

# Growth of naturally regenerated *Abies religiosa* (Kunth) Schltld. & Cham. seedlings in a nursery and genetic variation among provenances

## Crecimiento de plántulas de regeneración natural de *Abies religiosa* (Kunth) Schltld. & Cham. en vivero y variación genética entre procedencias

Ana L. Cruzado-Vargas<sup>1,2</sup>; Francisco J. Zamudio-Sánchez<sup>1,3</sup>; Gabriel A. Rodríguez-Yam<sup>1,3</sup>; Aglaen L. Carbajal-Navarro<sup>4</sup>; José A. Blanco-García<sup>4</sup>; Cuauhtémoc Sáenz-Romero<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. km 38.5 carretera México-Textcoco, C. P. 56230. Textcoco, Estado de México, México.

<sup>2</sup>Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Unidad San Juanito Itzicuaru. Av. San Juanito Itzicuaru s/n, col. Nueva Esperanza. C. P. 58337. Morelia, Michoacán, México.

<sup>3</sup>Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Matemática, Estadística y Cómputo. km 38.5 carretera México-Textcoco, C. P. 56230. Textcoco, Estado de México, México.

<sup>4</sup>Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Biología. Gral. Francisco J. Múgica s/n, Ciudad Universitaria. C. P. 58030. Morelia, Michoacán, México.

<sup>5</sup>Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales. Av. San Juanito Itzicuaru s/n, col. Nueva Esperanza. C. P. 58337. Morelia, Michoacán, México.

\*Corresponding author: [csaenzromero@gmail.com](mailto:csaenzromero@gmail.com); tel.: +52 (443) 271 9388.

### Abstract

**Introduction:** The forests of *Abies religiosa* (Kunth) Schltld. & Cham. in the Monarch Butterfly Biosphere Reserve (MBBR) serve as a refuge for the monarch butterfly.

**Objective:** To determine the viability of growing naturally regenerated *A. religiosa* seedlings in a nursery and the existence of genetic variation associated with the altitudinal gradient among populations.

**Materials and methods:** Recently naturally germinated seedlings were collected in an altitudinal transect (2960 to 3450 m) that covered six populations of the MBBR. The plants grew for 18 months in a nursery at 3000 m.

**Results and discussion:** The average survival of *A. religiosa* was 75 %. The plants showed significant differences in survival ( $P < 0.0001$ ), height ( $P = 0.0430$ ) and basal diameter ( $P < 0.0001$ ) among provenances; the populations of the altitudinal extremes had the highest values.

**Conclusion:** Transplanting plants that naturally germinated in the forest into containers for nursery growth is feasible. The altitudinal pattern was atypical, since the populations of the altitudinal extremes had the best growth.

**Keywords:** sacred fir; altitudinal gradient; plant height; survival; basal diameter.

### Resumen

**Introducción:** Los bosques de *Abies religiosa* (Kunth) Schltld. & Cham. en la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca (RBMM) sirven como refugio para la mariposa monarca.

**Objetivo:** Determinar la viabilidad del crecimiento de plántulas de regeneración natural de *A. religiosa* en vivero y la existencia de variación genética asociada al gradiente altitudinal entre poblaciones.

**Materiales y métodos:** Se recolectaron plántulas recién germinadas de manera natural en un transecto altitudinal (2960 a 3450 m) que abarcó seis poblaciones de la RBMM. Las plantas crecieron durante 18 meses en un vivero a 3000 m de altitud.

**Resultados y discusión:** La supervivencia promedio de *A. religiosa* fue de 75 %. Las plantas mostraron diferencias significativas en la supervivencia ( $P < 0.0001$ ), altura ( $P = 0.0430$ ) y diámetro basal ( $P < 0.0001$ ) entre procedencias; las poblaciones de los extremos altitudinales tuvieron los valores más altos.

**Conclusión:** El trasplante de plantas germinadas de manera natural en el bosque a envases para su crecimiento en vivero es viable. El patrón altitudinal fue atípico, ya que las poblaciones de los extremos altitudinales tuvieron el mejor crecimiento.

**Palabras clave:** oyamel; gradiente altitudinal; altura de planta; supervivencia; diámetro basal.

## Introduction

The number of monarch butterflies (*Danaus plexippus* L.) has decreased due to three main factors: degradation in hibernation zones in Mexico; reduction in breeding areas in the United States due to the loss of cottonwood plants (*Asclepias* spp.; host plants), as well as land-use change; and changes in climatic conditions (Brower et al., 2012). Reforestation of the Monarch Butterfly Biosphere Reserve (MBBR), on the borders of the states of Michoacán and Mexico, is important to increase the number of trees where the butterfly overwinters.

*Abies religiosa* (Kunth) Schltld. & Cham. is the dominant forest species at overwintering sites. Based on our direct experience, nursery plant production of this species entails greater difficulty than plant production of the genus *Pinus*, due to the following reasons: (a) the female cones of *A. religiosa* are produced almost exclusively at the upper end of the crown, which makes collection difficult and expensive (Arriola et al., 2015; Nieto de Pascual-Pola, Musálem, & Ortega-Alcalá, 2003), especially when they are large trees; (b) *A. religiosa* usually has a high percentage of empty seeds, a low germination percentage (Iglesias-Andreu et al., 2010; Nieto de Pascual-Pola et al., 2003) and a short life under storage conditions (Arriola et al., 2015; Carrillo, Patiño, & Talavera, 1980; Nieto de Pascual-Pola et al., 2003; Salazar & Soihet, 2001); and (c) obtaining permits for the collection of *A. religiosa* seed in the MBBR's core area is complicated. This last difficulty occurs because rule 62 of the MBBR Management Program (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas [CONANP], 2001) stipulates that during the monarch butterfly hibernation season, a period that coincides with the ripening of cones in November and December, it is prohibited to engage in activities that put the butterfly at risk. Additionally, when the seed is collected by personnel external to the communities and ejidos of the MBBR, a permit is required from SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2018), which, in order to grant it, requests that the applicant demonstrate the consent of the communities (SEMARNAT-02-004 procedure). The consent document is prepared for each of the communities and ejidos in which seed is collected. This process is complex, since it is difficult to obtain the minimum legal quorum of the ejidal and communal assemblies, when the motive is only to give permission.

This situation has led to the production of nursery plants using seed from outside the MBBR's core area, which implies that the plant does not adapt due to a lack of coupling between the climate of the seed collection site and the planting site (Castellanos-Acuña et al., 2018; Castellanos-Acuña, Lindig-Cisneros, Silva-Farías, & Sáenz-Romero, 2014; Johnson, Sorensen, St. Clair, & Cronn, 2004). As an alternative, the *ejidatarios* (ejido

## Introducción

En la actualidad, el número de mariposas monarca (*Danaus plexippus* L.) se ha reducido debido a tres factores principales: degradación en zonas de hibernación en México; reducción de áreas de reproducción en Estados Unidos por la pérdida de plantas de algodoncillo (*Asclepias* spp.; plantas hospederas), incluyendo el cambio de uso de suelo; y cambios en las condiciones climáticas (Brower et al., 2012). La reforestación de la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca (RBMM), en los límites de los estados de Michoacán y México, es importante para incrementar el número de árboles donde la mariposa hiberna.

*Abies religiosa* (Kunth) Schltld. & Cham. es la especie forestal dominante en los sitios de estancia invernal. Con base en nuestra experiencia directa, la producción de planta en vivero de esta especie presenta mayor dificultad que la producción de planta del género *Pinus*, debido a las razones siguientes: (a) los conos femeninos de *A. religiosa* se producen casi exclusivamente en el extremo superior de la copa, lo cual dificulta y encarece la recolecta (Arriola et al., 2015; Nieto de Pascual-Pola, Musálem, & Ortega-Alcalá, 2003), sobre todo cuando son árboles de gran tamaño; (b) *A. religiosa* usualmente presenta porcentaje alto de semillas vanas, porcentaje bajo de germinación (Iglesias-Andreu et al., 2010; Nieto de Pascual-Pola et al., 2003) y vida corta bajo condiciones de almacenamiento (Arriola et al., 2015; Carrillo, Patiño, & Talavera, 1980; Nieto de Pascual-Pola et al., 2003; Salazar & Soihet, 2001); y (c) la obtención de permisos para la recolecta de semilla de *A. religiosa* en el área núcleo de la RBMM es complicada. Esto último ocurre debido a que la regla 62 del Programa de Manejo de la RBMM (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas [CONANP], 2001) estipula que durante la temporada de hibernación de la mariposa monarca queda prohibido realizar actividades que la pongan en riesgo, periodo que coincide con la maduración de conos en noviembre y diciembre. Adicionalmente, cuando la semilla es recolectada por personal externo a las comunidades y ejidos de la RBMM se requiere un permiso de la SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2018) quien, para otorgarlo, solicita demostrar el consentimiento de las comunidades (trámite SEMARNAT-02-004). El documento de anuencia se elabora para cada una de las comunidades y ejidos en los que se recolecta semilla. Este proceso es complejo, ya que es difícil reunir el *quorum* legal mínimo de las asambleas ejidales y comunales, cuando el motivo es únicamente dar el permiso.

Esta situación ha generado que la producción de planta en vivero se realice con semilla ajena al área núcleo de la RBMM, lo cual implica que la planta no se adapte por falta de acoplamiento entre el clima del sitio de obtención de la semilla y el de plantación (Castellanos-Acuña et al., 2018; Castellanos-Acuña, Lindig-Cisneros,

members) and *comuneros* (joint land holders) of the MBBR have raised the possibility of rescuing naturally regenerated plants that, based on their practical experience, would otherwise die in the dry season following their germination. A thick layer of moss (>10 cm) is common in the area, which acts as a mechanical barrier, preventing the seedlings that germinate and emerge from reaching the soil (Rodríguez-Laguna, Razo-Zárate, Fonseca-González, Capulín-Grande, & Goche-Telles, 2015). In many cases, the seedlings do not survive the dry season of the following year (Madrigal-Sánchez, 1967; Manzanilla, 1974; Marañón et al., 2004), because the moss dehydrates (Ángeles-Cervantes & López-Mata, 2009; Chen et al., 2015) or acts as a competitor for the seedling of this conifer (Stuiver, Wardle, Gundale, & Nilsson, 2014).

In a sampling of *A. religiosa* populations in an altitudinal transect (2850 m to 3350 m) on San Andrés hill, 50 km west of the MBBR, Castellanos-Acuña et al. (2014) observed an altitudinal pattern of morphological variation in needles and cones, where higher-altitude populations showed longer needles and shorter cones than low-altitude populations. Generally, an assay of *A. religiosa* provenances collected along an altitudinal gradient indicates an important genetic differentiation between populations, considering that such expression can be quantified whenever the plants grow in the same environment (Sáenz-Romero, Beaulieu, & Rehfeldt, 2011; Sáenz-Romero et al., 2012; Sáenz-Romero, Ruiz-Talonia, Beaulieu, Sánchez-Vargas, & Rehfeldt, 2011). Populations originating at lower altitudes produce plants with greater height, their dominant bud elongates more, they cease growth later in the year and they accumulate higher stem and foliage biomass, but are more susceptible to frost damage than plants originating at higher altitudes (Ortiz-Bibian et al., 2017); however, such a pattern has not been confirmed in provenance trials with seed collected directly from the MBBR.

Based on the above, the objective of the present study was to determine the viability of producing *A. religiosa* in a nursery from naturally regenerated seedlings, and the genetic variation of quantitative traits among populations, associated with an altitudinal gradient.

## Materials and methods

The recently germinated natural regeneration seedling was collected in an altitudinal gradient (2960 to 3450 m) located within the MBBR in the Casablanca, Guadalupe Buenavista and La Mesa ejidos, municipality of San José del Rincón, State of Mexico (Table 1). The seedlings germinated *in situ* in late spring and at the beginning of the rainy season in 2015 and were collected between the last week of October and the

Silva-Farías, & Sáenz-Romero, 2014; Johnson, Sorensen, St. Clair, & Cronn, 2004). Como alternativa a este problema, los ejidatarios y comuneros de la RBMM han planteado la posibilidad de rescatar plantas de regeneración natural que, con base en su experiencia práctica, morirían en la temporada de sequía siguiente a su germinación. En la zona es común la existencia de una capa de musgo gruesa (>10 cm) que actúa como barrera mecánica, impidiendo que las plántulas que germinan y emergen alcancen el suelo (Rodríguez-Laguna, Razo-Zárate, Fonseca-González, Capulín-Grande, & Goche-Telles, 2015). En muchos casos, las plántulas no sobreviven a la temporada de secas del año siguiente (Madrigal-Sánchez, 1967; Manzanilla, 1974; Marañón et al., 2004), debido a que el musgo se deshidrata (Ángeles-Cervantes & López-Mata, 2009; Chen et al., 2015) o actúa como un competidor para la plántula de esta conífera (Stuiver, Wardle, Gundale, & Nilsson, 2014).

En un muestreo de poblaciones de *A. religiosa* en un transecto altitudinal (2850 m a 3350 m) en el cerro de San Andrés, 50 km al oeste de la RBMM, Castellanos-Acuña et al. (2014) observaron un patrón altitudinal de variación morfológica en acículas y conos, donde las poblaciones de altitudes más elevadas mostraron acículas de mayor longitud y conos más cortos que las poblaciones de baja altitud. Generalmente, un ensayo de procedencias de *A. religiosa* recolectadas a lo largo de un gradiente altitudinal indica una diferenciación genética importante entre poblaciones, considerando que tal expresión se puede cuantificar toda vez que las plantas crezcan en un mismo ambiente (Sáenz-Romero, Beaulieu, & Rehfeldt, 2011; Sáenz-Romero et al., 2012; Sáenz-Romero, Ruiz-Talonia, Beaulieu, Sánchez-Vargas, & Rehfeldt, 2011). Las poblaciones originadas a menor altitud producen plantas con mayor altura, su ápice dominante elonga más, cesan su crecimiento más tarde en el año y acumulan mayor biomasa de tallo y follaje, pero son más susceptibles al daño por heladas que las plantas originadas en poblaciones de mayor altitud (Ortiz-Bibian et al., 2017); sin embargo, tal patrón no se ha confirmado en ensayos de procedencia con semilla recolectada directamente de la RBMM.

Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar la viabilidad de la producción de *A. religiosa* en vivero a partir de plántulas de regeneración natural, y la variación genética de caracteres cuantitativos entre poblaciones, asociada a un gradiente altitudinal.

## Materiales y métodos

La plántula de regeneración natural recientemente germinada se extrajo en un gradiente altitudinal (2960 a 3450 m) ubicado dentro de la RBMM en los ejidos

first week of November of the same year. The selected seedlings correspond to sites where there is a thick layer of moss (> 5 cm, personal observation), which is produced by the large amount of moisture in these areas during the time when the natural regeneration of *A. religiosa* is established.

In each altitudinal site, the collection was done through a selection of seedlings still with a testa, cotyledonary leaves (without primary leaves), and a thin, pink and vigorous stem with a height less than 5 cm. The seedlings were moved from the field to the nursery in containers, where the roots with naturally attached soil were covered with an additional layer of local soil (Figure 1).

At the test site, weeds were removed and the nursery was covered with a 50 % mesh shadehouse to prevent predation by animals, dehydration of plants by direct exposure to the sun, and damage by strong winds or hail. Immediately after their collection, the seedlings were transplanted into polyethylene bags (8 x 7 x 17 cm) for a nursery that contained local soil (previously sifted) as substrate from sites dominated by *A. religiosa*.

The experimental design was six completely randomized blocks. In total, there were 200 seedlings from each of the six provenances, randomly distributed within the blocks in continuous plots of 36 seedlings, arranged in three rows of 12 individuals, except block number six, in which there were only 20 seedlings per provenance. Seedlings were placed at the ends of the nursery beds to avoid the edge effect. The six blocks were placed in three beds (two blocks per bed) to facilitate the measurement work with accessible corridors.

The height from the seedling was assessed from the base to the tip of the main bud (mm) and the basal diameter (0.1 mm) of the stem were evaluated bimonthly and semiannually, respectively, for 18 months (December

Casablanca, Guadalupe Buenavista y La Mesa, municipio de San José del Rincón, Estado de México (Cuadro 1). Las plántulas germinaron de manera *in situ* a finales de la primavera e inicio de las lluvias de 2015 y se recolectaron entre la última semana de octubre y la primera semana de noviembre del mismo año. Las plántulas seleccionadas corresponden a sitios donde prevalece una capa gruesa de musgo (> 5 cm, observación personal), la cual se produce por la gran cantidad de humedad que guardan estas zonas durante la época en que se establece la regeneración natural de *A. religiosa*.

En cada sección altitudinal, la recolecta se hizo mediante una selección de plántulas aún con testa, hojas cotiledonares (sin hojas primarias), tallo delgado y de color rosa, vigorosas y con altura menor de 5 cm. Las plántulas se trasladaron del campo al vivero en recipientes, donde las raíces con tierra adherida de manera natural se cubrieron con una capa adicional de tierra de monte del lugar (Figura 1).

En el sitio de ensayo, la maleza se eliminó y el vivero se cubrió con una casa de malla sombra al 50 %, para evitar depredación por animales, deshidratación de las plantas por exposición directa al sol y daños por vientos fuertes o granizo. Inmediatamente después de su obtención, las plántulas se trasplantaron a bolsas de polietileno (8 x 7 x 17 cm) para vivero que contenían tierra de monte (previamente cernida) como sustrato, proveniente de sitios dominados por *A. religiosa*.

El diseño experimental fue de seis bloques completos al azar. En total se tuvieron 200 plántulas de cada una de las seis procedencias, distribuidas al azar dentro de los bloques en parcelas continuas de 36 plántulas, dispuestas en tres hileras de 12 individuos, excepto el bloque número seis, en el cual solo hubo 20 plántulas por procedencia. En los extremos de las camas de vivero se colocaron plántulas para evitar efecto de borde. Los seis bloques se ubicaron en tres camas (dos bloques

**Table 1. Location of the collection sites (provenance) of *Abies religiosa* seedlings and of the nursery trial site in the municipality of San José del Rincón, State of Mexico.**

**Cuadro 1. Ubicación de los sitios de recolecta (procedencia) de plántulas de *Abies religiosa* y del sitio del ensayo en vivero en el municipio de San José del Rincón, Estado de México.**

Provenance / Procedencia	Altitude (m) / Altitud (m)	N latitude / Latitud N	W longitude / Longitud O
Provenance 1 / Procedencia 1	3450	19° 34' 05.4"	100° 13' 53.0"
Provenance 2 / Procedencia 2	3350	19° 34' 28.0"	100° 13' 05.5"
Provenance 3 / Procedencia 3	3239	19° 34' 44.2"	100° 12' 51.6"
Provenance 4 / Procedencia 4	3157	19° 35' 24.0"	100° 12' 31.2"
Provenance 5 / Procedencia 5	3052	19° 35' 44.5"	100° 12' 06.9"
Provenance 6 / Procedencia 6	2960	19° 36' 56.0"	100° 11' 13.3"
<b>Nursery trial site / Sitio del ensayo en vivero</b>			
Poblado La Mesa	3 000	19° 35' 18.2"	100° 10' 46.1"



**Figure 1.** Transplanting of recent *Abies religiosa* seedlings that emerged naturally in the field into containers in a community forest nursery in the La Mesa ejido, San José del Rincón, State of Mexico. (a) Seedling naturally emerged at sites with a thick layer of diverse moss and mulch. (b) Extraction of natural regeneration plant. (c) Transport of seedling from the collection site to the nursery; the roots were protected by the use of moist local soil, in addition to the naturally adhered soil. (d) Transplant into nursery bag with local soil. (e) Provenance test; each nursery bed (three) contains two blocks (six in total).

**Figura 1.** Trasplante de plántulas de *Abies religiosa* recién emergidas de manera natural en campo a envases en un vivero forestal comunitario del ejido La Mesa, San José del Rincón, Edo. de México. (a) Plántula emergida naturalmente en sitios con una capa gruesa de musgo y mantillo diversos. (b) Extracción de planta de regeneración natural. (c) Transporte de plántula del sitio de recolecta al vivero; las raíces fueron protegidas mediante el uso de tierra húmeda de monte, adicional a la adherida naturalmente. (d) Trasplante a bolsa de vivero con tierra de monte. (e) Ensayo de procedencias; cada cama de vivero (tres) contiene dos bloques (seis en total).

2015 to May 2017), as well as the survival of each plant. The initial height or basal diameter was used as a covariate to rule out the effect of the initial size of the plant at the time of transplant to the nursery bag, because the exact germination date was not known.

An analysis of variance was performed using the SAS statistical package version 9.1 (SAS Institute, Inc. 2004) with the PROC GLM procedure, using the following statistical model:

por cama), para facilitar el trabajo de mediciones con pasillos accesibles.

La altura de la base de la plántula a la punta de la yema principal (mm) y el diámetro basal (0.1 mm) del tallo se evaluaron bimestral y semestralmente, respectivamente, durante 18 meses (diciembre de 2015 a mayo de 2017), así como la supervivencia de cada planta. La altura o el diámetro basal inicial se utilizó como covariable para descartar el efecto del tamaño

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

where,

$Y_{ijk}$  = observation of the  $k^{\text{th}}$  individual in the  $j^{\text{th}}$  provenance of the  $i^{\text{th}}$  block

$\mu$  = overall mean

$B_i$  = effect of the  $i^{\text{th}}$  block

$P_j$  = effect of the  $j^{\text{th}}$  provenance

$B_i * P_j$  = interaction between block and provenance (source of variation used as the error term to determine the significance of block and provenance)

$S_{ijk}$  = effect of covariate due to initial plant size

$E_{ijk}$  = error.

Provenance and block were considered random effects; the same model was used for survival, but without a covariate. Additionally, a regression of means of the variables evaluated by provenance was made against the altitude of provenance, in order to determine the association between the growth potential and the altitudinal gradient.

## Results

The average survival of *A. religiosa* seedlings was 75 % (Figure 2) 18 months after establishment in the nursery and approximately two years after the possible date of germination in the field. Table 2 indicates that the provenances caused significant differences in the survival ( $P < 0.0001$ ), height ( $P = 0.0430$ ) and basal diameter ( $P < 0.0001$ ) of *A. religiosa*.

According to Figure 3 and Table 3, the provenance with the most live plants was the one with the highest altitude (3450 m), being statistically similar to the lowest-altitude provenance (2960 m), while the lowest survival was an intermediate-altitude provenance (3157 m); regarding plant height, the 3350 m provenance had the highest value and was statistically similar to the provenances of the altitudinal extremes.

The altitudinal clinal pattern shown in Figure 4 indicates that the highest-altitude provenance had the greatest basal diameter and its value was statistically similar to that recorded in the 2960 m (lowest altitude) and 3350 m plants.

## Discussion

The altitudinal clinal pattern of survival, height and basal diameter, in terms of the good performance of the higher-altitude provenances, is different from that reported for other conifers in Mexico, such as *Pinus pseudostrabus* Lindl. (Viveros-Viveros, Sáenz-Romero, López-Upton, & Vargas-Hernández, 2005) or *Pinus hartwegii* Lindl. (Loya-Rebollar et al., 2013). In these species, lower-altitude populations had larger basal

initial de la planta al momento de su trasplante a la bolsa de vivero, debido a que la fecha de germinación no se sabe con exactitud.

Se realizó un análisis de varianza mediante el paquete estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute, Inc. 2004) con el procedimiento PROC GLM, usando el modelo estadístico siguiente:

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

donde,

$Y_{ijk}$  = observación del  $k$ -ésimo individuo en la  $j$ -ésima procedencia del  $i$ -ésimo bloque

$\mu$  = media general

$B_i$  = efecto del  $i$ -ésimo bloque

$P_j$  = efecto de la  $j$ -ésima procedencia

$B_i * P_j$  = interacción entre bloque y procedencia (fuente de variación usado como término de error para determinar la significancia de bloque y procedencia)

$S_{ijk}$  = efecto de la covariable debida al tamaño inicial de planta

$E_{ijk}$  = error.

La procedencia y el bloque se consideraron efectos aleatorios; para la supervivencia se usó el mismo modelo, pero sin covariable. Adicionalmente, se hizo una regresión de medias de las variables evaluadas por procedencia contra la altitud de origen, a fin de determinar la asociación entre el potencial de crecimiento y el gradiente altitudinal.

## Resultados

La supervivencia promedio de plántulas de *A. religiosa* fue de 75 % (Figura 2) a los 18 meses de su establecimiento en vivero y, aproximadamente, a los dos años desde la posible fecha de germinación en campo. El Cuadro 2 indica que las procedencias causaron diferencias significativas en la supervivencia ( $P < 0.0001$ ), altura ( $P = 0.0430$ ) y diámetro basal ( $P < 0.0001$ ) de *A. religiosa*.

De acuerdo con la Figura 3 y el Cuadro 3, la procedencia con más plantas vivas fue la de mayor altitud (3450 m), siendo estadísticamente similar a la altitud más baja (2960 m), mientras que la de menor supervivencia fue una procedencia de altitud intermedia (3157 m); con respecto a la altura de la planta, la procedencia de 3350 m tuvo el valor más alto y fue estadísticamente similar a las procedencias de los extremos altitudinales.

El patrón clinal altitudinal mostrado en la Figura 4 indica que la procedencia de mayor altitud tuvo el mayor diámetro basal y su valor fue estadísticamente similar al registrado en las plantas de 2960 m (altitud más baja) y 3350 m.

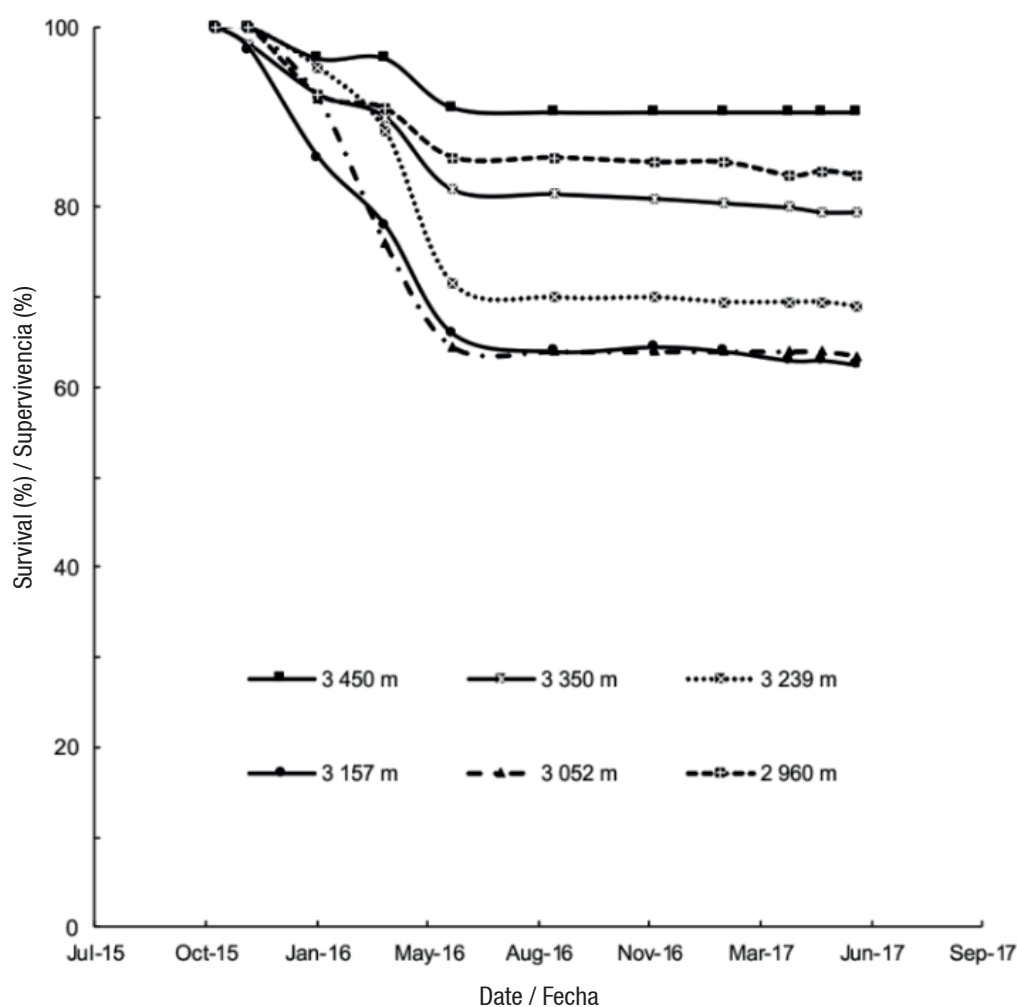


Figure 2. Survival curves of six provenances of naturally regenerated *Abies religiosa* plants in the Monarch Butterfly Biosphere Reserve.

Figura 2. Curvas de supervivencia de seis procedencias de planta de regeneración natural de *Abies religiosa* en la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca.

Table 2. Analysis of variance of the growth variables of six provenances of *Abies religiosa* from the Monarch Butterfly Biosphere Reserve.

Cuadro 2. Análisis de varianza de las variables de crecimiento de seis procedencias de *Abies religiosa* de la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca.

Source of variation/ Fuente de variación	df/ gl	Height/ Altura		Basal diameter/ Diámetro basal		Survival/ Supervivencia				
		MS/CM	P	MS/CM	P	MS/CM	P			
Block/Bloque	5	4 469	0.3959	ns	80.4	0.5346	ns	0.53	0.1133	ns
Provenance/Procedencia	5	10 715	0.0430	*	732.6	<0.0001	***	2.26	<0.0001	***
Block*Provenance/ Bloque*Procedencia	25	4 227	0.0002	***	97.5	0.0011	**	0.26	0.2272	ns
Covariate/Covariable	1	28 827	<0.0001	***	438	0.0021	**	---	---	---
Error	718	1 774			46			0.22		

df = degrees of freedom (height and basal diameter = 718; survival = 1164); MS = mean square. \* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; ns = not significant.

gl = grados de libertad (altura y diámetro basal = 718; supervivencia = 1164); CM = cuadrado medio. \* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; ns = no significativo.

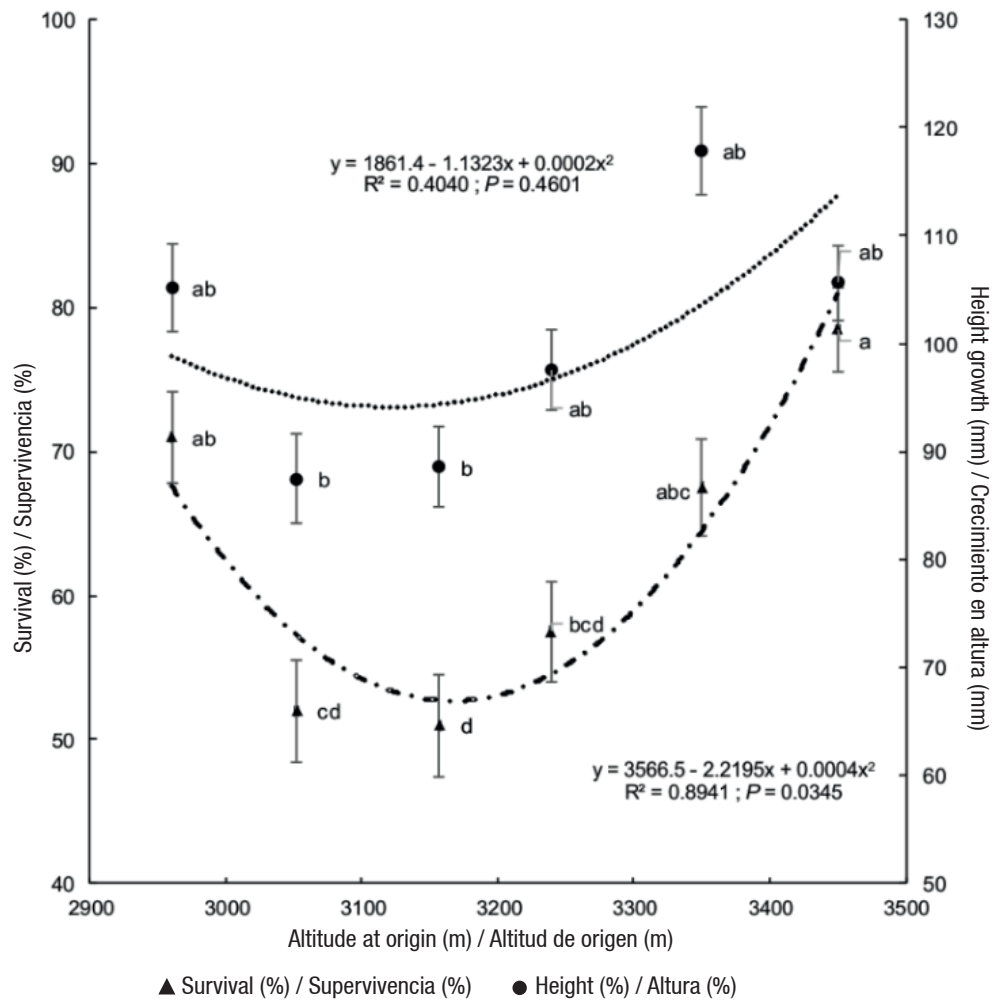


Figure 3. Quadratic regression of survival and final height of six *Abies religiosa* provenances against altitude of origin. Different letters indicate significant difference between provenances, according to Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ). Vertical bars indicate the standard error of the mean.

Figura 3. Regresión cuadrática de supervivencia y altura final de seis procedencias de *Abies religiosa* contra altitud de origen. Letras distintas indican diferencia significativa entre procedencias, de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Las barras verticales indican el error estándar de la media.

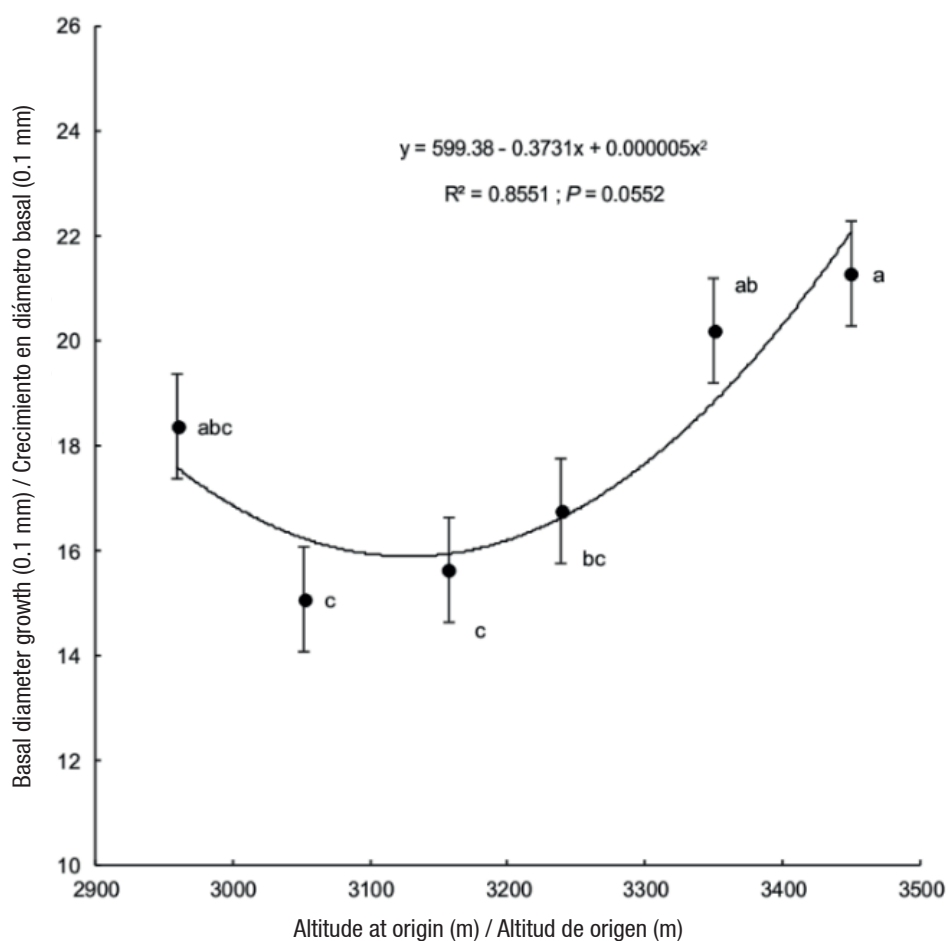
Table 3. Comparison of means of growth variables of six provenances of *Abies religiosa* at 18 months of establishment in a nursery. Cuadro 3. Comparación de medias de las variables de crecimiento de seis procedencias de *Abies religiosa* a 18 meses de establecimiento en vivero.

Provenance / Procedencia	Altitude (m) / Altitud (m)	Height (mm) / Altura (mm)	Basal diameter (mm) / Diámetro basal (mm)	Survival (%) / Supervivencia (%)
1	3450	105.6 ab	21.2 a	78.5 a
2	3350	117.8 a	20.1 ab	67.5 abc
3	3239	97.6 ab	16.7 bc	57.5 bcd
4	3157	88.5 b	15.6 c	51 d
5	3052	87.5 b	15.0 c	52 cd
6	2960	105.1 ab	18.3 abc	71 ab
LSD/DMS		25.6	3.9	16

Mean values with the same letters between provenances indicate non-significant difference (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). LSD = least significant difference.

Valores medios con letras iguales entre procedencias indican diferencias no significativas (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). DMS = diferencia mínima significativa.





**Figure 4.** Quadratic regression of final basal diameter of *Abies religiosa* by provenance against altitude at origin. Different letters indicate significant difference between provenances according to Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ). Vertical bars indicate the value of the standard error of the mean.

**Figura 4.** Regresión cuadrática de diámetro basal final de *Abies religiosa* por procedencia contra altitud de origen. Letras distintas indican diferencia significativa entre procedencias de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Las barras verticales indican el valor del error estándar de la media.

diameters than higher-altitude ones, growing under optimal or suboptimal conditions. On the other hand, the data generated in the present study coincide with the good performance of early age (13-month-old) *P. hartwegii* seedlings, originating from seed of the populations of the upper altitudinal extreme (4050 m) of Cofre de Perote and grown in a shadehouse in Xalapa, Veracruz (Viveros-Viveros, Marín-Hernández, Aparicio-Rentería, & Sáenz-Romero, 2018).

It is important to emphasize that the results of Ortiz-Bibian et al. (2017), in which less growth is reported in the higher-altitude provenances, represent the growth potential (the genetically conditioned capacity to grow under optimal conditions), while the conditions of the present work were much more difficult, since the nursery was a very basic facility and located at 3000 m. Therefore, it is possible that a high provenance\*environment interaction induces a

## Discusión

El patrón clinal altitudinal de la supervivencia, altura y diámetro basal, en lo que se refiere al buen desempeño de las procedencias de mayor altitud, es diferente al reportado para otras coníferas en México, como *Pinus pseudostrobus* Lindl. (Viveros-Viveros, Sáenz-Romero, López-Upton, & Vargas-Hernández, 2005) o *Pinus hartwegii* Lindl. (Loya-Rebollar et al., 2013). En dichas especies, las poblaciones de menor altitud tuvieron mayor diámetro basal que las poblaciones de mayor altitud, creciendo en condiciones óptimas o subóptimas. Por otra parte, los datos generados en el presente trabajo coinciden con el buen desempeño de plántulas de edad temprana (13 meses) de *P. hartwegii*, originadas de semilla de poblaciones del extremo altitudinal superior (4050 m) del Cofre de Perote y crecidas en una casa de sombra en Xalapa, Veracruz (Viveros-Viveros, Marín-Hernández, Aparicio-Rentería, & Sáenz-Romero, 2018).

different growth pattern. Additionally, it is necessary to evaluate the fact that the altitudinal pattern is not very pronounced (the difference between provenances of the altitudinal gradient is relatively minor), and that the last evaluation was made in May (in July they were planted in a field trial). There is a possibility that the pattern would have been different if the last evaluation had been made in November (2017), when the apical buds cease to grow and are at rest. Finally, the age of the plants can be considered too young to show a definite trend of their growth capacity in a nursery at 3 000 m. It is therefore recommended that these results be treated with caution.

It is also recommended to conduct further research on the use of naturally regenerated plants for growth in a nursery, for reforestation purposes, in order to avoid costs in the collection of seed directly from the standing tree.

### Conclusions

*A. religiosa* plants from the altitudinal extremes had the highest average survival, height, and basal diameter values. The average survival of 75 % indicates that transplanting naturally regenerated plants, for later growth in a nursery, is viable. Therefore, the reintroduction in the field of the rescued naturally regenerated seedlings can be a complementary alternative to the usual reforestation programs, in order to achieve the ecological restoration of the overwintering *A. religiosa* stands of the Monarch butterfly.

### Acknowledgments

Funding is gratefully acknowledged from the Monarch Butterfly Fund (Madison, Wisconsin), the Mexican Fund for Nature Conservation, the USDA-Forest Service (with resources from US-AID managed with assistance from the Forest Genetic Resources Working Group of the North American Forestry Commission), and the UMSNH Council for Scientific Research to CSR. We thank CONACYT for the scholarship awarded to Ana L. Cruzado-Vargas and Aglaen L. Carbajal-Navarro; Francisco Ramírez and Petra Cruz for allowing the establishment and maintenance of the nursery in their home; and students Gerardo Guzmán, Jorge Herrera, Nancy Izquierdo, Nancy Farías, Miriam Linares, Rubí Contreras, Francisco Loera Padilla and Erika Gómez for their help in field collection and nursery measurements. The comments of the editor and three anonymous reviewers helped to significantly improve the manuscript.

*End of English version*

Es importante subrayar que los resultados de Ortiz-Bibian et al. (2017), en los que se reporta menor crecimiento en las procedencias de mayor altitud, representan el potencial de crecimiento (la capacidad genéticamente condicionada de crecer en condiciones óptimas), mientras que las condiciones del presente trabajo fueron mucho más difíciles, ya que el vivero es rústico y se encuentra a 3 000 m de altitud. Por ello, es posible que una alta interacción procedencia\*ambiente induzca un patrón de crecimiento diferente. Adicionalmente, es necesario valorar el hecho de que el patrón altitudinal es poco pronunciado (la diferencia entre procedencias del gradiente altitudinal es relativamente menor), y que la última evaluación se hizo en el mes de mayo (en julio se plantaron en un ensayo de campo). Existe la posibilidad de que el patrón fuera distinto si se hubiera hecho la última evaluación en el mes de noviembre (2017), cuando las yemas apicales cesan su crecimiento y se encuentran en reposo. Finalmente, la edad de las plantas puede considerarse demasiado juvenil para mostrar una tendencia definitiva de su capacidad de crecimiento en un vivero a 3 000 m de altitud. Por lo anterior es recomendable que los presentes resultados se utilicen con cautela.

Se recomienda indagar más sobre el uso de la planta de regeneración natural y crecimiento en vivero, para establecer reforestaciones, con el fin de evitar costos en la recolección de semilla directamente del árbol en pie.

### Conclusiones

Las plantas de *A. religiosa* provenientes de los extremos altitudinales tuvieron los valores promedio más altos de supervivencia, altura y diámetro basal. La supervivencia promedio de 75 % indica que el trasplante de planta de regeneración natural, para su crecimiento posterior en vivero, es viable. Por ello, la reintroducción en campo de las plántulas rescatadas de regeneración natural puede ser una alternativa complementaria a los programas usuales de reforestación, para lograr la restauración ecológica de los rodales de *A. religiosa* de estancia invernal de la mariposa Monarca.

### Agradecimientos

Se agradece el financiamiento del Monarch Butterfly Fund (Madison, Wisconsin), del Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza, del USDA-Forest Service (con recursos de la US-AID gestionados con ayuda de la Comisión Forestal de América del Norte y Grupo de Trabajo sobre Recursos Genéticos Forestales) y de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH a CSR. Agradecemos al CONACYT por la beca otorgada a Ana L. Cruzado-Vargas y Aglaen L. Carbajal-Navarro; a Francisco Ramírez y Petra Cruz por permitir el establecimiento y mantenimiento del vivero en su

## References / Referencias

- Ángeles-Cervantes, E., & López-Mata, L. (2009). Supervivencia de una cohorte de plántulas de *Abies religiosa* bajo diferentes condiciones postincendio. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 84, 25–33. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0366-21282009000100003&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0366-21282009000100003&script=sci_arttext&tlng=en)
- Arriola, P. V. J., Flores, G. A., Gijón, H. A. R., Pineda, O. T., Jacob, C. V., & Nieto de Pascual, P. C. (2015). Producción de planta de *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. & Cham. en vivero. México: CENID-COMEF, INIFAP. Retrieved from [http://www.inifap.gob.mx/Documents/transparencia/Estudios\\_Opiniones/2017/Publicaciones\\_2015/PUBLICACION%2027.pdf](http://www.inifap.gob.mx/Documents/transparencia/Estudios_Opiniones/2017/Publicaciones_2015/PUBLICACION%2027.pdf)
- Brower, L. P., Taylor, O. R., Williams, E. H., Slayback, D. A., Zubieta, R. R., & Ramírez, M. I. (2012). Decline of monarch butterflies overwintering in Mexico: is the migratory phenomenon at risk? *Insect Conservation and Diversity*, 5(2), 95–100. doi: 10.1111/j.1752-4598.2011.00142.x
- Carrillo, S. A., Patiño, V. F., & Talavera, A. I. (1980). El contenido de humedad en semillas de siete especies de *Pinus* y una de *Abies* bajo almacenamiento y su relación con el porcentaje de germinación. *Revista Ciencia Forestal*, 5(24), 39–48.
- Castellanos-Acuña, D., Lindig-Cisneros, R. A., Silva-Farías, M. A., & Sáenz-Romero, C. (2014). Zonificación altitudinal provisional de *Abies religiosa* en un área cercana a la Reserva de la Biosfera de la Mariposa Monarca, Michoacán. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 20(2), 215–225. doi: 10.5154/r.rchscfa.2013.11.041
- Castellanos-Acuña, D., Vance-Borland, K. W., St. Clair, J. B., Hamann, A., López-Upton, J., Gómez-Pineda, E., ... Sáenz-Romero, C. (2018). Climate-based seed zones for Mexico: guiding reforestation under observed and projected climate change. *New Forests*, 49(3), 297–309. doi: 10.1007/s11056-017-9620-6
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). (2001). Programa de Manejo de la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca. Retrieved from [http://centro.paot.org.mx/documentos/ine/prog\\_manejo\\_mariposa\\_monarca.pdf](http://centro.paot.org.mx/documentos/ine/prog_manejo_mariposa_monarca.pdf)
- Chen, S. B., Ferry, S. J. W., Gao, J., Mao, L. F., Bi, M. J., Shen, M. W., & Zhou, K. X. (2015). Latitudinal diversity gradients in bryophytes and woody plants: Roles of temperature and water availability. *Journal of Systematics and Evolution*, 53(6), 535–545. doi: 10.1111/jse.12158
- Iglesias-Andreu, L. G., Sánchez-Velázquez, L. R., Tivo-Fernández, Y., Luna-Rodríguez, M., Flores-Estévez, N., Noa-Carrazana, J. C., ... Moreno-Martínez, J. L. (2010). Efecto de radiaciones gamma en *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. et Cham. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 16(1), 5–12. doi: 10.5154/r.rchscfa.2009.06.021
- Johnson, G. R., Sorensen, F. C., St. Clair, J. B., & Cronn, R. C. (2004). Pacific Northwest forest tree seed zones a template for native plants? *Native Plants Journal*, 5(2), 131–140. doi: 10.2979/NPJ.2004.5.2.131
- Loya-Rebollar, E., Sáenz-Romero, C., Lindig-Cisneros, R. A., Lobit, P., Villegas-Moreno, J. A., & Sánchez-Vargas, N. M. (2013). Clinal variation in *Pinus hartwegii* populations and its application for adaptation to climate change. *Silvae Genetica*, 62(1–6), 86–95. doi: 10.1515/sg-2013-0011
- casa; y a los estudiantes Gerardo Guzmán, Jorge Herrera, Nancy Izquierdo, Nancy Farías, Miriam Linares, Rubí Contreras, Francisco Loera Padilla y Erika Gómez por su ayuda en la recolecta en campo y mediciones de vivero. Los comentarios del editor y tres revisores anónimos ayudaron a mejorar significativamente el manuscrito.

## Fin de la versión en español

- Madrigal-Sánchez, X. (1967). *Contribución al conocimiento de la ecología de los bosques de oyamel (Abies religiosa (H. B. K.) Schl. et Cham.) en el Valle de México*. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300590737>
- Manzanilla, H. (1974). *Investigaciones epidémicas y silvícolas en bosques mexicanos de Abies religiosa*. México: Dirección General de Información y Relaciones Públicas, Secretaría de Agricultura y Ganadería. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2015016839>
- Marañón, T., Camarero, T. T., Castro, J., Díaz, M., Espelta, J. M., Hampe, A., ... Zamora, R. (2004). Heterogeneidad ambiental y nicho de regeneración. In F. Valladares (Ed.), *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante* (pp. 69–99). Madrid, España: EGRAF, S. A. Retrieved from <http://digital.csic.es/bitstream/10261/40606/3/Heterogeneidad%20ambiental.pdf>
- Nieto de Pascual-Pola, M. C., Musálem, M. Á., & Ortega-Alcalá, J. (2003). Estudio de algunas características de conos y semillas de *Abies religiosa* (HBK) Schl. et Cham. *Agrociencia*, 37(5), 521–531. Retrieved from <https://www.redalyc.org/html/302/30237509/>
- Ortiz-Bibian, M. A., Blanco-García, J. A., Lindig-Cisneros, R. A., Gómez-Romero, M., Castellanos-Acuña, D., Herrerías-Diego, Y., ... Sáenz-Romero, C. (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(1), 14–23. doi: 10.1515/sg-2017-0003
- Rodríguez-Laguna, R., Razo-Zárate, R., Fonseca-González, J., Capulín-Grande, J., & Goche-Telles, R. (2015). Regeneración natural post-incendio de *Abies religiosa* (H.B.K.) Schl. et Cham. en el Parque Nacional “El Chico” Hidalgo. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2(2), 11–22. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/282647827\\_Regeneracion\\_natural\\_post-incendio\\_de\\_Abies\\_religiosa\\_H\\_B\\_K\\_Schl\\_et\\_Cham\\_en\\_el\\_Parque\\_Nacional\\_El\\_Chico\\_Hidalgo](https://www.researchgate.net/publication/282647827_Regeneracion_natural_post-incendio_de_Abies_religiosa_H_B_K_Schl_et_Cham_en_el_Parque_Nacional_El_Chico_Hidalgo)
- Sáenz-Romero, C., Beaulieu, J., & Rehfeldt, G. E. (2011). Altitudinal genetic variation among *Pinus patula* populations from Oaxaca, México, in growth chambers simulating global warming temperatures. *Agrociencia*, 45(3), 399–411. Retrieved from <https://www.redalyc.org/html/302/30219764012/>
- Sáenz-Romero, C., Ruiz-Talonia, L. F., Beaulieu, J., Sánchez-Vargas, N. M., & Rehfeldt, G. E. (2011). Genetic variation among *Pinus patula* populations along an altitudinal gradient. Two environment nursery tests. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34(1), 19–25. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/610/61017038003.pdf>

- Sáenz-Romero, C., Rehfeldt, G. E., Soto-Correa, J. C., Aguilar-Aguilar, S., Zamarripa-Morales, V., & López-Upton, J. (2012). Altitudinal genetic variation among *Pinus pseudostrobus* populations from Michoacán, México. Two location shadehouse test results. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(2), 111–121. Retrieved from <https://www.redalyc.org/html/610/61023300003/>
- Salazar, R., & Soihet, C. (2001). *Manejo de semillas de 75 especies forestales de América Latina*. Turrialba, Costa Rica: CATIE. Retrieved from <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A4004e/A4004e.pdf>
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2018). Recolección de germoplasma forestal para reforestación y forestación con fines de conservación o restauración (trámite SEMARNAT-02-004). Retrieved from <http://dsiappsdev.semarnat.gob.mx/formatos/DGGFS/FF-SEMARNAT-054-SEMARNAT-02-004%20EDITABLE.pdf>
- SAS Institute, Inc. (2004). SAS/STAT computer software. Release 9.1 3rd ed. Cary, NC, USA: Author. Retrieved from [https://support.sas.com/documentation/onlinedoc/91pdf/sasdoc\\_91/stat\\_ug\\_7313.pdf](https://support.sas.com/documentation/onlinedoc/91pdf/sasdoc_91/stat_ug_7313.pdf)
- Stuiver, B. M., Wardle, D. A., Gundale, M. J., & Nilsson, M. C. (2014). The impact of moss species and biomass on the growth of *Pinus sylvestris* tree seedlings at different precipitation frequencies. *Forests*, 5(8), 1931–1951. doi: 10.3390/f5081931
- Viveros-Viveros, H., Sáenz-Romero, C., López-Upton, J., & Vargas-Hernández, J. J. (2005). Variación genética altitudinal en el crecimiento de plantas de *Pinus pseudostrobus* Lindl. en campo. *Agrociencia*, 39(5), 575–587. Retrieved from <https://www.redalyc.org/html/302/30239511/>
- Viveros-Viveros, H., Marín-Hernández, J., Aparicio-Rentería, A., & Sáenz-Romero, C. (2018). Variación en el crecimiento inicial de la altura de plántulas de *Pinus hartwegii* Lindl. del Cofre de Perote, Veracruz. *Acta Fitogenética*, 5(1), 273. Retrieved from [https://www.somefi.mx/wp-content/uploads/2018/10/ACTA-5-2018\\_Texcoco\\_Colpos.pdf](https://www.somefi.mx/wp-content/uploads/2018/10/ACTA-5-2018_Texcoco_Colpos.pdf)