, ya que las plantas nodriza brindan mejor protección contra variaciones extremas en el clima a lo largo del día (Carbajal-Navarro *et al.* 2019). Con ello se confirma la importancia que tienen los arbustos al momento de establecer reforestaciones de *Abies religiosa* (Blanco-García 2011; Carbajal-Navarro *et al.* 2019). Considerando que las procedencias de *Abies religiosa* aparentemente no tienen una adaptación diferenciada a la sequía mediante la producción de prolina, la plantación de arbustos como planta nodriza junto con plántulas de *A. religiosa*, ayudarían a aminorar el estrés por sequía derivado del cambio climático.

Respecto a las procedencias, los resultados coinciden con los de Cruzado-Vargas (2017) donde no se obtuvieron diferencias significativas entre procedencias para la concentración de prolina en un ensayo de casa sombra, pero sí entre tratamientos (sequía y riego). Esto sugiere la posible susceptibilidad de todas las procedencias a lo largo de gradientes altitudinales a los efectos de un creciente estrés hídrico inducido por el cambio climático.

Una explicación tentativa a la falta de diferenciación genética entre procedencias en la producción de prolina, es que las poblaciones de *A. religiosa* no han sido expuestas de manera importante a una presión de selección por sequía, debido a que en general no ocupan sitios del extremo altitudinal inferior de su hábitat climático, lo cual es evidente si comparamos la distribución contemporánea de las poblaciones en la Reserva de la Biósfera Mariposa Monarca, en relación a su hábitat climático propicio proyectado bajo un clima contemporáneo de referencia (1961-1990) (Sáenz-Romero *et al.* 2012). Es decir, aparentemente, las poblaciones de *A. religiosa* podrían ocupar sitios a altitudes menores de donde están. Esto podría deberse a que, en su límite climático inferior, aparentemente son desplazadas por exclusión competitiva por poblaciones de *Pinus pseudostrobus*, que tienen una tasa de crecimiento mucho más rápida que *Abies religiosa*, y menores restricciones para ocupar sitios perturbados (a diferencia de *A. religiosa*, *P. pseudostrobus* es intolerante a la sombra). Esta exclusión competitiva no ocurre en el límite altitudinal superior de *A. religiosa* (aproximadamente

a 3500 m de altitud), en donde esta especie cohabita con *Pinus hartwegii*, una especie con crecimiento muy lento, que usualmente forma poblaciones con baja densidad de individuos, al menos entre los 3000 y los 3500 metros de altitud (observación personal).

## CONCLUSIONES

Las plantas producen más prolina en respuesta al estrés por sequía, pero no se comprobó la hipótesis de que las originadas a menor altitud respondieran produciendo más prolina que las de mayor altitud.

Únicamente hay diferencia entre tratamientos (riego vs. sequía en cámaras de crecimiento; temporada de lluvias vs. temporada de secas en campo), donde la cantidad de prolina es superior en las plantas sometidas a sequía inducida en cámaras de crecimiento respecto a las que estuvieron bajo riego normal. En el caso del experimento en campo, durante la temporada de secas, las plantas produjeron más prolina en comparación con las mismas plantas en la temporada de lluvias.

Lo anterior indica que al menos en lo que respecta a la producción de prolina, las procedencias del límite inferior de *Abies religiosa* no están diferenciadas genéticamente del resto de las procedencias a lo largo del gradiente altitudinal, para una mayor resistencia al estrés por sequía. Ello reduce las capacidades adaptativas de *A. religiosa* ante el cambio climático, en particular en el límite xérico.

Los arbustos que sirven como planta nodriza le proveen a la planta un ambiente más favorable, por lo cual las plantas bajo nodriza produjeron menos prolina que las expuestas a cielo abierto en ambas temporadas (lluvias y secas), lo cual indica que la sombra de las plantas nodriza disminuye el estrés por sequía en las plántulas de *A. religiosa*.

Dado que no hay diferencias genéticas entre procedencias en lo referente a la prolina, sería importante establecer las reforestaciones de *Abies religiosa* bajo la sombra de arbustos. En caso de que no haya arbustos en el lugar, se recomienda su plantación dos años antes de la reforestación. Para ello es indispensable la producción de plantas de especies locales de arbustos en viveros de la Reserva de la Biósfera Mariposa Monarca.

## LITERATURA CITADA

- Alfaro, R. I., B. Fady., G. G. Vendramin, I. K. Dawson, R. A. Fleming, C. Sáenz-Romero, R. A. Lindig-Cisneros, T. Murdock, B. Vinceti, C. M. Navarro, T. Scroppa, G. Baldinelli, Y. A. El-Kassaby, J. Loo. 2014. The role of forest genetic resources in responding to biotic and abiotic factors in the context of anthropogenic climate change. *Forest Ecology and Management*, 333(1), 76–87.
- Allen, C.D., A. K. Macalady, H. Chenchouni, D. Bachelet, N. McDowell, M. Vennetier, T. Kitzberger, A. Rigling, D. D. Breshears, E. H. Hogg, P. Gonzalez, R. Fensham, Z. Zhang, J. Castro, N. Demidova, J. H. Lim, G. Allard, S. W. Running, A. Semerci, N. Cobb. 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management* 259, 660–684
- Bates, L., Waldren, R.P. and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39:205-207.
- Cárdenas-Ávila, M. L., J Verde-Star, R. K. Maiti, R. Foroughbakhch-P, H. Gámez-González, S. Martínez-Lozano, M.A. Núñez-González, G. García-Díaz, J. L. Hernández-Piñero and M.R. Morales-Vallarta. 2006. Variability in accumulation of free proline on *in vitro* calli of four bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties exposed to salinity and induced moisture stress. *International Journal of Experimental Botany*. 75:103-108.
- Carbajal-Navarro, A. L., E. Navarro-Miranda, A. Blanco-García, A. L. Cruzado-Vargas, E. Gómez-Pineda, C. Zamora-Sánchez, F. Pineda-García, G. O'Neill, M. Gómez-Romero, R. Lindig-Cisneros, K. H. Johnsen, P. Lobit, L. Lopez-Toledo, Y. Herrerías-Diego and C. Sáenz-Romero. 2019. Ecological restoration of *Abies religiosa* forests using nurse plants and assisted migration in the Monarch Butterfly Biosphere Reserve, Mexico. *Front. Ecol. Evol.* 7:421. DOI: 10.3389/fevo.2019.00421
- Cavieres, L. A. E. I. Badano, A. Sierra-Almeida, S. Gómez-González y M. A. Molina-Montenegro. 2006. Positive interactions between alpine plant species and the

nurse cushion plant *Laretia acaulis* do not increase with elevation in the Andes of central Chile. *New Phytologist* 169: 59-69.

Claussen W. 2005. Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Science*. 168: 241-248.

Cruzado-Vargas, A. L. 2017. Variación de caracteres cuantitativos entre procedencias de *Abies religiosa* originadas en un gradiente altitudinal en la Reserva de la Biósfera de la Mariposa Monarca: etapa de vivero. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. 77 pp.

Cruzado- Vargas, A. L., F. J. Zamudio-Sánchez, G. A. Rodríguez-Yam, A. L. Carbajal-Navarro, J. A. Blanco-García and C. Sáenz-Romero. 2020. Crecimiento de plántulas de regeneración natural de *Abies religiosa* (Kunth) Schltld. & Cham. en vivero y variación genética entre procedencias. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 26(1), 85-96.

De Diego-Sánchez Nuria. 2012 Las plantas de *Pinus radiata* D. Don estresadas incrementaron los niveles de Pro y GABA, como respuesta a la deshidratación. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco.España. 190 pp.

Dosal, M. A. y Villanueva M. 2008. Introducción a la metrología química, curvas de calibración en los métodos analíticos. *Antología de Quím. Anal. Experimental*, 993-1014.

Hanson D., C. E. Nelsen, A. R. Pedersen, and E. H. Everson. 1979. Capacity for proline accumulation during water stress in barley and its implications for breeding for drought resistance. *Crop Science*, 19:489-493.

Mafakheri A., A. Siosemardeh, B. Bahramnejad, P.C. Struik, and Y. Sohrabi. 2010. Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Australian Journal of Crop Science*. 4(8):580-585.

Martínez, M. 1963. Las pináceas mexicanas. 3a. ed. Instituto de Biología. U.N.A.M. México, D.F. 400 pp. *In: Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski y colaboradores,*

2005. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), 1406 pp.

Mátyás C. 2010. Forecasts needed for retreating forests. *Nature*, 464: 1271.

Monreal, J.A., E. T. Jiménez, R. Morillo-Velarde, S. García Mauriño y C. Echevarría. 2005. Los niveles de prolina reflejan la situación de estrés hídrico de la remolacha del sur. Sevilla, España. 145- 151.

Moreno, L., S. Crespo, W. Pérez, L. M. Melgarejo. 2010. Pruebas bioquímicas como herramientas para estudios en fisiología. Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. 62 pp.

Ortíz-Bibian, M. A., A. Blanco-García, R. A. Lindig-Cisneros, M. Gómez-Romero, D. Castellanos-Acuña, Y. Herrerías-Diego, N. M. Sánchez-Vargas and C. Sáenz-Romero. 2017. Genetic variation in *Abies religiosa* for quantitative traits and delineation of elevational and climatic zoning for maintaining monarch butterfly overwintering sites in Mexico, considering climatic change. *Silvae Genetica*: 66, 14-23.

Ortíz, O.M. 2006. Respuestas fisiológicas y bioquímicas de dos especies de pinos en condiciones limitantes de humedad. Tesis de licenciatura. Universidad autónoma del estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Área Académica de Ingeniería Forestal. 58 pp.

Parra, Q. R. A., O. J. L. Rodríguez y H. V. A. González. 1999. Transpiración, potencial hídrico y prolina en zarzamora bajo déficit hídrico. *Terra Latinoamericana* 17, 2: 125-130.

Prewin C., M. Vagner and E. Wilhelm. 2004. Changes in water status and proline and abscisic acid concentrations in developing somatic embryos of pedunculate oak (*Quercus robur*) during maturation and germination. *Tree Physiology*, 24: 1251–1257.

- Rehfeldt, G. E. 1988. Ecological genetics of *Pinus contorta* from the Rocky Mountains (USA): A synthesis. *Silvae Genetica*. 37(3-4): 131–135.
- Rehfeldt, G. E., N. M. Tchebakova, Y. I. Parfenova, W. R. Wykoff, N. A. Kuzmina, and L. I. Milyutin. 2002. Intraspecific responses to climate in *Pinus sylvestris*. *Global Change Biology*. 8: 912–929.
- Rehfeldt, G. E., N. I. Crookston, C. Sáenz-Romero and E. M. Campbell. 2012. North American vegetation model for land-use planning in a changing climate: a solution to large classification problems. *Ecological Applications*. 22(1): 119–141.
- Sáenz-Romero, C., G. E. Rehfeldt, N. L. Crookston, P. Duval, J. Beaulieu. 2012. Spline models of contemporary, 2030, 2060 and 2090 climates for Michoacán State, México. Impacts on the vegetation. *Rev. Fitotec. Mex.* 35 (4): 333-345.
- Sáenz-Romero, C., G. E. Rehfeldt, N. L. Crookston, P. Duval, R. St-Amant, J. Beaulieu, B. A. Richardson. 2010. Spline models of contemporary, 2030, 2060 and 2090 climates for Mexico and their use in understanding climate-change impacts on the vegetation. *Climatic Change* 102: 595–623.
- Sáenz-Romero, C., R. A. Lindig-Cisneros, D.G. Joyce, J. Beaulieu, B. ST. Clair, B. C. Jaquish. 2016. Assisted migration of forest populations for adapting trees to climate change. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 22(3), 303-323.
- SAS Institute Inc. (2004) SAS/STAT Computer Software. Release 9.1 3<sup>th</sup> edition. SAS Institute Inc, Cary North Carolina, USA.
- SEMARNAT. 2014. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Ficha de identificación: especies bajo monitoreo, *Abies religiosa*. En línea. Disponible en: [http://www.conanp.gob.mx/conanp/dominios/iztapopo/documentos/fichas\\_de\\_especies/Abies\\_religiosa.pdf](http://www.conanp.gob.mx/conanp/dominios/iztapopo/documentos/fichas_de_especies/Abies_religiosa.pdf). Fecha de consulta: 17-08-17

Vance, N. C. and Zaerr, J. B. 1990. Analysis by high-performance liquid chromatography of free amino acids extracted from needles of drought-stressed and shaded *Pinus ponderosa* seedlings. *Physiol. Plant.* 79: 23-30.

## CAPÍTULO II

### **“Demanda evapotranspirativa en siete procedencias de *Abies religiosa* de la Reserva de la Biósfera Mariposa Monarca utilizando polietilenglicol (PEG 8000) como inductor de sequía”**

#### **RESUMEN**

De acuerdo con las proyecciones de cambio climático que indican una disminución en la precipitación y un aumento de la temperatura, se espera que en las próximas décadas los climas áridos se expandan. Por lo anterior, se estudió el desempeño de plantas de *Abies religiosa* de siete procedencias colectadas en un transecto altitudinal entre 3143 y 3491 msnm; estas plantas fueron sometidas a un doble estrés hídrico: se colocaron bajo un ventilador para incrementar la demanda evapotranspirativa, y bajo estas condiciones se aplicaron concentraciones crecientes de polietilenglicol (PEG 8000) a la solución del suelo. Las plantas fueron colocadas en tubetes de plástico de 380 cm<sup>3</sup>, que fueron a su vez colocados en vasos de 510 ml parcialmente llenos de agua para humedecerlos. Después de un periodo de aclimatación bajo el efecto del ventilador, se aplicó PEG a una concentración creciente de 2.5% hasta llegar al 20%; se tuvo un lote control sin PEG. Se evaluó el daño por sequía en una escala visual del 1 al 6. Las plantas sometidas a PEG consumieron menos agua y mostraron daños evidentes de sequía a una concentración del 10% de PEG, mientras que el aumento de demanda evapotranspirativa por el ventilador no causó síntomas de estrés en ninguna planta. Esto sugiere que no hay diferenciación genética significativa entre procedencias en respuesta al estrés por sequía inducido por PEG, ni en la demanda evapotranspirativa.

## ABSTRACT

According to climate change projections indicating a decrease in precipitation and an increase in temperature, arid climates are expected to expand in the coming decades. Therefore, the performance of *Abies religiosa* from seven seed sources collected in an altitude transect between 3143 and 3491 meters above sea level was studied; these plants were subjected to double water stress: were placed under a fan to increase evapotranspirative demand, and under these conditions increased concentrations of polyethylene glycol (PEG 8000) that were applied to the soil solution. The plants were placed in 380 cm<sup>3</sup> plastic pots, which were in turn placed in 510 ml cups partially filled with water to moisten them. After a period of acclimatization under the effect of the fan, PEG was applied to an increasing concentration of 2.5% to 20%; there was a control lot without PEG. Drought damage was assessed on a visual scale of 1 to 6. Plants with PEG consumed less water and showed obvious damage from drought at a concentration of 10% PEG, while the increased evapotranspirative demand for the fan did not cause symptoms of stress at any plant. This suggests that there is no significant genetic differentiation between provenances in response to PEG-induced drought stress, or evapotranspirative demand.

## INTRODUCCIÓN

El incremento de la temperatura global del planeta como consecuencia del cambio climático está provocando sequías cada vez más intensas y la mortalidad de árboles en los bosques de todo el mundo. Sin duda, esto pone en riesgo a numerosas especies forestales, entre ellas, especies del género *Abies*, del cual, en Asia se reportó la muerte masiva de *Abies koreana* y *A. cilicicia* entre muchas otras especies de árboles. Este aumento de temperatura aumenta el déficit de presión de vapor y la evaporación a la atmósfera (Allen *et al.* 2010). En el caso de México, las proyecciones indican que además del aumento de temperatura, la precipitación disminuirá gradualmente hasta un 9% para el año 2060 (Sáenz-Romero *et al.* 2010). Durante la sequía, las temperaturas más cálidas pueden aumentar el estrés y el riesgo de mortalidad para los árboles (McDowell *et al.* 2008), directamente a través de los impactos fisiológicos (Adams *et al.* 2009) o indirectamente a través del debilitamiento del arbolado, seguido por un aumento de ataques de plagas y patógenos (Weed *et al.* 2013; Alfaro *et al.* 2014).

La evaporación es el proceso por el cual el agua líquida se convierte en vapor de agua (vaporización) y se retira de la superficie evaporante (remoción de vapor). A medida que ocurre la evaporación, el aire circundante se satura gradualmente y el proceso se vuelve cada vez más lento hasta detenerse completamente si el aire húmedo circundante no se transfiere a la atmósfera o en otras palabras no se retira de alrededor de la hoja. El reemplazo del aire saturado por un aire más seco depende grandemente de la velocidad del viento. En zonas en las que el suelo es capaz de proveer agua con velocidad suficiente para satisfacer la demanda de la evaporación del suelo, este proceso está determinado solamente por las condiciones meteorológicas. Sin embargo, en casos en que el intervalo entre la lluvia y el riego es grande y la capacidad del suelo de conducir la humedad cerca de la superficie es reducida, el contenido en agua en los horizontes superiores disminuye y la superficie del suelo se seca. Bajo estas circunstancias, la disponibilidad limitada del agua ejerce un control sobre la evaporación del suelo. En ausencia de cualquier fuente de reabastecimiento de agua a la superficie del suelo, la evaporación disminuye rápidamente y puede cesar casi

totalmente en un corto lapso de tiempo (FAO 2006).

Para simular esta ausencia de abastecimiento de agua y pensando también en las proyecciones de cambio climático, se utilizó polietilenglicol (PEG) 8000, que es un polímero de peso molecular elevado, capaz de inducir o simular el estrés hídrico. El

PEG da la posibilidad de variar con mayor rapidez el estatus hídrico del ambiente en el que se desarrollan las raíces, de tal manera que la sequía inducida es más rápida y homogénea (López-Rodríguez *et al.* 2008).

En este sentido, se ha utilizado en diversos estudios el PEG para inducir la sequía en algunas especies de plantas como en *Musa* sp. donde el uso del polietilenglicol como agente inductor de estrés hídrico permitió seleccionar plantas de banano tolerantes a la sequía (Moreno-Bermúdez *et al.* 2014). Posteriormente, ese mismo autor y colaboradores (Moreno-Bermúdez *et al.* 2017) determinaron la mínima concentración de polietilenglicol a la cual se afectan variables morfo-fisiológicas en plantas *in vitro* de los cultivares *Musa* spp, utilizando diferentes concentraciones de PEG, encontrando así diferencias entre cultivares a la tolerancia a la sequía. Gámez-González y otros (2005) analizaron dos variedades de maíz para evaluar el efecto de la sequía, donde una de las dos variedades resultó ser tolerante a dicho efecto. De la misma forma, Rangel-Fajardo *et al.* (2019) comprobó tal efecto comparando diferentes variedades de maíz. También Bogado-Villalba y colaboradores (2016) determinaron el efecto del estrés hídrico inducido con PEG sobre el crecimiento *in vitro* de plantas de *Stevia rebaudiana* donde se demostró la baja tolerancia al estrés hídrico que tiene esta especie. En lo que se refiere a especies forestales, López-Rodríguez y otros (2008) evaluaron la respuesta de dos procedencias de *Pinus canariensis* y una de *Pinus pinaster* a tres tratamientos: control estrés hídrico moderado y estrés fuerte, donde encontró diferencias entre especies y también entre tratamientos.

Como bien Mátyás (2010) menciona, poblaciones de árboles que están cerca de los límites xéricos (límite altitudinal inferior o sur –en el Hemisferio Norte- de la distribución natural de una especie), deben conservarse, ya que probablemente se adaptan mejor al estrés hídrico y, por lo tanto, son genéticamente valiosas. Esto podría aplicar

especialmente para las poblaciones de *Abies religiosa* (oyamel) dentro de la Reserva de la Biósfera Mariposa Monarca. Por lo anterior, se consideró la necesidad de evaluar la demanda evapotranspirativa en respuesta al estrés hídrico inducido por polietilenglicol entre procedencias de *Abies religiosa*, originadas de un gradiente altitudinal. Esto con la finalidad de observar si las procedencias originadas a menor altitud toleran mejor el estrés hídrico. De confirmarse tal hipótesis, esas procedencias de baja altitud se podrían utilizar en futuras reforestaciones, con la finalidad de proveer de una mayor resistencia al estrés hídrico (que se incrementará debido al cambio climático) a los bosques de oyamel que son usados por la mariposa monarca durante la estancia invernal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se germinaron plántulas de *Abies religiosa* en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (San Juanito Itzícuaru) en mayo del 2018, la semilla utilizada se obtuvo de una colecta a lo largo de un gradiente altitudinal (tabla 1) dentro de la Reserva de la Biósfera Mariposa Monarca. Las plántulas se crecieron durante 10 meses en una casa de sombra en tubetes de plástico de 380 cm<sup>3</sup>, el sustrato fue una mezcla de polvilla, agrolita, vermiculita, peat moss.

Cuadro 3. Altitud de origen de las siete procedencias utilizadas.

Procedencia	Altitud (msnm)
2	3491
3	3457
5	3364
6	3300
7	3233
8	3210
9	3143

Los tubetes ya con la planta trasplantada con una edad de 10 meses fueron a su vez colocados en vasos de vidrio de 510 ml parcialmente llenos de agua para saturar el sustrato de humedad. Se mantuvieron durante cuatro días bajo un ventilador como acondicionamiento para incrementar la demanda evapotranspirativa. Posteriormente, se aplicó polietilenglicol (PEG 8000) a una concentración creciente de 2.5% hasta llegar al 20% (no es posible exceder el 20%, ya que el PEG precipita a concentraciones

mayores). Adicionalmente, se mantuvo un lote control sólo con agua. Cada día se pesaron los vasos con las plantas para calcular el consumo de agua (debido a la evapotranspiración) con base en el peso. Estas mediciones se realizaron hasta que la primera planta murió por el efecto del estrés por sequía.

Se realizaron tres repeticiones del experimento en las siguientes fechas: 25 de marzo, 1 de mayo y 19 de mayo del 2019. En la primera repetición se utilizaron dos plantas por procedencia; de ellas, por cada procedencia, a una planta se le aplicó el polietilenglicol y a la otra no, como lote control. En las siguientes repeticiones se utilizaron tres plantas por procedencia y en este caso a todas se les aplicó el polietilenglicol.

A partir de que la primera planta mostró síntomas de estrés hídrico, se evaluó dicho daño con un índice de escala visual del 1 al 6 (Fig. 15), hasta que murió la primera planta, donde:

- 1: Planta saludable, acículas de color verde oscuro las de mayor edad, y color verde claro las más nuevas, con los nuevos brotes erectos.
- 2: Acículas con pérdida de turgencia de color un poco amarillento y brotes inclinados por la pérdida de turgencia.
- 3: Acículas inclinadas por pérdida de turgencia color verde grisáceo en su mayoría y pocas acículas de color verde claro o amarillento.
- 4: Planta con follaje de color verde grisáceo, acículas inclinadas por falta de turgencia, acículas con los nuevos brotes a veces agrupadas hacia el centro del brote.
- 5: Planta con follaje de color verde grisáceo, las acículas con rigidez que al doblarlas se rompen con facilidad y se inclinan hacia el centro del tallo. El tallo aún es flexible.
- 6: Planta con follaje de color verde grisáceo, tallo rígido que al doblarse se rompe fácilmente. Planta aparentemente muerta.



Valor: 1.2 (procedencia 2b)



Valor: 2 (procedencia 5b)



Valor: 3.6 (procedencia 2a)



Valor: 4.2 (procedencia 3a)



Valor: 5.3 (procedencia 6a)



Valor: 6 (procedencia 2a)

*Figura 15. Ejemplo del daño por sequía de algunas plantas, mostrando valores diferentes de dicho daño. La letra a seguida del número indica las plantas a las que se les aplicó PEG, la letra b indica las plantas testigo (sin PEG).*

Posteriormente, se cosecharon las plantas para estimar el peso seco de la parte aérea. Una vez cosechadas, se colocaron en una estufa de secado a 60 °C durante 72 horas, para después pesarlas.

### **Análisis estadístico.**

Se realizó un análisis de varianza con el paquete estadístico de SAS (SAS Institute 2004), comparando el efecto del tratamiento (con y sin polietilenglicol), y como las diferencias entre procedencias.

## RESULTADOS

### **Demanda evapotranspirativa:**

Se confirmó el efecto de inducción de estrés por sequía que tiene el PEG sobre las plantas ( $P = 0.0002$ ; tabla 1). Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre procedencias (tabla 2). Es decir, no se encontró diferencia significativa respecto al consumo de agua entre procedencias, únicamente entre tratamientos, donde las plantas control consumieron mayor cantidad de agua en comparación con las que se les aplicó polietilenglicol (Fig. 16 y 17).

*Cuadro 4. Análisis de varianza comparando el tratamiento (con y sin polietilenglicol) con base en el índice de sequía.*

<b>F.V.</b>	<b>g.l.</b>	<b>C.M.</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Tratamiento</b>	1	29.1	27.6	0.0002
<b>Error</b>	12	12.6		

*Cuadro 5. ANOVA comparando las siete procedencias, así como las tres repeticiones bajo el tratamiento de polietilenglicol con base en el índice de sequía.*

<b>F.V.</b>	<b>g.l.</b>	<b>C.M.</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>Repetición</b>	2	3.34	2.41	0.1005
<b>Procedencia</b>	6	1.36	0.98	0.4488
<b>Error</b>	47	1.39		

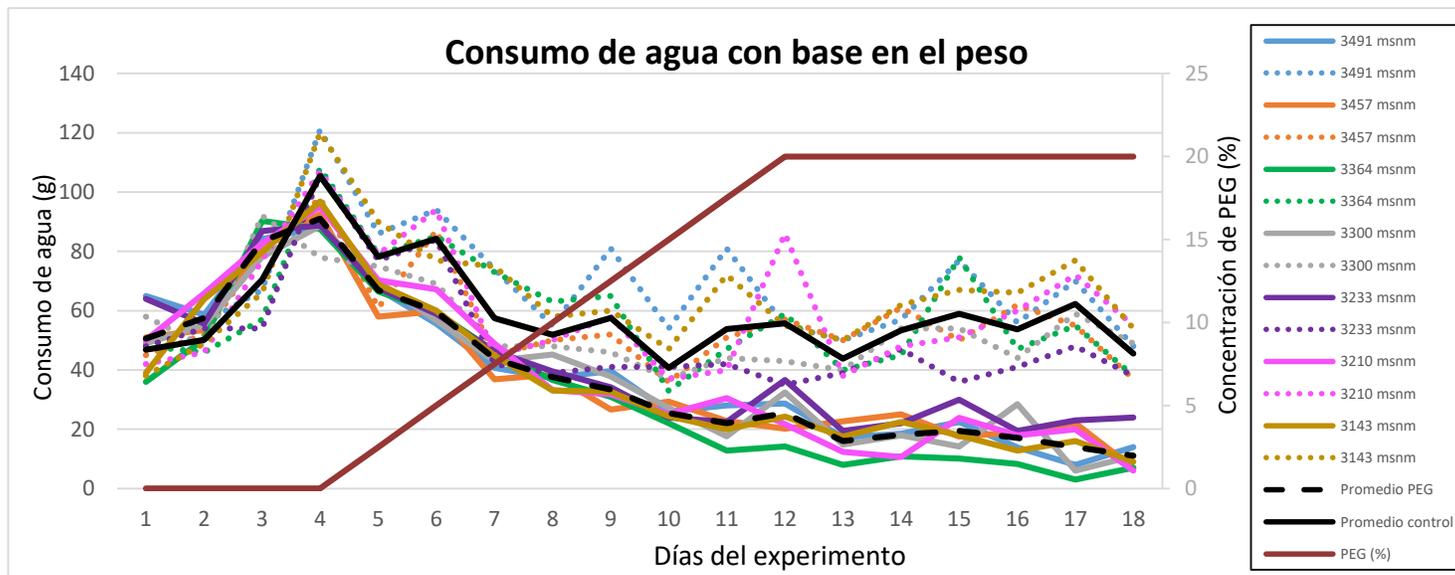


Figura 16. Promedio del consumo de agua de las tres repeticiones para cada procedencia. Las líneas punteadas indican las plantas utilizadas como control, las líneas continuas son de las procedencias bajo el efecto del PEG.

Si bien, la procedencia originada a 3233 msnm es la que más consumió agua a pesar de estar bajo el efecto del polietilenglicol, no es estadísticamente significativa la diferencia entre el consumo de esa procedencia y las otras seis procedencias.

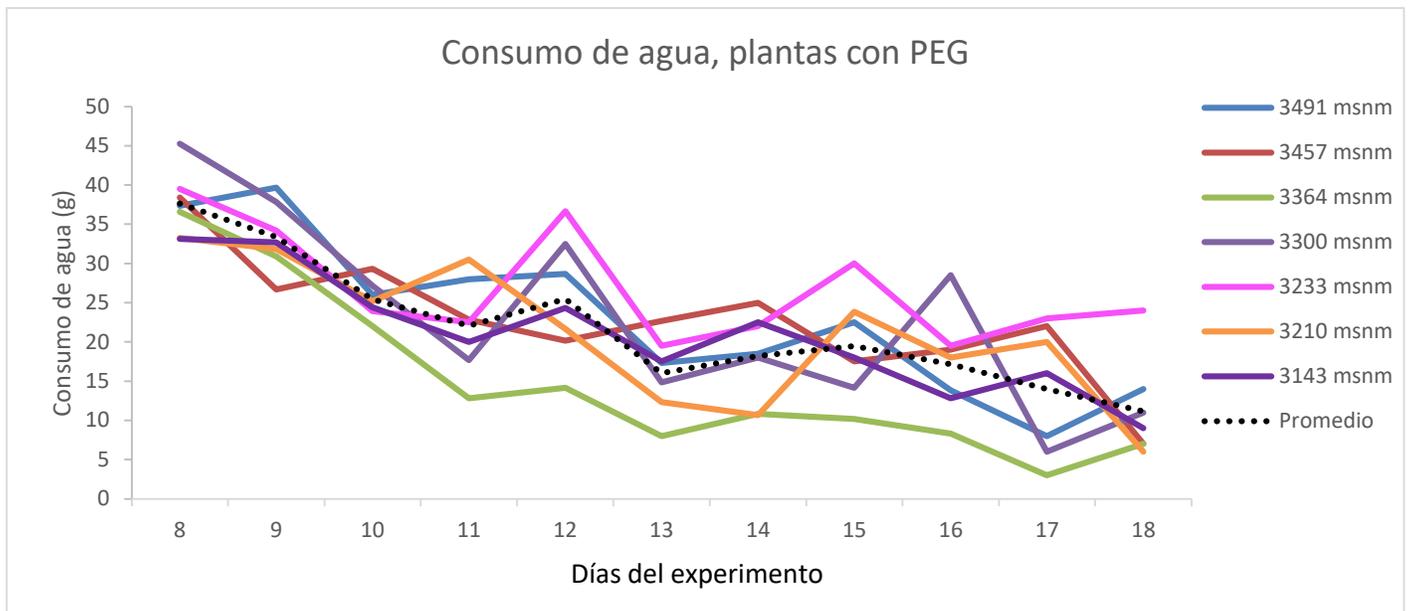


Figura 17. Consumo de agua a partir del octavo día del experimento (cuando empezaron a ser evidentes signos de estrés por sequía), sólo de plantas con polietilenglicol.

### Daño por sequía:

El daño por sequía mediante el índice de estrés se comenzó a evaluar el día 8 del experimento, es decir, cuando tenían el 10% de PEG (Fig. 16), debido a que, a partir de ese momento, por lo menos una de las plantas mostró signos de estrés hídrico (Fig. 15).

Se realizó también una relación entre el consumo de agua y el daño por sequía para así comprobar la hipótesis (a mayor consumo de agua el daño por sequía es menor). Con ello se observó que no hay correspondencia evidente entre dichas variables (Fig. 18), ya que sólo en las procedencias correspondientes a 3233 y 3210 msnm se observa que cuando el consumo de agua es mayor el índice de sequía es más bajo, es decir, la planta está más sana, y cuando el consumo de agua es menor el valor del índice de sequía es más alto.

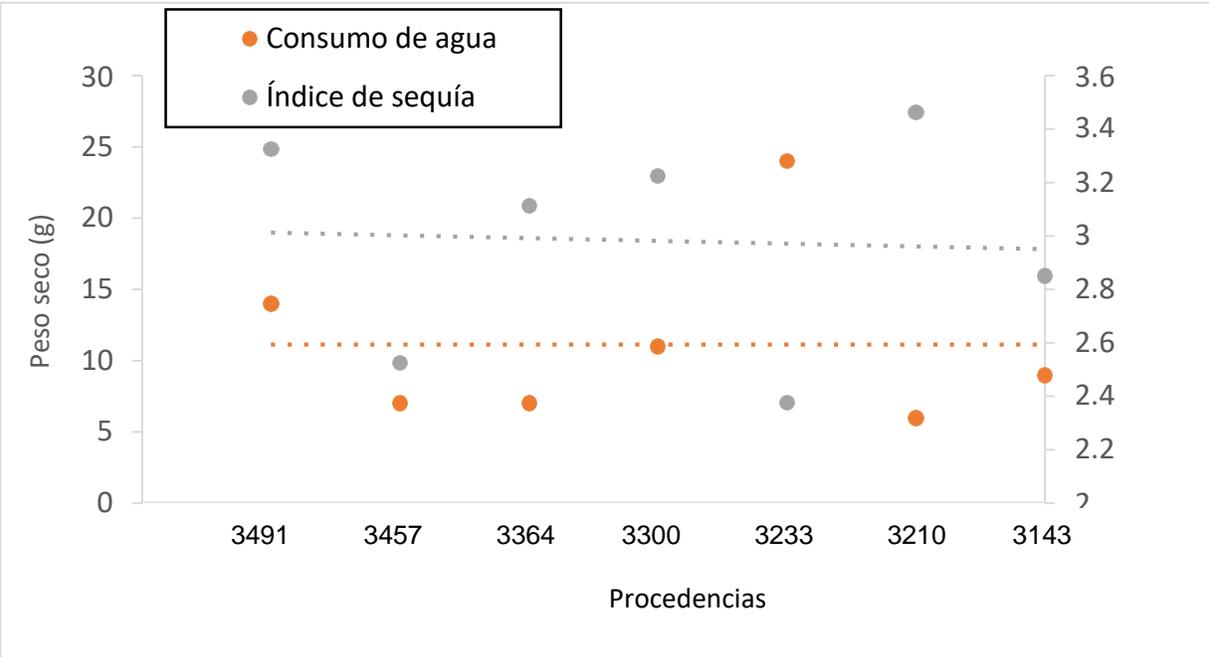


Figura 15. Relación entre el consumo de agua y el índice de sequía promedio por procedencia.

En lo que se refiere al peso seco, se hizo una relación entre éste y el consumo de agua, donde no se encontró una asociación entre el mayor consumo de agua con un mayor peso seco (Fig. 19).

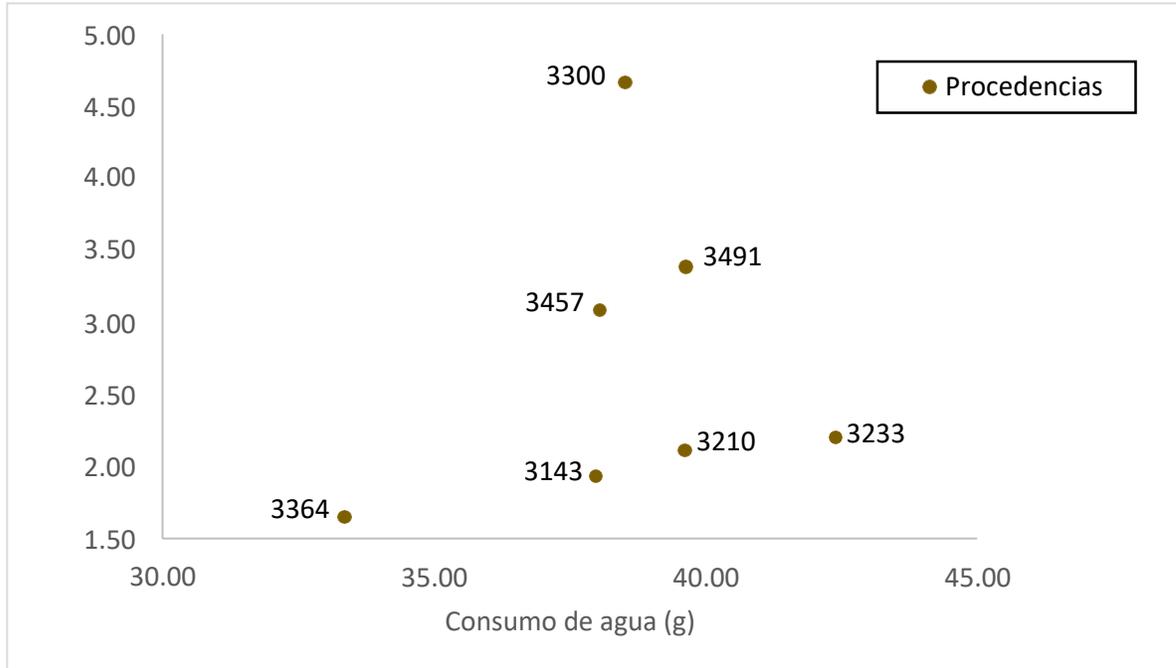


Figura 16. Relación entre el peso seco y el consumo de agua promedio por procedencia. Se indica altitud de cada procedencia.

## DISCUSIÓN

Existe un continuo de respuestas estomáticas a la sequía, desde la prevención de la ésta, en la cual los estomas se cierran para minimizar la transpiración, hasta la tolerancia a la sequía, en la cual el cierre estomático es menos grave y la transpiración continúa a tasas relativamente altas (Allen 2010). En este experimento, la respuesta de las plantas fue preventiva, pues aparentemente la presencia del polietilenglicol indujo el cierre de estomas, lo que a su vez causó la disminución del consumo de agua. Este proceso no ocurrió en el lote testigo de plantas que no tenían PEG, ya que aparentemente éstas siguieron consumiendo agua normal.

Con la aplicación de PEG se logró inducir el estrés hídrico, de manera similar como lo hizo Rangel-Fajardo *et al.* (2019), Bogado-Villalba (2016), Moreno-Bermúdez *et al.* (2014, 2017) y Gámez-González *et al.* (2005), en cuyos resultados se puede observar el efecto que tiene el PEG sobre las plantas sometidas al mismo. En nuestro caso se comprobó nuestra hipótesis de que, a mayor consumo de agua, el valor del índice de sequía fue menor. Es decir, las plantas que no fueron sometidas a PEG y que por lo tanto aparentemente no dejaron de consumir agua, tuvieron un valor en el índice de sequía menor, mostrándose plantas visualmente más sanas.

En lo que se refiere a las procedencias, no hubo diferencia significativa entre éstas ( $P = 0.4488$ ). Este resultado es contrario a lo que encontró López-Rodríguez y colaboradores (2008) en dos especies de *Pinus*. En este caso, no se comprobó nuestra hipótesis de que las procedencias originadas a menor altitud toleren mejor el estrés inducido por el PEG. El resultado no apoya nuestra expectativa de que las procedencias a menor altitud, que conforman lo que Mátyás (2010) denomina límite xérico, hubieran expresado una mayor tolerancia a la sequía. De haberse encontrado tal resultado, sería deseable que tales procedencias se conservaran, como un valioso recurso genético para conferir resistencia a la disminución de precipitación proyectada por el cambio climático.

## CONCLUSIONES

Las plantas creciendo en un sustrato con polietilenglicol consumieron menor cantidad de agua y mostraron daños evidentes de estrés por sequía a una concentración del 10% de PEG. En contraste, las plantas testigo, sin PEG, no mostraron ningún daño visible, ni mostraron síntomas de estrés por el aumento en la demanda evapotranspirativa causada por el ventilador.

Por otro lado, no hay una diferenciación genética entre procedencias en respuesta al estrés por sequía inducido por PEG, ni en la demanda evaporativa inducida por el ventilador.

Al no comprobar nuestra hipótesis de que las procedencias originadas a menor altitud (límite xérico *sensu* Mátyás 2010) toleren mejor el estrés por sequía, los resultados indican que aparentemente no es una opción la selección de procedencias resistentes a sequía para conferir una mayor resiliencia ante la proyección de una menor precipitación por el cambio climático.

Sería importante implementar otras estrategias, como lo es la migración asistida, para así mover altitudinalmente a las plantas de *Abies religiosa* hacia donde se cree que estará el clima propicio para ellas en las próximas décadas de acuerdo con las proyecciones de cambio climático.

## LITERATURA CITADA

- Adams, H. D., M. Guardiola-Claramonte, G. A. Barron-Gafford, J. C. Villegas, D. D. Breshears, C. B. Zou, P. A. Troch, and T. E. Huxman. 2009. Temperature sensitivity of drought-induced tree mortality portends increased regional die-off under global-change-type drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 106:7063–7066.
- Alfaro, R. I., Fady B., Giuseppe V. G., Dawson I. K., Fleming R. A., Sáenz-Romero C., Lindig-Cisneros R. A., Murdock T., Vinceti B., Navarro C. M., Scroppa T., Baldinelli G., El-Kassaby Y., Loo J. 2014. The role of forest resources in responding to biotic and abiotic factors in the context of anthropogenic climate change. *Forest Ecology and Management* 333 76-87.
- Allen, C. D., A. K. Macalady, H. Chenchouni, D. Bachelet, N. McDowell, M. Vennetier, T. Kitzberger, A. Rigling, D. D. Breshears, E.H. (Ted) Hogg, P. Gonzalez, R. Fensham, Z. Zhang, J. Castro, N. Demidova, J. H. Lim, G. Allard, S. W. Running, A. Semerci and N. Cobb. 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management* 259 (2010) 660–684.
- Bogado-Villalba, L. y H. Nakayama-Nakashima. 2016. Efecto del estrés hídrico inducido con PEG 6000 sobre el crecimiento in vitro de plantas de *Stevia rebaudiana* cv. 'KHIAN/ VC-142'. *Biotecnología Vegetal* 16 (3): 189 – 192.
- Gámez-González, H., E. Márquez- García, R. Hernández-Salinas, S. Moreno-Limón, F. Zavala-García y M. 2005. González-Álvarez. Evaluación del efecto de la sequía osmótica en la degradación de almidón en dos variedades de maíz. *Memorias del VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Guanajuato, Guanajuato. 1 al 3 de junio del 2005.
- López-Rodríguez, R., M. D. Venturas, I. Aranda-García y L. Gil-Sánchez. 2008. Evaluación precoz de la resistencia a la sequía inducida con polietilén glicol en

cultivos hidropónicos de especies forestales. Actas de la IV Reunión sobre Genética Forestal. Sociedad Española de Ciencias Forestales. 24: 51-56.

- Mátyás C. 2010. Forecasts needed for retreating forests. *Nature*, 464: 1271.
- McDowell N., W.T. Pockman, C. D. Allen, D. D. Breshears, N. Cobb, T. Kolb, J. Sperry, A. West, D. Williams, E. A. Yezzer, 2008. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *Tansley review. New Phytologist* 178: 719–739.
- Moreno-Bermúdez L. J., M. Reyes, R. Gómez-Kosky y B. Chong-Pérez. 2017. Mínima concentración de polietilenglicol 6000 para seleccionar in vitro plantas de *Musa* spp. tolerantes a estrés hídrico. *Biotecnología Vegetal* Vol. 17, No. 2: 125 – 133.
- Moreno-Bermúdez L. J., R. Gómez-Kosky, M. Reyes, C. Mbabazi y B. Chong-Pérez. 2014. Respuesta de plantas in vitro de banano cv. 'Grande naine' (*Musa* AAA) al estrés hídrico inducido con polietilenglicol. *Biotecnología Vegetal* Vol. 14, No. 1: 21 – 27.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2006. Evapotranspiración del cultivo, guías para la determinación de los requerimientos de agua de los cultivos. 34 p.
- Rangel-Fajardo M. A., N. Gómez-Montiel, J. I. Tucuch-Haas, D. de la Cruz Basto-Barbudo, A. Villalobos-González, J. A. Burgos-Díaz. 2019. Polietilenglicol 8000 para identificar maíz tolerante al estrés hídrico durante la germinación. *Agron. Mesoam.* 30(1):255-266.
- Sáenz-Romero, C., G. E. Rehfeldt, N. L. Crookston, P. Duval, R. St-Amant, J. Beaulieu, B. A. Richardson. 2010. Spline models of contemporary, 2030, 2060 and 2090 climates for Mexico and their use in understanding climate-change impacts on the vegetation. *Climatic Change* 102: 595–623.

SAS Institute Inc. (2004) SAS/STAT Computer Software. Release 9.1 3<sup>th</sup> edition. SAS Institute Inc, Cary North Carolina, USA.

Weed A. S., M. P. Ayres, and J. A. Hicke. 2013. Consequences of climate change for biotic disturbances in North American forests. *Ecological Monographs* 83(4): 441–470.

## DISCUSIÓN GENERAL

A pesar de que se evaluaron tres experimentos diferentes en respuesta a la sequía, de producción de prolina y evapotranspiración bajo estrés hídrico inducido, en ninguno de ellos se encontró diferencia genética entre procedencias.

Por un lado, en el experimento de la prolina, se pudo observar el efecto que tiene la sequía en las plantas, en donde este aminoácido aumentó su concentración al ir incrementándose los días sin riego, notándose la diferencia con respecto a las plantas que sí tenían riego; esto como un aparente mecanismo para tolerar el estrés por sequía. En los ensayos de campo, las plantas en la temporada de sequía aumentaron su nivel de prolina respecto a la temporada de lluvias. También se pudo comprobar la importancia que tienen las plantas nodriza, ya que las plantas de *Abies religiosa* que estaban bajo la sombra de arbusto produjeron menos cantidad de prolina que las expuestas a cielo abierto.

En el experimento de evapotranspiración se logró inducir el estrés hídrico de una manera homogénea, para de esta forma observar el comportamiento de las plantas, así como los cambios fisiológicos en éstas.

Se comprobó nuestra hipótesis de que, a mayor consumo de agua, el valor del índice de sequía fue menor. Es decir, las plantas testigo (sin polietilenglicol (PEG)) permanecieron saludables hasta el término del experimento, mientras que las plantas sometidas a PEG mostraron síntomas de estrés hídrico a partir del día ocho del experimento.

Aunque no hubo diferencia entre procedencias, se encontraron diferencias al momento de someter las plantas a una corriente de viento (mediante un ventilador) donde la evapotranspiración aumentó, y cuando se les agregó polietilenglicol, ésta disminuyó. Probablemente las plantas al percibir la presencia del PEG, cerraron sus estomas para minimizar la transpiración.

## CONCLUSIONES GENERALES

Aunque hay diferencias entre tratamientos en los experimentos llevados a cabo (con y sin inducción de estrés por sequía mediante supresión de riego y aplicación de polietilenglicol, exposición a temporada de lluvias y de secas, plantación con y sin la protección de plantas nodriza), no se encontraron diferencias significativas entre procedencias. Por lo tanto, no se comprobó nuestra hipótesis de que las procedencias de menor altitud, cercanas al límite xérico de la distribución natural de la especie, toleraran mejor el estrés hídrico. De haberse encontrado tal resultado, sería deseable que estas procedencias se conservaran, como un valioso recurso genético para conferir resistencia a la disminución de precipitación y aumento de temperatura proyectada por el cambio climático.

Considerando que las procedencias de *Abies religiosa* aparentemente no tienen una adaptación genética diferenciada a la sequía, ello limita las opciones de manejo de los recursos genéticos forestales que nos ayuden a mitigar el estrés por sequía. Esto sugiere la posible susceptibilidad de todas las procedencias a lo largo de gradientes altitudinales a los efectos de un creciente estrés hídrico inducido por el cambio climático.

Dado que las plantas nodrizas les confieren un ambiente más favorable a las plantas de *A. religiosa*, disminuyendo el estrés por sequía, sería importante el establecimiento de arbustos como planta nodriza al menos dos años antes de que se lleve a cabo una reforestación de *Abies religiosa*, para de esta forma asegurar el mayor porcentaje de supervivencia ante un ambiente que implique estrés hídrico.

## LITERATURA GENERAL

- Albeck-Ripka, L. 2020. Los incendios en Australia se calmaron, pero esta ciudad costera sigue aislada. <https://www.nytimes.com/es/2020/01/15/espanol/incendios-australia.html>. (Accesada en febrero de 2020).
- Allen, C.D., A. K. Macalady, H. Chenchouni, D. Bachelet, N. McDowell, M. Vennetier, T. Kitzberger, A. Rigling, D. D. Breshears, E. H. Hogg, P. Gonzalez, R. Fensham, Z. Zhang, J. Castro, N. Demidova, J. H. Lim, G. Allard, S. W. Running, A. Semerci, N. Cobb. 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management* 259, 660–684
- Breshears, D. D., N. S. Cobb, P. M. Rich, K. P. Pricee, C. D. Allen, R. G. Baliceh, W. H. Romme, J. H. Kastensf, M. L. Floydk, J. Belnapl, J. J. Anderson, O. B. Myers and C. W. Meyer. 2005. Regional vegetation die-off in response to global-change-type drought. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:15144–15148.
- Davis, M.B., R.G. Shaw, 2001. Range shifts and adaptive responses to quaternary climate change. *Science* 292, 673–679.
- Engelbrecht, B. M. J., L. S. Comita, R. Condit, T. A. Kursar, M. T. Tyree, B. L. Turner & S. P. Hubbell. 2007. Drought sensitivity shapes species distribution patterns in tropical forests. *Nature* 447:80–82.
- Guariguata, M.R., J.P. Cornelius, B. Locatelli, C. Forner, G. A. Sanchez-Azofeifa, 2008. Mitigation needs adaptation: tropical forestry and climate change. *Mitig. Adapt. Strat. Glob. Change* 13: 793–808.
- Johnsen, O., C. G. Fossdal, N. Nagy, J. Molmann, O. G. Daehlen, T. Skrøppa, 2005. Climatic adaptation in *Picea abies* progenies is affected by the temperature during zygotic embryogenesis and seed maturation. *Plant, Cell Environ.* 28: 1090–1102.

- Jump, A.S. and J. Peñuelas 2005. Running to stand still: adaptation and the response of plants to rapid climate change. *Ecol. Lett.* 8, 1010–1020.
- Koski, V., T. Skrøppa, L. Paule, H. Wolf, J. Turok. 1997. Technical guidelines for genetic conservation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 42 p.
- McDowell N., W.T. Pockman, C. D. Allen, D. D. Breshears, N. Cobb, T. Kolb, J. Sperry, A. West, D. Williams, E. A. Yezzer, 2008. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *Tansley review. New Phytologist* 178: 719–739.
- McLachlan, J., J. J. Hellmann y M. W. Schwartz. 2007. A framework for debate of assisted migration in an era of climate change. *Conserv. Biol.* 21: 297–302.
- Pigliucci, M., C. J. Murren. 2003. Genetic assimilation and a possible evolutionary paradox: can macroevolution sometimes be so fast as to pass us by? *Evolution* 57: 1455–1464.
- Williams J. W., S. T. Jackson, J. E. Kutzbach. 2007. Projected distributions of novel and disappearing climates by 2100 AD. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:5738–574.