

INDUCCIÓN DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS EN *Pseudotsuga menziesii*

INDUCTION OF REPRODUCTIVE STRUCTURES IN *Pseudotsuga menziesii*

Liliana Muñoz-Gutiérrez^{1,3}, J. Jesús Vargas-Hernández^{1*}, Javier López-Upton¹, Nicolás Gutiérrez-Rangel²

¹Forestal. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (vargashj@colpos.mx). ²Fruticultura. Campus Puebla, Colegio de Postgraduados. 72130. Carretera México-Puebla La Libertad Km 125.5 Puebla. ³INIFAP-CIRNE 78430, km 14.5. Carretera, San Luis-Matehuala, San Luis Potosí.

RESUMEN

Pseudotsuga menziesii es una conífera muy utilizada en plantaciones de árboles de navidad en México, por lo que es necesario un abasto eficiente de germoplasma de calidad. Con el propósito de reducir el tiempo requerido para la producción de semilla en esta especie, se evaluó el efecto del ácido giberélico ($GA_{4/7}$) y del anillado en el tronco en la formación de estructuras reproductivas en dos ensayos de campo con árboles juveniles. Se utilizaron cuatro dosis de $GA_{4/7}$ (0, 1.27, 2.55 y 5.10 mg cm⁻²) aplicadas por inyección en el tronco y un año después se evaluó el porcentaje de árboles con respuesta y el número y posición de las estructuras reproductivas. Los tratamientos fueron más efectivos en formar estróbilos femeninos, con una respuesta que varió de 37.5 % en el sitio 1 a 62.5 % en el sitio 2; menos del 20 % de los árboles formaron estróbilos masculinos en los dos sitios. El desarrollo fenológico del árbol al momento de aplicar los tratamientos influyó ($p \leq 0.01$) sobre el número de estróbilos femeninos y masculinos formados. Además, el efecto del $GA_{4/7}$ sobre el número de estróbilos varió entre ensayos; en el sitio 1 la dosis baja (1.27 mg cm⁻²) fue la más efectiva en inducir estróbilos femeninos, mientras que en el sitio 2 fue la dosis alta (5.10 mg cm⁻²). El anillado aumentó ($p \leq 0.01$) el número de estróbilos cuando se combinó con dosis bajas de $GA_{4/7}$, pero no tuvo efecto positivo cuando se utilizaron dosis altas. El análisis de los resultados indica que la aplicación de $GA_{4/7}$ en combinación con el anillado del tronco es efectiva en la inducción de floración en individuos sexualmente inmaduros de *P. menziesii*, lo que permite acelerar la producción de semilla en esta especie.

Palabras clave: ácido giberélico ($GA_{4/7}$), anillado, estado fenológico, floración, producción de semilla.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Febrero, 2010. Aprobado: Agosto, 2010.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 44: 835-847. 2010.

ABSTRACT

Pseudotsuga menziesii is a conifer widely used in Christmas tree plantations in México, which increases the need for an efficient supply of quality germoplasm. In order to reduce the time required for seed production in this species, the effect of gibberellic acid ($GA_{4/7}$) and trunk girdling on the formation of reproductive structures was evaluated in two field trials with juvenile trees. Four dosages of $GA_{4/7}$ (0, 1.27, 2.55 and 5.10 mg cm⁻²) injected into the tree trunk were used, and one year later, the percentage of trees with a response and the number and position of reproductive structures were evaluated. The treatments were more effective on formation of female cones, with a response that varied from 37.5 % in site 1, to 62.5 % in site 2, whereas less than 20 % of the trees formed male cones in both sites. The phenological stage of the tree at the time of applying the treatments influenced ($p \leq 0.01$) the number of male and female cones formed. Also, the effect of $GA_{4/7}$ on the number of cones varied with each trial; in site 1 the lowest dose (1.27 mg cm⁻²) was the most effective for the induction of female cones, whereas in site 2, the high dose (5.10 mg cm⁻²) was the most effective. Trunk girdling increased ($p \leq 0.01$) the number of cones when combined with low doses of $GA_{4/7}$, but had no positive effect when high doses were used. The analysis of the results indicates that the application of $GA_{4/7}$ combined with trunk girdling is effective in inducing flowering in sexually immature *P. menziesii* trees, which helps accelerate the production of seed in this species.

Key words: gibberellic acid ($GA_{4/7}$), girdling, phenological stage, flowering, seed production.

INTRODUCTION

Pseudotsuga menziesii is a valuable conifer species in Mexico, due to its use in the production of Christmas trees, even though it is commonly imported from the United States and Canada

INTRODUCCIÓN

P*seudotsuga menziesii* es una conífera valiosa en México para la producción de árboles de Navidad, aunque suele importarse de EE.UU. y Canadá (Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996). Aunque escasa, se localiza de manera natural en México, en las Sierras Madre Occidental, Oriental y del Sur (Martínez, 1963; Debreczy y Racz, 1995), por lo que existe el potencial de establecer plantaciones comerciales. Para ello se requiere un abasto continuo de semillas de buena calidad; sin embargo, la producción de semillas en rodales naturales de esta especie es influenciada por las fluctuaciones climáticas bruscas, las deficiencias de nutrimentos, la polinización, la depredación de conos y semillas y los efectos de endogamia (Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996; Mápula-Larreta *et al.*, 2007).

Para producir semillas abundantes, de buena calidad y en el menor tiempo posible, en especies de coníferas se han usado con éxito diversas prácticas silvícolas que inducen la diferenciación de estructuras reproductivas (Pharis *et al.*, 1987). Estas prácticas incluyen el anillado del tronco y la aplicación de reguladores del crecimiento (Ross y Bower, 1989, 1991; Philippe *et al.*, 2004; Cherry *et al.*, 2007). El anillado consiste en un bloqueo parcial del floema para modificar el transporte de carbohidratos y de otras sustancias dentro del árbol. Ross y Bower (1989) señalan que el anillado aumenta la proporción de injertos con estróbilos femeninos (69 *vs.* 20 %) y masculinos (83 *vs.* 43 %) en *P. menziesii*, pero en otro estudio con la misma especie el anillado fue efectivo únicamente cuando se combinó con la aplicación de giberelinas (Ross y Pharis, 1976).

El ácido giberélico (AG) es el regulador de crecimiento más utilizado para inducir diferenciación floral en árboles (Kong y Aderkas, 2004), en especial la combinación AG_{4/7} en los géneros *Pinus*, *Picea*, *Abies* y *Pseudotsuga* (Pharis *et al.*, 1980; Owens *et al.*, 2001). Sin embargo, diferentes factores pueden influir en el éxito del AG_{4/7} como la edad de los árboles (Cherry *et al.*, 2007), la época, la dosis y el método de aplicación (Aderkas *et al.*, 2004), además de la combinación con anillado, poda, manejo del riego y fertilización (Ross, 1991, 1992; Philipson, 1992, 1996).

Se han desarrollado técnicas de inducción reproductiva en individuos jóvenes de origen asexual

(Zavala-Chávez and Méndez-Montiel, 1996). Although scarce, it is found naturally in Mexico in the Sierras Madre Occidental, Oriental and del Sur (Martínez, 1963; Debreczy and Racz, 1995), which gives it the potential for commercial plantations. This requires a continuous supply of quality seeds; however, seed production in natural stands of this species is influenced by harsh fluctuations in weather conditions, nutritional deficiencies, pollination, predation of cones and seeds, and the effects of inbreeding (Zavala-Chávez and Méndez-Montiel, 1996; Mápula-Larreta *et al.*, 2007).

In order to produce abundant quality seeds in the least time possible in conifer species, diverse forestry practices have been successfully used to induce the differentiation of reproductive structures (Pharis *et al.*, 1987). These practices include trunk girdling and the application of growth regulators (Ross and Bower, 1989, 1991; Philippe *et al.*, 2004; Cherry *et al.*, 2007). Trunk girdling consists of a partial blocking of the phloem to modify transportation of carbohydrates and other substances in the tree. Ross and Bower (1989) point out that girdling increases the proportion of grafts with female (69 *vs.* 20 %) and male cones (83 *vs.* 43 %) in *P. menziesii*, yet in another study with the same species, girdling was only effective when combined with the application of gibberellins (Ross and Pharis, 1976).

Gibberellic acid (GA) is the most commonly used growth regulator to induce floral differentiation in trees (Kong and Aderkas, 2004), especially the combination GA_{4/7} in the genera *Pinus*, *Picea*, *Abies* and *Pseudotsuga* (Pharis *et al.*, 1980; Owens *et al.*, 2001). However, different factors can influence on the performance of GA_{4/7}, such as tree age (Cherry *et al.*, 2007), timing, dosage and application method (Aderkas *et al.*, 2004), as well as the combination with girdling, pruning, irrigation and fertilization (Ross, 1991, 1992; Philipson, 1992, 1996).

Reproductive induction techniques have been developed in young individuals with an asexual origin (rooted cuttings or grafts) of *P. menziesii* (Ross and Pharis, 1976; Ross *et al.*, 1980; Ross, 1983), and in older grafted clones (Ross and Bower, 1989; Cherry *et al.*, 2007), with different degree of success. However, there is no information on the effect of these treatments on juvenile sexual individuals and on Mexican materials. This study evaluated the effects of doses of GA_{4/7}, combined with trunk girdling,

(estacas o injertos) de *P. menziesii* (Ross y Pharis, 1976; Ross *et al.*, 1980; Ross, 1983), y en clones injertados de mayor edad (Ross y Bower, 1989; Cherry *et al.*, 2007), con diferente grado de éxito. Sin embargo, no existe información del efecto de estos tratamientos en individuos juveniles de origen sexual y en materiales de México. En este estudio se evaluó el efecto de la dosis de $GA_{4/7}$ en combinación con el anillado del tronco sobre la diferenciación de estructuras reproductivas en árboles jóvenes de *P. menziesii* de origen sexual; también se analizó la efectividad de los tratamientos en ensayos separados y la influencia del estado fenológico del árbol sobre la respuesta, con la finalidad de establecer una técnica eficiente para acelerar la producción de semilla en esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización de los ensayos de campo

Se realizaron dos ensayos en el Conjunto Predial Forestal, en el municipio de Aquixtla, estado de Puebla (19° 43' 13" N y 97° 59' 20" O) con árboles jóvenes de *P. menziesii* establecidos en el bosque. El ensayo 1 se efectuó en el paraje El Manantial a 2900 m, en una plantación de árboles de navidad de 10 años de edad (plantados en este paraje en el 2000, a la edad de 2 años; la semilla para producir estos árboles se recolectó en Mineral del Chico, estado de Hidalgo), con luz solar plena y podas recurrentes de la copa. El ensayo 2 se estableció en el paraje Área semillera a 2800 m, en una plantación con árboles de 11-13 años de edad (plantados en 1996 y 1997 a la edad de un año, originados con semilla recolectada en Terrenates, estado de Tlaxcala, y Huayacocotla, estado de Veracruz), bajo el dosel de árboles adultos de *Pinus patula*, sin poda de ramas durante cuatro años previos al estudio (2004-2007). En cada paraje se instaló una micro-estación meteorológica automatizada para registrar la temperatura y precipitación. En cada sitio se seleccionaron 32 árboles lo más homogéneo posible en altura (ensayo 1: 1.77 ± 0.10 m; ensayo 2: 2.80 ± 0.18 m), diámetro (ensayo 1: 5.4 ± 0.3 cm; ensayo 2: 6.1 ± 0.5 cm) y condiciones de la copa. En cada árbol se midió el diámetro del tronco a 50 cm del suelo, para calcular el área transversal del mismo.

Definición y aplicación de los tratamientos

En cada sitio se evaluó el anillado y la dosis de $GA_{4/7}$ en un arreglo factorial y diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones, con dos niveles de anillado (con y sin anillado) y cuatro dosis de $GA_{4/7}$: 0, 1.27, 2.55 y 5.10 mg cm⁻² de área transversal del tronco, equivalente a 0, 100, 200 y 400 mg

on the differentiation of reproductive structures of juvenile *P. menziesii* trees of sexual origin. Likewise, we evaluated the effectiveness of the treatments with separate field trials, and the influence of the phenological state of the tree on the response, with the purpose of establishing an efficient technique to speed up the seed production in this species.

MATERIALS AND METHODS

Location of field trials

Two trials were carried out in the Conjunto Predial Forestal, in the municipality of Aquixtla, in the state of Puebla (19° 43' 13" N and 97° 59' 20" O) with juvenile *P. menziesii* trees planted in the forest. Trial 1 was performed in the site "El Manantial", at 2900 m, in a plantation of 10-year old Christmas trees (planted in this site in the year 2000 with two-year old seedlings; the seeds for these trees were collected in Mineral del Chico, state of Hidalgo), with full sunlight and recurrent prunings of the tree crowns. Trial 2 was carried out in the site "Área semillera", at 2800 m in a plantation with 11 to 13-year old trees (planted in 1996 and 1997 with one-year old seedlings, originated with seeds collected in Terrenates, state of Tlaxcala, and Huayacocotla, state of Veracruz), under the canopy of adult *Pinus patula* trees, with branches unpruned for 4 years before the study (2004-2007). At each site an automated weather microstation was installed to measure temperature and rainfall. In each site, 32 trees were chosen, as homogenous as possible in height (test 1: 1.77 ± 0.10 m; test 2: 2.80 ± 0.18 m), diameter (test 1: 5.4 ± 0.3 cm; test 2: 6.1 ± 0.5 cm), and crown conditions. The diameter of the trunk was measured in each tree, 50 cm above ground level, to calculate its cross-sectional area.

Definition and application of treatments

The girdling and the doses of $GA_{4/7}$ were evaluated in a factorial arrangement and a random experimental design with four replications, with two girdling levels (with and without girdling) and four doses of $GA_{4/7}$: 0, 1.27, 2.55 and 5.10 mg cm⁻² of cross-sectional area of the trunk, equivalent to 0, 100, 200 and 400 mg of $GA_{4/7}$ on a tree having 10 cm in trunk diameter. Treatments were applied at the start of growth in the terminal shoot, and the phenological state of the crown (percentage of vegetative buds burst on the tree crown). Girdling consisted in making two cross-section cuts to the trunk, in the shape of a half moon, each of which occupied approximately 60 % of the trunk's circumference; the first cut was made 50 cm from ground level, and the second at a distance from the first equal to 1.5 times the diameter of the trunk.

de $AG_{4/7}$ en un árbol de 10 cm de diámetro del tronco. Los tratamientos se aplicaron al inicio del crecimiento del brote terminal y se determinó en cada árbol el estado fenológico de la copa (porcentaje de brotación de las yemas vegetativas en la copa del árbol). El anillado consistió en realizar con un serrate dos cortes transversales al tronco, en forma de media luna, que abarcaron cada uno de ellos aproximadamente el 60 % de la circunferencia del tronco; el primer corte se hizo a 50 cm del suelo y el segundo a una distancia del primero igual a 1.5 veces el diámetro del tronco.

El $AG_{4/7}$ se aplicó en una solución de alcohol etílico al 95 %, con una concentración base de 30 mg mL⁻¹, en un solo evento en los dos sitios. En el tronco se hicieron orificios inclinados de 2-3 cm de profundidad, a 10 cm por arriba del anillado superior y a una altura similar en los árboles no anillados. La cantidad requerida (mL) de solución, en función de la dosis y el área transversal del tronco, se aplicó con micro-pipeta; en el testigo se aplicó un volumen equivalente de alcohol etílico al 95 %; los orificios se taparon con cera para evitar pérdida de la solución.

Variables evaluadas y análisis de los datos

Al año siguiente de aplicar los tratamientos se determinó en cada ensayo el porcentaje de árboles con estróbilos femeninos y masculinos, así como su número y posición a lo largo de la copa de cada árbol, dividiéndola en cuatro secciones, desde el ápice del árbol (primer cuartil o cuartil superior) y hasta la base (cuarto cuartil o cuartil inferior). Con estos datos se calculó el número de estróbilos por árbol, el número de ramas con estróbilos y la distribución relativa de estróbilos por cuartil en la copa.

Dado que las variables en estudio no se ajustan a una distribución normal (Kuehl, 2001), se utilizaron Modelos Lineales Generalizados (MLG) que permiten trabajar con variables que se ajustan a una distribución de la familia exponencial (Poisson, Binomial, etcétera). El número de estróbilos por árbol y el número de ramas con estróbilos son variables discretas que no poseen valores negativos y tienen una distribución tipo Poisson. Para introducir las en el MLG se realizó la transformación logarítmica de la respuesta [$\log_e(x+0.1)$] que permite contraer la distribución, normalizarla y homogeneizar las varianzas (Zar, 1996). Después del análisis, las variables fueron retransformadas a su escala original. El procedimiento GENMOD (SAS, 1999) toma directamente la variable con distribución Poisson suponiendo, entre otras cosas, que se incrementa la varianza al aumentar la media; para este modelo se utilizó la función de enlace log (SAS, 1999). Con los datos se hizo un análisis de varianza conjunto para los dos sitios, de acuerdo con el diseño experimental; aunque esto conduce a un efecto de pseudorepetición en la comparación del efecto de los sitios, ya que las repeticiones de los sitios están anidadas dentro de éstos, el modelo estadístico considera dicho anidamiento. Dado que se encontró una correlación significativa

$GA_{4/7}$ was applied in a solution of ethyl alcohol at 95 %, with a base concentration of 30mg mL⁻¹, in one event at both sites. Slanted holes, 2-3 cm deep, were made in the trunk, 10 cm above the higher girdling, and at a similar height in non-girdled trees. The required amount (mL) of $GA_{4/7}$ solution, depending on the dose and the cross-sectional area of the trunk, was applied using a micro-pipette; an equivalent volume of ethyl alcohol at 95 % was applied on the control trees; the holes were plugged with wax to avoid solution leak.

Variables evaluated and data analysis

The year after applying the treatments, the percentage of trees with female and male cones was determined in each trial, as well as the number and position of each in the crown of each tree, dividing it into four sections, from the apex of the tree (first or highest quartile) and down to the base (fourth or lower quartile). Using this data, the number of cones per tree, the number of branches with cones and the relative distribution of cones per quartile in the crown were calculated.

Given that the variables under study do not adjust to a normal distribution (Kuehl, 2001), Generalized Linear Models (MLG) were used, which help analyze variables following an exponential family distribution (Poisson, Binomial, etc). The number of cones per tree and the number of branches with cones are discrete variables that have no negative values and have a Poisson distribution. To introduce them in the MLG, the response was transformed logarithmically [$\log_e(x+0.1)$], to help narrow down the distribution, normalize it and homogenize the variances (Zar, 1996). After the analysis, the variables were retransformed to its original scale. The GENMOD procedure (SAS, 1999) directly takes the variation with a Poisson distribution assuming, among other things, that the variance rises when the mean increases; for this model, the log link function (SAS, 1999) was used. The data were used for a joint variance analysis for both trials, according to the experimental design; although this leads to a pseudorepetition effect in the comparison of site effects, since the replications of the sites are nested in them, the statistical model considers this nesting. Given that a significant correlation ($p \leq 0.05$) was found between the phenological state of the tree crown and the differentiation of reproductive structures, in order to remove the effect of that factor, the phenological state of the trees was included as a covariable in the model. In the variables in which significant effects related to a factor were found, means were compared using Tukey's test ($p \leq 0.05$).

To compare the percentage of trees with a response and the relative distribution of the cones in the quartiles of the tree crowns among the levels for each factor separately, the chi-square test (χ^2) was used, using contingency tables (Infante y Zárate, 2000).

($p \leq 0.05$) entre el estado fenológico de la copa y la diferenciación de estructuras reproductivas, para remover el efecto de este factor se incluyó el estado fenológico de los árboles como covariable en el modelo. En las variables donde se encontró un efecto significativo asociado a un factor, se realizó una comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Para comparar el porcentaje de árboles con respuesta y la distribución relativa de los estróbilos en los cuartiles de la copa entre los niveles de cada factor por separado, se utilizó la prueba de ji-cuadrada (χ^2), mediante tablas de contingencia (Infante y Zárate, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Proporción de árboles con estructuras reproductivas

En los dos ensayos de campo se observó la formación de estructuras reproductivas, pero mientras en el sitio 1 el 37.5 % de los árboles formaron estróbilos femeninos, en el sitio 2 la proporción fue 62.5 % (Cuadro 1). La frecuencia de árboles con estróbilos masculinos fue notoriamente menor en ambos sitios, variando de 6 % en el sitio 2 a 12.5 % en el sitio 1. El anillado al tronco no afectó significativamente ($p > 0.05$) la proporción de árboles que formaron estructuras reproductivas en ninguno de los dos sitios. En cambio, la dosis de $AG_{4/7}$ sí tuvo un efecto importante y significativo ($p \leq 0.05$); en el sitio 1 la frecuencia de árboles con estróbilos femeninos varió

RESULTS AND DISCUSSION

Proportion of trees with reproductive structures

In both field trials, reproductive structures were formed, but while in site 1, 37.5 % of all trees formed female cones, in site 2, this proportion was 62.5 % (Table 1). The frequency of trees with male cones was notoriously less in both sites, ranging from 6 % in site 2, to 12.5 % in site 1. The trunk girdling did not affect significantly ($p > 0.05$) the proportion of trees that formed reproductive structures in either one of the two trials, although the $GA_{4/7}$ dose did have an important and significant ($p \leq 0.05$) effect. In site 1, the frequency of trees with female cones varied from 0 % in the control, to 75 % after applying 1.27 mg cm^{-2} of $GA_{4/7}$ and for male cones, from 0 to 38 % in the same treatments (Table 1).

Number of reproductive structures per tree

The number of cones per tree was affected significantly ($p \leq 0.05$) by two of the factors evaluated (Table 2), although the effects were more notorious for female cones. For example, the phenological state of the tree influenced the number of female cones per tree and the number of branches with cones ($p \leq 0.001$), but not the number of male cones (Table 2). The site and girdling factors on their own had no significant effects ($p > 0.05$), but each one of them, in

Cuadro 1. Proporción (%) de árboles de *Pseudotsuga menziesii* que desarrollaron estróbilos femeninos (♀) y masculinos (♂) en los dos ensayos de estimulación reproductiva.

Table 1. Proportion (%) of *Pseudotsuga menziesii* trees with female (♀) and male (♂) cones in two reproductive stimulation trials.

Ensayo	Estróbilos	Proporción de árboles con estróbilos (%)					
		Anillado [†]		Dosis de $AG_{4/7}$ (mg cm^{-2}) [‡]			
		Si	No	0	1.27	2.55	5.10
Sitio 1	♀	31	44	0	75	38	38
	♂	6	19	0	38	0	13
Sitio 2	♀	69	56	13	75	75	88
	♂	6	6	0	0	0	25

[†] El valor de χ^2 del efecto del anillado en los estróbilos ♀ y ♂ en el sitio 1 fue 0.53 y 1.14 ($p > 0.05$), y en el sitio 2 fue 0.53 y 0.00 ($p > 0.05$)
[‡] The χ^2 value of the girdling effect on ♀ and ♂ cones was 0.53 and 1.14 ($p > 0.05$) in site 1, and 0.53 and 0.00 ($p > 0.05$) in site 2.

[‡] El valor de χ^2 del efecto de la dosis de $AG_{4/7}$ en los estróbilos ♀ y ♂ en el sitio 1 fue 9.60 ($p = 0.02$) y 6.85 ($p = 0.07$), y en el sitio 2 fue 11.73 ($p \leq 0.01$) y 6.40 ($p = 0.09$)
[‡] The χ^2 value of the effect of $AG_{4/7}$ effect on ♀ and ♂ cones was 9.60 ($p = 0.02$) and 6.85 ($p = 0.07$) in site 1, and 11.73 ($p \leq 0.01$) and 6.40 ($p = 0.09$) in site 2.

de 0 % en el testigo hasta 75 % al aplicar 1.27 mg cm⁻² de AG_{4/7} y la de estróbilos masculinos de 0 a 38 % en los mismos tratamientos (Cuadro 1).

Número de estructuras reproductivas por árbol

El número de estróbilos por árbol fue afectado significativamente ($p \leq 0.05$) por dos de los factores evaluados (Cuadro 2), aunque los efectos fueron más notorios en los femeninos. Por ejemplo, el estado fenológico del árbol influyó en el número de estróbilos femeninos por árbol y el número de ramas con estróbilos ($p \leq 0.001$), pero no sobre los estróbilos masculinos (Cuadro 2). Los factores sitio y anillado por sí solos no tuvieron efectos significativos ($p > 0.05$), pero cada uno de ellos en interacción con la dosis de AG_{4/7} sí tuvo un efecto importante sobre la inducción del desarrollo de estructuras reproductivas. Además, la dosis de AG_{4/7} influyó ($p \leq 0.001$) en el número de estróbilos femeninos por árbol y el número de ramas con estróbilos femeninos, pero no sobre el número de estróbilos masculinos (Cuadro 2).

El número de estróbilos tendió a aumentar en los árboles que se encontraban más avanzados en el desarrollo de los brotes (Figura 1a); el efecto más notorio fue en árboles del sitio 2, donde el mayor número de estróbilos femeninos se presentó en árboles con más del 90 % de brotación de las yemas vegetativas al momento de aplicar los tratamientos. La inducción de estróbilos masculinos en el sitio 1 ocurrió en árboles que tenían entre 30 y 70 % de brotación de yemas (Figura 1b), mientras que en el sitio 2 no se observó efecto del estado fenológico sobre esta variable.

interaction with GA_{4/7} dose did have an important effect on the induction of reproductive structures. Also, the GA_{4/7} dose did have an influence ($p \leq 0.001$) on the number of female cones per tree and the number of branches with female cones, but not on the number of male cones (Table 2).

The number of cones tended to increase in trees with a more advanced shoot growth phenology (Figure 1a); the most notorious effect was in trees on site 2, where the highest number of female cones was observed in trees with over 90% of buds burst at the time of girdling and GA application. The induction of male cones in site 1 occurred in trees with 30 to 70 % of buds burst (Figure 1b), whereas in site 2 there was no effect of the phenological state on this variable.

The number of male cones formed in each tree was relatively low (roughly 0.5), with no significant differences between GA_{4/7} doses. However, the number of female cones per tree and the number of branches with cones increased with the GA_{4/7} dose (Table 3). Although there were no statistical differences between the low and high doses of GA_{4/7} (1.27 vs. 5.10 mg cm⁻²), with the latter, the triple of female cones (4.23 vs. 14.54) were formed. Also, the effect of the GA_{4/7} dose on the number of reproductive structures was different between trials (Table 3). In site 1, the low dose of GA_{4/7} (1.27 mg cm⁻²) was the most effective in promoting the formation of female and male cones (9.20 and 1.57), while in site 2, a high dose (5.10 mg cm⁻²) was required to obtain the highest number of cones (25.25 and 1.61).

The trunk girdling with low doses of GA_{4/7} increased the formation of female cones per tree, but

Cuadro 2. Significancia estadística (p) para el número de estróbilos femeninos y masculinos por árbol en los ensayos de estimulación reproductiva en *Pseudotsuga menziesii*.

Table 2. Statistical significance (p) for the number of female and male cones per tree in the reproductive stimulation trials of *Pseudotsuga menziesii*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Estróbilos femeninos (♀)		Estróbilos masculinos (♂)	
		♀/árbol	ramas (No.)	♂/árbol	ramas (No.)
Fenología	1	<0.001	<0.001	0.253	0.946
Sitio (S)	1	0.189	0.750	0.662	0.582
Anillado (A)	1	0.093	0.198	0.848	0.789
S × A	1	0.259	0.485	0.408	0.634
Dosis (D)	3	<0.001	<0.001	0.066	0.361
A × D	3	<0.001	0.592	0.673	0.882
S × D	3	<0.001	<0.002	0.008	0.386
S × A × D	3	0.124	0.613	0.045	0.663

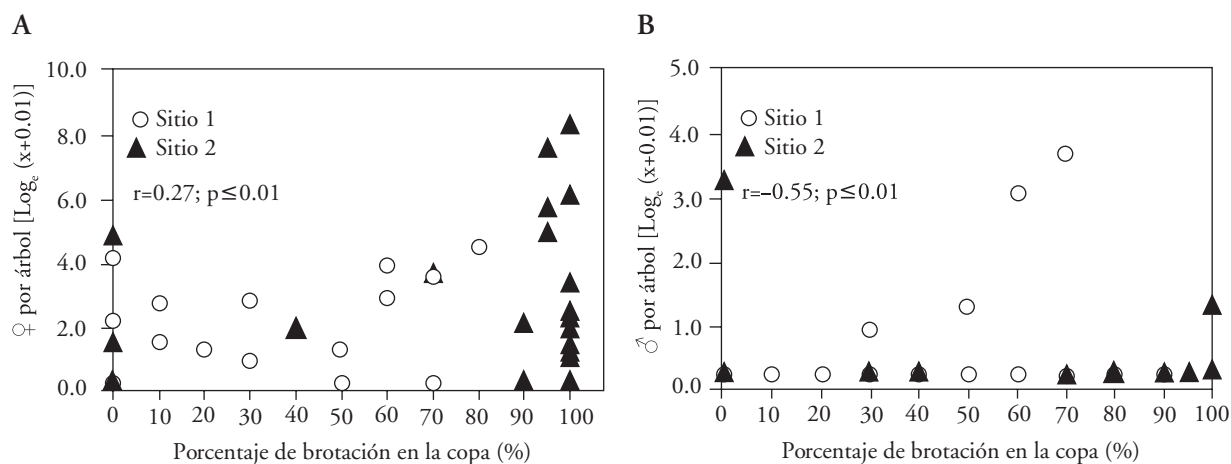


Figura 1. Relación entre el estado fenológico del árbol (porcentaje de brotación de las yemas vegetativas en la copa) y la formación de estróbilos (A) femeninos (♀) y (B) masculinos (♂) en dos ensayos de estimulación reproductiva en árboles juveniles de *Pseudotsuga menziesii* [$\log_e(x+0.1)$ = transformación logarítmica del número de estróbilos en el árbol; $n_A=64$; $n_B=64$].

Figure 1. Relationship between the phenological state of the tree (percentage of vegetative buds burst on the tree crown) and the formation of (A) female (♀) and (B) male (♂) cones in two reproductive stimulation trials in juvenile *Pseudotsuga menziesii* trees [$\log_e(x+0.1)$ = logarithmic transformation of the number of cones in trees; $n_A=64$; $n_B=64$].

El número de estróbilos masculinos formados por árbol fue relativamente bajo (alrededor de 0.5) y sin diferencias significativas entre dosis de $AG_{4/7}$; sin embargo, el número de estróbilos femeninos por árbol y el número de ramas con estróbilos aumentó con la dosis de $AG_{4/7}$ (Cuadro 3). Aunque no hubo diferencias estadísticas entre la dosis baja y alta de $AG_{4/7}$ (1.27 vs. 5.10 mg cm⁻²), con la última se formó el triple de estróbilos femeninos (4.23 vs. 14.54). Además, el efecto de la dosis de $AG_{4/7}$ sobre el número de estructuras reproductivas fue diferente de un ensayo a otro (Cuadro 3). En el sitio 1, la dosis baja de $AG_{4/7}$ (1.27 mg cm⁻²) fue la más efectiva para promover la formación de estróbilos femeninos y masculinos

had a negative effect when combined with high doses, as compared with trees without girdling (Figure 2). Thus, in trees with girdling and 1.27-2.55 mg cm⁻² of $GA_{4/7}$, the number of cones increased from 2.1 to 8.4, whereas girdling reduced the number of cones from 16.9 to 12.5 with the dose of 5.10 mg cm⁻².

Position of the reproductive structures in the tree crown

In both trials, most female cones were found in the first two quartiles (higher section of the tree crown), and none in the fourth quartile (lower section of the tree crown, Table 4). In both cases, the girdling

Cuadro 3. Efecto de la interacción sitio X dosis de $AG_{4/7}$ sobre el número de estróbilos femeninos y masculinos en los dos ensayos de estimulación floral en *Pseudotsuga menziesii*.

Table 3. Effect of the interaction of site X $GA_{4/7}$ dose on the number of female and male cones in both reproductive stimulation tests on *Pseudotsuga menziesii*.

Dosis $AG_{4/7}$ (mg cm ⁻²)	Estróbilos femeninos (♀/árbol)			Estróbilos masculinos (♂/árbol)		
	Sitio 1	Sitio 2	Promedio	Sitio 1	Sitio 2	Promedio
0	0.01 c [†]	0.08 c	0.04 b	0.00 b	0.01 a	0.00 a
1.27	9.20 a	1.92 b	4.23 a	1.57 a	0.01 a	0.33 a
2.55	2.33 b	18.12 ab	6.56 a	0.00 b	0.01 a	0.00 a
5.10	8.36 ab	25.25 a	14.54 a	0.53 b	1.61 a	0.94 a

[†] Valores con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$) ♦ Values with different letter in a column are statistically different (Tukey; $p \leq 0.05$).

(9.20 y 1.57), mientras que en el sitio 2 se requirió una dosis alta (5.10 mg cm^{-2}) para obtener el mayor número de estróbilos (25.25 y 1.61).

El anillado del tronco con dosis bajas de $AG_{4/7}$ aumentó la formación de estróbilos femeninos por árbol, pero combinado con dosis altas tuvo un efecto negativo, en comparación con árboles sin anillar (Figura 2). Así, árboles anillados y con $1.27\text{-}2.55 \text{ mg cm}^{-2}$ de $AG_{4/7}$ aumentaron de 2.1 a 8.4 el número de estróbilos, mientras que el anillado redujo el número de estróbilos de 16.9 a 12.5 con la dosis de 5.10 mg cm^{-2} .

Posición de las estructuras reproductivas en la copa del árbol

En ambos ensayos, la mayoría de los estróbilos femeninos se encontró en los dos primeros cuartiles (parte superior de la copa del árbol), y ninguno en el cuarto cuartil (parte inferior de la copa, Cuadro 4). En ambos casos el anillado modificó la distribución de los estróbilos, aumentando su proporción hacia las ramas intermedias de la copa, en el segundo (sitio 1) y tercer (sitio 2) cuartil, con respecto a los árboles no anillados (Cuadro 4). La dosis de $AG_{4/7}$ también afectó la distribución de los estróbilos femeninos en la copa del árbol, pero el efecto fue distinto entre sitios; en el sitio 1, la dosis elevada propició una mayor formación de estróbilos en el primer cuartil de la copa, mientras que en el sitio 2 el efecto fue en el segundo (Cuadro 4).

Efectividad de la inducción de estructuras reproductivas

Se logró inducir la formación de estróbilos masculinos y femeninos en árboles jóvenes de origen sexual de *P. menziesii* de manera consistente en dos ensayos realizados bajo diferentes condiciones ambientales y silvícolas. En la mayoría de los estudios publicados acerca de esta especie se han usado material de origen asexual, generalmente injertos obtenidos de individuos sexualmente maduros (Philippe *et al.*, 2004) y con un historial de producción conocido. Aunque la proporción de árboles que formó estróbilos femeninos y masculinos fue baja (Cuadro 1), el estudio muestra que con la aplicación oportuna de una dosis apropiada de $AG_{4/7}$, con o sin anillado del tronco, es posible acelerar la producción de semilla en individuos sexualmente inmaduros de *P. menziesii*.

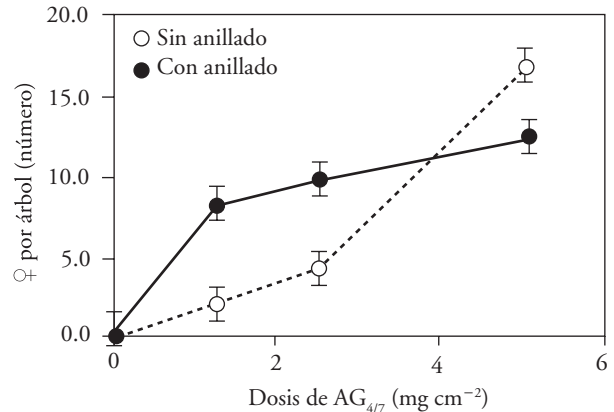


Figura 2. Efecto de la interacción anillado X dosis de $AG_{4/7}$ sobre el número de estróbilos femeninos (♀) por árbol en individuos juveniles de *Pseudotsuga menziesii*.

Figure 2. Effect of the interaction of trunk girdling X $GA_{4/7}$ dose on the number of female cones (♀) per tree in juvenile *Pseudotsuga menziesii* trees.

modified the distribution of the cones, increasing the proportion towards the intermediate branches, in the second (site 1) and third (site 2) quartile, in comparison to trees without girdling (Table 4). The dose of $GA_{4/7}$ also affected the distribution of female cones in the tree crown, yet the effect was different for each site; in site 1, the high dose brought about a greater formation of cones in the first quartile, whereas for site 2, the effect was in the second quartile (Table 4).

Effectiveness of induction of reproductive structures

The formation of male and female cones in juvenile *P. menziesii* trees of sexual origin was consistently induced under different environmental and silvicultural conditions. In most studies published on this species, material of asexual origin has been used, which are usually grafts obtained from sexually mature trees (Philippe *et al.*, 2004) with a known seed production history. Although the proportion of trees that formed female and male cones was low (Table 1), the study shows that with a timely and appropriate dose of $GA_{4/7}$, with or without girdling, it is possible to accelerate seed production in sexually immature *P. menziesii* individuals.

Induction effectiveness varied between trials. The proportion of trees that formed female cones

Cuadro 4. Efecto del anillado y de la dosis de AG_{4/7} sobre la distribución (%) de los estróbilos femeninos en la copa del árbol en dos ensayos de estimulación reproductiva en *Pseudotsuga menziesii*.**Table 4. Effect of trunk girdling and GA_{4/7} dose on the distribution (%) of female cones on the tree crown in two reproductive stimulation trials of *Pseudotsuga menziesii*.**

Cuartil de la copa	Proporción (%) de estróbilos femeninos en la copa del árbol											
	Anillado [†]				Dosis de AG _{4/7} (mg cm ⁻²) [‡]							
	Sitio 1		Sitio 2		Sitio 1				Sitio 2			
	No	Si	No	Si	0	1.27	2.55	5.10	0	1.27	2.55	5.10
Primero	65.2	18.2	24.3	30.3	0.0	16.3	27.3	73.3	0.0	66.7	27.8	25.1
Segundo	31.9	79.5	59.3	39.7	0.0	81.4	72.7	23.3	100.0	14.8	41.2	53.3
Tercero	2.9	2.3	16.4	30.0	0.0	2.3	0.0	3.3	0.0	18.5	31.0	21.6
Cuarto	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

[†] El valor de χ^2 del efecto del anillado fue 37.1 y 20.6 ($p \leq 0.001$) en los sitios 1 y 2 ♦ The χ^2 value of girdling effect was 37.1 and 20.6 ($p \leq 0.001$) in sites 1 and 2.

[‡] El valor de χ^2 del efecto de la dosis de AG_{4/7} fue 51.2 y 32.3 ($p \leq 0.001$) en los sitios 1 y 2 ♦ The χ^2 value of the effect of AG_{4/7} dose was 51.2 and 32.3 ($p \leq 0.001$) in sites 1 and 2.

La efectividad de la inducción varió entre los ensayos; la proporción de árboles que formaron estróbilos femeninos fue mayor en el sitio 2 (62.5 y 37.5 %) y la proporción con estróbilos masculinos fue mayor en el sitio 1 (12.5 vs. 6.0 %); el número de estróbilos femeninos fue mayor en el sitio 2 y el de estróbilos masculinos similar en los dos sitios (Cuadro 3). Estas diferencias se pueden deber a diversos factores, incluyendo la edad (los árboles del sitio 2 eran mayores que los del sitio 1), el microambiente [en el sitio 2 la temperatura media de febrero a mayo de 2008 fue ligeramente mayor (11.4 vs. 10.2 °C)], el manejo previo de los árboles (los árboles del sitio 1 recibieron podas recurrentes, mientras que los del sitio 2 no fueron podados en los últimos 4 años), o el estado fenológico de los árboles (los árboles del sitio 2 se encontraban más avanzados fenológicamente que los del sitio 1, como resultado del microambiente y la procedencia del germoplasma).

El estado fenológico de los brotes influyó sobre la efectividad de los tratamientos para inducir estructuras reproductivas; la formación de estróbilos femeninos fue más común en los árboles con mayor avance en la etapa fenológica estudiada, mientras que los masculinos ocurrieron en árboles menos avanzados (Figura 1). Al parecer, la diferenciación de las estructuras femeninas y masculinas en esta especie ocurre en diferentes etapas de desarrollo de los brotes, como se ha encontrado en otras especies; en *Picea engelmannii*, el estrés por sequía y calor aplicado en eta-

was greater in site 2 (62.5 and 37.5 %), and the proportion with male cones was higher in site 1 (12.5 vs. 6.0 %). The number of female cones was higher in site 2 and of male cones was similar in both sites (Table 3). These differences could be due to several factors, including tree age (trees in site 2 were older than those in site 1), the microenvironment [in site 2, average temperature from February to May 2008 was slightly higher (11.4 vs. 10.2 °C)], previous handling of trees (trees in site 1 were pruned annually, whereas those in site 2 had not been pruned in the previous 4 years), or the phenological state of the trees (trees in site 2 were more phenologically advanced than those in site 1, as a result of the microenvironment and seed origin).

The phenological state of shoots had an influence in the effectiveness of the treatments to induce reproductive structures. The formation of female cones was more common in trees that were more advanced in the shoot phenology, whereas this occurred for male cones in less advanced trees (Figure 1). It would seem that the differentiation of female and male structures in this species occurs in different stages of shoot development, as in the case of other species. In *Picea engelmannii*, stress caused by drought and heat in early stages of shoot development favors the formation of male cones, whereas in later stages, it favors female cones (Ross, 1985).

Although Ross (1983) points out that applying GA_{4/7} in *P. menziesii* at the start of shoot growth is

pas tempranas del desarrollo de los brotes favorece la formación de estróbilos masculinos, mientras que en etapas más avanzadas favorece a los femeninos (Ross, 1985).

Aunque Ross (1983) señala que las aplicaciones de $AG_{4/7}$ en *P. menziesii* al inicio del crecimiento del brote son más efectivas para inducir los dos tipos de estróbilos, otros autores han mostrado que el estado fenológico del brote influye sobre la proporción de sexos en las estructuras diferenciadas (Harrison y Owens, 1994). Ho y Eng (1995) encontraron que en *Pinus strobus* la producción de estróbilos masculinos aumenta al inicio de la etapa de crecimiento rápido del brote, mientras que en la etapa final de crecimiento no hay efecto de los tratamientos.

Efecto de la dosis de $AG_{4/7}$

Los resultados corroboraron la efectividad del $AG_{4/7}$ para inducir la diferenciación de estructuras reproductivas; sin embargo, la dosis más adecuada varió de un sitio a otro y con respecto al sexo de los estróbilos (Cuadro 3). Greenwood (1987) menciona que el $AG_{4/7}$ es más efectivo en promover la producción de estróbilos femeninos, aunque las diferencias entre ambos sexos también podrían deberse al momento de aplicación de la hormona en relación con la fenología del brote (Harrison y Owens, 1994) o a las dosis utilizadas. Cherry *et al.* (2007) lograron promover mayor número de estróbilos masculinos que femeninos con dosis bajas de $AG_{4/7}$ (0.338 y 1.35 mg cm⁻²). En la familia Cupressaceae también se ha encontrado que las dosis bajas de $AG_{4/7}$ promueven los estróbilos masculinos (Pharis y Kuo, 1977).

La formación de estróbilos femeninos fue mayor en el sitio 2 al utilizar dosis altas de $AG_{4/7}$, mientras que en el sitio 1 la dosis baja tuvo mayor efecto. La edad y el manejo previo de los árboles en cada sitio pudieron influir en estos resultados, al modificar su estado juvenil o fisiológico; los árboles del sitio 2 representan una mayor edad fisiológica y se ha encontrado que la respuesta a la estimulación floral incrementa con la edad de los árboles (Cherry *et al.*, 2007); estos mismos autores sugieren aplicar dosis bajas en árboles jóvenes en combinación con el anillado del tronco, lo cual coincide con Ross (1983), quien con dosis bajas (100 mg L⁻¹) obtuvo una mayor formación de estróbilos femeninos en *Pseudotsuga menziesii* que con las dosis altas (800 mg L⁻¹) de $AG_{4/7}$.

more effective to induce both types of cones, other authors have shown that the phenological state of the shoot has an influence on the proportion of sexes in the differentiated structures (Harrison and Owens, 1994). Ho and Eng (1995) found that male cone production in *Pinus strobus* increases at the start of the fast shoot growth stage, whereas during the final growth stage treatments have no effect.

Effect of the $GA_{4/7}$ dose

The results confirm the effectiveness of $GA_{4/7}$ for inducing the differentiation of reproductive structures. However, the most adequate dose varied from site to site and with respect to cone sex (Table 3). Greenwood (1987) mentions that $GA_{4/7}$ is more effective in promoting the production of female cones, although the differences between sexes could also be due to the timing application of the hormone in relation to shoot phenology (Harrison and Owens, 1994) or to the doses used. Cherry *et al.* (2007) promoted a higher number of male cones than female ones with low doses of $GA_{4/7}$ (0.338 and 1.35 mg cm⁻²). In the Cupressaceae family, low doses of $GA_{4/7}$ have also been found to promote male cones (Pharis and Kuo, 1977).

The formation of female cones was higher in site 2, due to higher doses of $GA_{4/7}$, whereas in site 1, the lower dose had a higher effect. Age and previous handling of the trees in each site could have an influence on the results, with the modification of the juvenility or physiological stage. Trees in site 2 are physiologically older and the response to reproductive stimulation has been found to increase with age of trees (Cherry *et al.*, 2007). These authors suggest applying low doses in juvenile trees, combined with trunk girdling, which agrees with Ross (1983), who obtained a higher formation of female cones with lower doses (100 mg L⁻¹) in *Pseudotsuga menziesii* than with higher $GA_{4/7}$ doses (800 mg L⁻¹).

High doses of $GA_{4/7}$ can have adverse effects on the treated trees, and especially on younger ones; some trees displayed a slight declination in the branches of the lower section of the tree, possibly due to phytotoxicity effects, as pointed out by Ross and Bower (1991). Also, high doses of $GA_{4/7}$ can have indirect effects on the health and vigor of trees, as a result of the energy used in the production of cones (Bonnet-Masimbert, 1987; Cherry *et al.*, 2007).

Dosis elevadas de $AG_{4/7}$ pueden tener efectos adversos sobre los árboles tratados, especialmente en los jóvenes; en algunos árboles se observó una ligera declinación en las ramas de la parte baja del árbol, posiblemente por efectos de fito-toxicidad, como lo señalan Ross y Bower (1991). Además, las dosis elevadas de $AG_{4/7}$ pueden tener efectos indirectos que afectan la salud y el vigor de los árboles, derivados de la energía utilizada en la producción de estróbilos (Bonnet-Masimbert, 1987; Cherry *et al.*, 2007).

En condiciones naturales las especies de coníferas forman los estróbilos femeninos en la parte superior de la copa y los masculinos en la parte media y baja (Dick *et al.*, 1985). Este mismo patrón se ha observado en árboles jóvenes o injertos fisiológicamente maduros al aplicar tratamientos para estimular la floración (Philipson, 1985; Ross, 1990). Sin embargo, en el presente estudio se encontró que la dosis de $AG_{4/7}$ afectó la distribución de los estróbilos femeninos en ambos sitios (Cuadro 4). En el sitio 1 la dosis baja aumentó la proporción de estróbilos en el segundo cuartil de la copa y la dosis más alta la aumentó en el primer cuartil; en el sitio 2, aunque se mantiene una mayor proporción de estróbilos en la parte alta de la copa, también aumenta la formación de estróbilos en el tercer cuartil. Dado que los árboles del sitio 2 tienen mayor altura que los del sitio 1, las diferencias en la posición de los estróbilos pueden deberse a la distancia que hay del punto de aplicación de la hormona al ápice de la copa.

Efecto del anillado del tronco

El anillado en el tronco por si solo no tuvo el efecto esperado, ya que en otros estudios se ha mostrado que el anillado es una práctica efectiva en la formación de estróbilos en *Larix* y *Pseudotsuga* (Ross y Bower, 1989; Philipson, 1996; Cherry *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando se utilizaron dosis bajas de $AG_{4/7}$, el anillado aumentó la producción de estróbilos femeninos, indicando que influyó sobre la efectividad del tratamiento hormonal. En *Picea sitchensis* el $AG_{4/7}$ combinado con calor y sequía estimuló la formación de ambos tipos de estróbilos y el anillado fue más efectivo cuando se combinó con calor (Philipson, 1992).

El anillado también modificó la posición de los estróbilos femeninos en la copa del árbol, aumentando su proporción en la parte intermedia (segundo

Under natural conditions, conifers form female cones in the upper section of the crown and male cones in the middle and lower sections (Dick *et al.*, 1985). This pattern has been noticed in young trees or physiologically mature grafts, when applying treatments for flower stimulation (Philipson, 1985; Ross, 1990). Nevertheless, this study found that the doses of $GA_{4/7}$ affected the distribution of female cones in both sites (Table 4). In site 1 the low dose increased the proportion of cones in the second quartile of the tree crown, and the highest dose increased it in the first quartile; in site 2, although a greater proportion of cones remains in the upper section of the crown, the formation of cones also increases in the third quartile. Given that trees in site 2 are taller than those in site 1, the differences in the position of cones can be due to the distance from the application point of $GA_{4/7}$ to the apex of the tree crown.

Effect of trunk girdling

Trunk girdling on its own did not have the expected effect, since other studies have shown that girdling is effective for the formation of cones in *Larix* and *Pseudotsuga* (Ross and Bower, 1989; Philipson, 1996; Cherry *et al.*, 2007). However, when low doses of $GA_{4/7}$ were used, girdling increased the number of female cones, indicating that it influenced the effectiveness of the hormone treatment. In *Picea sitchensis*, $GA_{4/7}$ combined with heat and drought, stimulated the formation of both types of cones, and girdling was more effective when combined with heat (Philipson, 1992).

Girdling also modified the position of the female cones on the tree crown, increasing its proportion in the middle section (second and third quartiles) of the crown (Table 4). This effect coincides with the action of $GA_{4/7}$, indicating that the partial blockage in the phloem caused a greater availability of carbohydrates and other growth-promoting substances in the lower branches of the tree crown, closer to the point of blockage, according to what Ross and Bower (1989) pointed out.

Implications for seed production

The treatments applied are effective and practical for the induction of female and male cones in

y tercer cuartil) de la copa (Cuadro 4). Este efecto coincide con la acción del $GA_{4/7}$, indicando que el bloqueo parcial en el floema ocasionó una mayor disponibilidad de carbohidratos y de otras sustancias promotoras del crecimiento en las ramas bajas de la copa más cercanas al punto de bloqueo, según lo indicado por Ross y Bower (1989).

Implicaciones para la producción de semillas

Los tratamientos aplicados son efectivos y prácticos para inducir estróbilos femeninos y masculinos en árboles juveniles de *P. menziesii*; sin embargo, se debe promover un mayor equilibrio en la formación de estructuras de ambos sexos. La época de aplicación fue apropiada para la formación de estróbilos femeninos, pero es necesario explorar la aplicación en etapas fenológicas más tempranas para aumentar la formación de estróbilos masculinos y la proporción de árboles con respuesta favorable. Es evidente que las diferencias en la respuesta de los árboles se deben a múltiples factores relacionados con edad, vigor y estado fisiológico de cada uno de ellos, por lo que es importante asegurar una mayor homogeneidad en la plantación para aumentar la capacidad de producción de semilla.

La producción de polen es a menudo un factor limitante en árboles juveniles; sin embargo, en la producción operativa de semilla el problema se puede resolver en forma práctica mediante la recolecta de polen de árboles maduros y la polinización artificial de los estróbilos femeninos inducidos. Aunque la mayoría de los estróbilos femeninos formados se desarrollaron de manera normal, posiblemente por el efecto de las giberelinas, no formaron semillas viables por la falta de polen.

CONCLUSIONES

En los dos ensayos se logró promover la formación de estructuras reproductivas femeninas y masculinas en árboles juveniles de origen sexual con la aplicación de $GA_{4/7}$ inyectado al tronco; el nivel de éxito varió en cada caso debido a las condiciones del sitio, la edad de los árboles, el manejo previo y el desarrollo fenológico. El anillado fue efectivo cuando se combinó con dosis bajas de $GA_{4/7}$ ($\leq 2.55 \text{ mg cm}^{-2}$), pero combinado con dosis altas tuvo un efecto negativo. Estos tratamientos pueden ser útiles en programas operativos de producción de semilla de *P. menziesii*.

juvenile *P. menziesii* trees, although a greater balance in the formation of structures of both sexes must be sought. The time of application was adequate for the formation of female cones, but it is necessary to explore the application in earlier phenological stages to increase the formation of male cones and the proportion of trees with a favorable response. Evidently, differences in responses of the trees are due to multiple factors related to the age, vigor and the physiological status of each tree, and therefore it is important to ensure a greater homogeneity in the plantation to increase the seed production capacity.

Pollen production is frequently a limiting factor in young trees; however, for operational seed production, the problem can be solved practically with the collection of pollen from mature trees and artificial pollination of the induced female cones. Although most female cones formed developed and reached a normal size, possibly due to the gibberellins effect, they did not form viable seeds due to lack of pollen.

CONCLUSIONS

In both trials, it was possible to promote the formation of female and male cones in juvenile trees of a sexual origin, by injecting $GA_{4/7}$ to the trunk. The degree of success varied in each case, due to the conditions of the site, the age of the trees, previous handling and phenological development of shoots. Girdling was effective when it was combined with the doses of $GA_{4/7}$ ($\leq 2.55 \text{ mg cm}^{-2}$), but when combined with high doses, the effect was negative. These treatments could be useful in operational programs of seed production for *P. menziesii*.

—End of the English version—



AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Ing. León Jorge Castaños Martínez y al Ing. Salvador Castro Zavala, propietarios del Conjunto Predial Forestal, por todas las facilidades y el apoyo logístico proporcionado durante la realización del estudio.

LITERATURA CITADA

- Aderkas, P., L. Kong, S. Abrams, I. Zaharia, S. Owens, and B. Porter. 2004. Flower induction methods for lodgepole pine and Douglas-fir. Centre for Forest Biology, University of Victoria. 59 p.
- Bonnet-Masimbert, M. 1987. Preliminary results on gibberellins induction of flowering of seedlings and cuttings of Norway spruce indicate some carry-over effects. *For. Ecol. Manage.* 19:163-171.
- Cherry, M. L., T. S. Anekonda, M. J. Albrecht, and G. T. Howe. 2007. Flower stimulation in young miniaturized seed orchards of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). *Can. J. For. Res.* 37:1-10.
- Debreczy, Z., and I. Racz. 1995. New species and varieties of conifers from Mexico. *Phytologia* 78:217-243.
- Dick, J. M., R. I. Smith, and K. A. Longman. 1985. Effect of bark-ringing and gibberellins on the number and distribution of cones in Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Acta Univ. Agric. Fac. Agron. (Brno)*. 3:659-663.
- Greenwood, M. S. 1987. Rejuvenation of forest trees. *Plant Growth Regulation* 6:1-12.
- Harrison, D. L. S., and J. N. Owens. 1994. Gibberellins A_{4/7} enhanced flowering in *Tsuga heterophylla*. II. Apical development and shoot formation. *Int. J. Plant Sci.* 155:302-312.
- Ho, R. H., and K. Eng. 1995. Promotion of cone production on field-grown eastern white pine grafts by gibberellin A_{4/7} application. *For. Ecol. Manage.* 75:11-16.
- Infante G., S., y G. P. Zárate L. 2000. Métodos Estadísticos; un Enfoque Interdisciplinario. Ed. Trillas, México. 643 p.
- Kong, L., and P. Aderkas. 2004. Plant growth regulators and cone induction in Pinaceae. University of Victoria, Victoria, BC, Canada. 27 p.
- Kuehl, R. 2001. Diseño de Experimentos. Principios Estadísticos para el Diseño y Análisis de Investigaciones. Thomson Learning, México. 666 p.
- Mápula-Larreta, M., J. López-Upton, J. J. Vargas-Hernández and A. Hernández-Livera. 2007. Reproductive indicators in natural populations of Douglas-fir in Mexico. *Biodiversity and Conservation* 16:727-742.
- Martínez, M. 1963. Las Pináceas Mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México. 3ª Ed. México. pp: 27-74.
- Owens, J. N., L. M. Chandler, J. S. Bennett, and T. J. Crowder. 2001. Cone enhancement in *Abies amabilis* using GA_{4/7}, fertilizer, girdling and tenting. *For. Ecol. Manage.* 154: 227-236.
- Pharis, R. P., and C. G. Kuo. 1977. Physiology of gibberellins in conifers. *Can. J. For. Res.* 7:299-325.
- Pharis, R. P., S. D. Ross, and E. E. McMullan. 1980. Promotion of flowering in the Pinaceae by gibberellins. III. Seedlings of Douglas-fir. *Physiol. Plant.* 50:119-126.
- Pharis, R. P., J. E. Weber, and S. D. Ross. 1987. The promotion of flowering in forest trees by gibberellin A_{4/7} and cultural treatments: a review of the possible mechanisms. *For. Ecol. Manage.* 19:65-84.
- Philippe, G., S. J. Lee, G. Schute, and B. Heois. 2004. Flower stimulation is cost-effective in Douglas-fir seed orchards. *Forestry* 77:279-286.
- Philipson, J. J. 1985. The effect of top pruning, girdling, and gibberellins A_{4/7} application on the production and distribution of pollen and seed cones in Sitka spruce. *Can. J. For. Res.* 15:1125-1128.
- Philipson, J. J. 1992. Optimal conditions for inducing coning of container-grown *Picea sitchensis* grafts: effects of applying different quantities of GA_{4/7}, timing and duration of heat and drought treatment, and girdling. *For. Ecol. Manage.* 53:39-52.
- Philipson, J. J. 1996. Effects of girdling and gibberellins A_{4/7} on flowering of European and Japanese larch grafts in an outdoor clone bank. *Can. J. For. Res.* 26:355-359.
- Ross, S. D. 1983. Enhancement of shoot elongation in Douglas-fir by gibberellins A_{4/7} and its relation to the hormonal promotion of flowering. *Can. J. For. Res.* 13:986-994.
- Ross, S. D. 1985. Promotion of flowering in potted *Picea engelmannii* (Perry) grafts: effects of heat, drought, gibberellin A_{4/7} and their timing. *Can. J. For. Res.* 15:618-624.
- Ross, S. D. 1990. Control sex expression in potted *Picea engelmannii* grafts by gibberellins A_{4/7} and the auxin, naphthaleneacetic acid. *Can. J. For. Res.* 20:875-879.
- Ross, S. D. 1991. Promotion of flowering in western larch by girdling and gibberellins A_{4/7} and recommendations for selection and treatment of seed trees. Research Note No. 105, B.C. Ministry of Forests, Research Laboratory. 13 p.
- Ross, S. D. 1992. Promotion of flowering in Engelmann-white spruce seed orchards by GA_{4/7} stem injection: effects of site, clonal fecundity, girdling and NAA, and treatment carry-over effects. *For. Ecol. Manage.* 50:43-55.
- Ross, S. D., and R. C. Bower. 1989. Cost-effective promotion of flowering in a Douglas-fir seed orchard by girdling and pulsed stem injection of gibberellin A_{4/7}. *Silvae Genet.* 38:189-195.
- Ross, S. D., and R. C. Bower. 1991. Promotion of seed production in Douglas-fir grafts by girdling + gibberellin A_{4/7} stem injection, and effect of retreatment. *New Forests* 5:23-34.
- Ross, S. D., and R. P. Pharis. 1976. Promotion of flowering in the Pinaceae by gibberellins. I. Sexually mature, non-flowering grafts of Douglas-fir. *Physiol. Plant.* 36:182-186.
- Ross, S. D., R. P. Pharis, and J. C. Heaman. 1980. Promotion of cone and seed production in grafted and seedling Douglas-fir seed orchards by applications of gibberellins A_{4/7} mixture. *Can. J. For. Res.* 10:464-469.
- SAS Institute Inc. 1999. SAS/STAT® User's Guide Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc. Chapter 29. The GENMOD Procedure. pp: 1363-1464.
- Zar, J. 1996. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall. New Jersey. EE.UU. 662 p.
- Zavala-Chávez, F. y J. T. Méndez-Montiel. 1996. Factores que afectan la producción de semillas en *Pseudotsuga macrolepis* Flous. en el Estado de Hidalgo, México. *Acta Bot. Mex.* 36:1-13.