

PERFILES DE RAPD ASOCIADOS CON LA RESISTENCIA A LA INTENSIDAD LUMINOSA ALTA EN BRINZALES

RAPDS PROFILES ASSOCIATED TO THE RESISTANCE TO HIGH LIGHT INTENSITY OF POLES

José Guadalupe Álvarez-Moctezuma¹, Alma Delia Ortiz-Reyes¹,
Jaime Sahagún-Castellanos¹ y Aureliano Peña-Lomelí¹

RESUMEN

Abies religiosa tiene gran potencial para utilizarse como árbol urbano, árbol de Navidad, bonsai, para obtención de madera y celulosa, construcción de techos, medicina y para secuestro de carbono. Sus plantaciones requieren de cobertura arbórea, porque es tolerante a la sombra y sus brinzales son susceptibles a la intensidad luminosa alta. Aunque, muestra variación intraespecífica natural y variación fenotípica interespecífica, a esta variable. El objetivo del presente estudio fue detectar el perfil RAPD asociado con la resistencia a la intensidad luminosa alta en brinzales de *A. religiosa*. Se aisló ADN de 15 brinzales resistentes y 15 susceptibles a dicha condición, y se evaluaron 35 iniciadores en dos muestras compuestas. De aquellos con productos de PCR, se realizó una segunda reacción con ADN de brinzales individuales. Las variables consideradas fueron supervivencia del brinzal a la intensidad luminosa alta, número de hojas, apertura estomatal, número de estomas y altura del brinzal. Se calcularon las correlaciones entre esas variables y los perfiles de RAPD. Se detectaron bandas que correlacionaron con las variables. La supervivencia de los brinzales alcanzó un valor de 24 %. El ancho y apertura estomatal tuvieron mayor cantidad de correlaciones. La banda 1801.92 pb del iniciador 5'-CCGGCCTTCC-3' se correlacionó con casi todas las variables. La supervivencia está determinada, principalmente, por la apertura de los estomas; estas, así como la altura y el número de hojas están controladas genéticamente.

Palabras clave: *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. et Cham., apertura estomatal, estoma, marcador molecular, planta umbrófila, selección asistida.

ABSTRACT

Abies religiosa has great potential as urban forest tree, Christmas-tree, bonsai, timber, paper, ceiling, medicinal, and carbon sequestration. However, plantations are not possible without tree covering, because this species is shade tolerant, and their seedlings are susceptible to high intensity light. Nevertheless, *A. religiosa* shows natural intraspecific variation in resistance to high intensity light. Because of this and because exist interspecific phenotypic variation for resistance to high intensity light. The probability that there is a genetic basis for the intraspecific variation must be high. The aim of this study was to detect RAPD profiles associated with resistance to high intensity light on *A. religiosa* seedlings. The DNA from 15 resistant and 15 susceptible seedlings to high intensity light were isolated. Two bulked samples were formed and 35 primers were evaluated. From primers with PCR products, a second PCR reaction with DNA from individual seedlings was done. Registered data were: seedling survival to high intensity light, leaf number, stomata aperture, stomata number, and plant height. Correlations between these variables, and RAPDs profiles for each primer were computed. Bands which correlated with all variables were detected. 24 % of the seedlings survived to high intensity light. Stomata width and aperture showed the largest number of correlations. The 1801.92 pb band from primer 5'-CCGGCCTTCC-3' was correlated with almost all variables. This suggests that survival, height, leaf number, and stomata aperture are genetically controlled variables. Seedling survival to high intensity light is mainly determined by stomata aperture.

Key words: *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. et Cham., stomata aperture, stomata, molecular marker, umbraphyla plant, assisted selection.

Fecha de recepción: 13 de noviembre de 2007

Fecha de aceptación: 19 de abril de 2012

¹ Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo.

INTRODUCCIÓN

Las innovaciones tecnológicas en genética han tenido una aplicación marginal y retardada en las especies forestales. Sus ciclos de vida largo, su gran tamaño y sus relaciones ecológicas pueden ser causa de ese retraso. Además, la naturaleza de los árboles y bosques con su gama de productos y servicios conllevan mayor número de desafíos y oportunidades (Harry y Strauss, 2010). Por otro lado, en México, la falta de distinción entre bosque natural y plantación en las políticas gubernamentales ha generado confusión en la opinión pública. Si bien, hace falta reconocer la vocación evolutiva del bosque, como proveedor de diversidad genética; también es necesario aceptar la importancia de las plantaciones en la generación de recursos y riqueza. Sin embargo, la poca promoción de las plantaciones forestales, en el territorio nacional, ha favorecido que el país se convierta en importador de madera.

La biotecnología forestal surgió durante la década de 1980, y comprende una colección de herramientas auxiliares para la modificación de la fisiología y genética del árbol en el proceso de su mejoramiento, la propagación e investigación (Burdon y Libby, 2006). En México, durante esa misma década, ya se habían realizado un par de trabajos de cultivo *in vitro* de especies forestales (Martínez y Ochoa, 2010). La biotecnología incluye al cultivo de tejidos, la micropropagación, la ingeniería genética y los marcadores moleculares (Harry y Strauss, 2010). En los últimos 20 años las tecnologías han aumentado y se han sofisticado, pero permanecen como un gran concepto: la biotecnología de especies forestales (FAO, 2004).

De todos los métodos biotecnológico, la ingeniería genética ha recibido la mayor atención y escrutinio por los responsables de la normatividad y la opinión pública. Al menos, parte de esto se debe a la naturaleza de la tecnología por sí sola: genes artificialmente recombinantes de diferentes organismos y evasión de barreras naturales para la reproducción sexual. El movimiento de genes con técnicas convencionales de mejoramiento genético es limitado para los taxa sexualmente compatibles, generalmente, especies emparentadas. Entonces, los genes que codifican nuevas rutas bioquímicas (localizadas en otras especies) no se transfieren a las forestales de interés económico (Harry y Strauss, 2010).

Las plantaciones forestales comerciales de transgénicos se mantienen en el anonimato. El primer árbol de ese tipo lo generaron Fillatti *et al.* (1987). Actualmente, se han utilizado docenas de especies forestales para propósitos de investigación, pero no hay referencias sobre su uso para fines comerciales en Estados Unidos de América (Harry y Strauss, 2010). En Francia y otros países, los ejemplares transgénicos se han quemado; China es la única nación que cuenta con superficies forestales comerciales, pero no se tiene su ubicación exacta, para evitar el sabotaje (Ríos, 2010). En México y sus naciones vecinas tampoco se han utilizado dichos organismos. Por lo tanto, se carece de información sobre el flujo genético hacia el territorio nacional.

INTRODUCTION

Technological innovations in genetics have been a marginal application and even retarded in forest species. Their long-life cycles, their great size and their ecologic relations may cause this delay. Also, the nature of trees and forests with their series of products and services involves a great number of challenges and opportunities (Harry and Strauss, 2010).

On the other hand, in Mexico, the lack of differentiation between natural forests and plantations in government policy has provoked confusion in public opinion. If it is true that it is necessary to acknowledge the evolutionary vocation of forests as provider of genetic diversity, it is also necessary to accept the importance of plantations in the generation of resources and richness. However, the poor promotion of forest plantations in the country has favored that the country becomes a wood importer.

Forest biotechnology started in the 1980's and includes a series of auxiliary tools to modify the physiology and genetics of the tree in their improvement process, propagation and research (Burdon and Libby, 2006). During that same decade, a pair of studies had already been accomplished in Mexico about *in vitro* cultures of forest species (Martínez and Ochoa, 2010). Biotechnology includes tissue culture, micro-propagation, genetic engineering and molecular markers (Harry and Strauss, 2010). Technologies have multiplied in the last 20 years and have become even more sophisticated, but keep themselves as a great concept: Biotechnology of forest species (FAO, 2004).

Of all the biotechnological methods, genetic engineering has attracted the greatest attention and scrutiny of the responsible for regulations and public opinion. At least, part of it is due to the nature of technology by itself: artificially recombining genes of organisms and evasion of natural barriers for sexual reproduction. Gene movement with conventional techniques for genetic improvement is limited for the sexually compatible taxa, generally, related species. Therefore, the genes that code new biochemical routes (located in other species) do not transfer to those of the forest scope with economic interest (Harry and Strauss, 2010).

Commercial plantations of forest transgenics are kept anonymous. The first tree of that sort was produced by Fillatti *et al.* (1987). At present, dozens of forest species have been used for research endings, but there are no references about their use for commercial purposes in the United States (Harry and Strauss, 2010). In France and other countries, transgenic trees have been burned; China is the only country with commercial forest areas, but its exact location is unknown in order to avoid sabotage (Ríos, 2010). In México and its neighboring countries they have not been used as well. Thus, there is no information about the genetic flow into national lands.

El mejoramiento genético forestal tradicional y la biotecnología comparten objetivos, principios, prácticas y riesgos. Aun cuando, los dos métodos representan diferentes enfoques, ambos se complementan. Genetistas forestales están trabajando con estos dos enfoques para mejorar la salud y la adaptación de poblaciones o para incrementar la producción de bienes y servicios (Harry y Strauss, 2010). El flujo genético desde las plantaciones comerciales a las poblaciones naturales se presenta, independientemente de la tecnología utilizada, hacia la generación de los cultivares mejorados (Schouten *et al.*, 2006). Este cruzamiento ocurre entre individuos de la misma especie, o bien taxa cercanos evolutivamente. Cualquier plantación forestal puede alterar la dinámica ecológica de un bosque natural, incluso los individuos nativos se pueden convertir en maleza, cuando no se toman las precauciones debidas. También comparten la alta persistencia en campo.

Las especies forestales son las principales beneficiadas de la biotecnología: por su ciclo de vida tan largo, gran tamaño, y presencia en ambientes heterogéneos. Los métodos biotecnológicos ayudan a reducir costos, tiempo, o bien, a incluir nuevos objetivos en los estudios genéticos (Harry y Strauss, 2010). Con las técnicas tradicionales, generalmente, se elegía una variable por cada ciclo de selección. En la actualidad, los marcadores moleculares se están empezando a integrar a los programas de mejoramiento genético para obtener mayor diversidad, incrementar la ganancia genética generacional y reducir los costos de selección (Harry y Strauss, 2010).

La velocidad con la cual se determinan nuevas especies se ha incrementado, gracias a los avances técnicos en las herramientas genómicas, que incluyen la secuenciación de genomas (Tuskan *et al.*, 2006; Grattapaglia *et al.*, 2009). Una característica clave de la ingeniería genética es que la inserción asexual involucra de uno a doce genes; mientras que el mejoramiento genético tradicional, a decenas de miles de genes aleatoriamente combinados (Harry y Strauss, 2010).

Abies religiosa (Kunth) Schltdl. et Cham. es una especie dominante en bosques de gran altitud en el centro de México (Rzedowski, 2006). Sin embargo, su uso es marginal (Gómez, 2003), pese a su gran potencial como árbol urbano (Chacalo *et al.*, 1994), árbol de Navidad (Álvarez-Moctezuma *et al.*, 2007), bonsai, para la obtención de madera y celulosa, construcción de techos, como medicina (Bojorges, 1990) y para el secuestro de carbono (Valenzuela, 2001).

El establecimiento de plantaciones con *A. religiosa* sin cobertura se dificulta, pese a ser tolerante a la sombra, sus brinzales son muy susceptibles a la intensidad luminosa alta, por lo que en espacios abiertos exhiben una gran mortandad (Camacho, 1996). Los brinzales requieren de 0.6 a 0.74 m² de cobertura, es decir, 16.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica (May, 2001). Como consecuencia, la regeneración natural en espacios abiertos se establece en cantidades reducidas, lo cual incide en la renovación y restauración de los bosques (Galindo, 1996).

Traditional forest genetic improvement and biotechnology share objectives, principles, practices and risks. Even when both methods represent different viewpoints, both are complimentary. Forest genetics specialists are working with these two viewpoints in order to improve health and adaptation of populations or to increase goods and services (Harry and Strauss, 2010). Genetic flow from commercial plantations to natural populations occurs with no regard to the technology that is being used towards the generation of wet cultivations (Schouten *et al.*, 2006). This crossing takes place among individuals of the same species, or with evolutionary near taxa. Any forest plantation may alter the ecological dynamics of a natural forest, inclusive native individuals might become weeds when the necessary measures are not taken. They also share high field persistence.

Forest species are mostly benefited by biotechnology, as they have a very long life cycle, great size and are present at heterogeneous environments. Biotechnological methods help to reduce costs, time or even to include new aims to genetic studies (Harry and Strauss, 2010). With traditional techniques, one variable was selected, regularly, for each selection cycle. At present, molecular markers are beginning to be added to genetic improvement programs to achieve more diversity, increase genetic generation gain and to reduce selection costs (Harry and Strauss, 2010).

The speed to which new species are determined has increased, thanks to the technological advance in the genomic tools, that include the genome sequence (Tuskan *et al.*, 2006; Grattapaglia *et al.*, 2009). A key feature in genetic engineering is that sexual insertion involves from one to twelve genes, while traditional genetic improvement, tens of thousands of genes randomly combined (Harry and Strauss, 2010).

Abies religiosa (Kunth) Schltdl. et Cham. is a dominant species in forests of high altitude at Central Mexico (Rzedowski, 2006). However, it has a marginal use (Gómez, 2003), in spite of its great potential as urban tree (Chacalo *et al.*, 1994), Christmas tree (Álvarez-Moctezuma *et al.*, 2007), bonsai, as food and cellulose source, roofs and medicine (Bojorges, 1990) and for carbon sequestration (Valenzuela, 2001).

The establishment of *A. religiosa* plantations without cover becomes difficult, in spite of being tolerant to shadow, its saplings are very susceptible to high light, which explains why wide open spaces provoke high mortality (Camacho, 1996). Saplings demand from 0.6 to 0.74 m² of crown cover, that is, 16.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ of luminous intensity (May, 2001). As a consequence, natural regeneration establishes in small amounts in open spaces, which affects renewal and restoration of forests (Galindo, 1996).

A. religiosa shows intraspecific and interspecific variation for tolerance to high light exposure (Camacho, 1996; Galindo, 1996; González, 1985; Pandey, 2006; Rodríguez-Calcerrada *et al.*, 2006). Therefore, there must be a great probability to find a genetic basis that supports intraspecific variation.

A. religiosa exhibe variación intraespecífica e interespecífica para la tolerancia a la exposición a intensidades lumínicas altas (Camacho, 1996; Galindo, 1996; González, 1985; Pandey, 2006; Rodríguez-Calcerrada *et al.*, 2006). Por consiguiente, debe haber una gran probabilidad de dilucidar una base genética que respalde la variación intraespecífica.

El Análisis Segregante en Agrupaciones es el método más común para la selección asistida por marcadores moleculares, y requiere la evaluación de tres generaciones. En muchas especies forestales no es posible aplicarlo por falta de líneas endogámicas, su ciclo de vida largo y alta depresión endogámica (Carlson *et al.*, 1994).

En el Análisis Parental en Agrupaciones es factible utilizar únicamente al progenitor femenino y su progenie, siempre que el marcador esté en condición heterocigota (Arcade *et al.*, 2002; Carlson *et al.*, 1994; Marques *et al.*, 1999).

Actualmente es una realidad la utilización de los marcadores moleculares en especies forestales para la selección de características con importancia económica (Carlson *et al.*, 1994). Así, se han localizado regiones genómicas que controlan los parámetros microdensitométricos correspondientes a las características de la madera en híbridos del género *Larix* (Arcade *et al.*, 2002). También, se ha realizado selección con marcadores asistidos en programas de mejoramiento genético de retrocruzas, para resistencia al cancro en *Castanea dentata* (Marsh.) Borkh. (Bernatzky y Mulcahy, 1992).

En especies e híbridos de *Eucalyptus* se ha hecho selección retrospectiva de árboles élite, mediante pruebas de paternidad con marcadores de microsatélite como una buena alternativa para el mejoramiento genético táctico a corto plazo (Grattapaglia *et al.*, 2004).

Además se han determinado QTLs (Quantitative Traits Loci), a nivel de transcripción, para la identificación de genes candidatos para los caracteres cuantitativos de calidad y crecimiento de madera (Kirst *et al.*, 2004). Con la aplicación de esta técnica se han detectado caracteres de importancia económica en *Pinus sylvestris* L. (Lerceteau *et al.*, 1999); y en *Picea* spp. se identificaron marcadores de densidad de la madera (Markussen *et al.*, 1999); así como, genes que controlan el crecimiento en *Eucalyptus nitens* (H. Deane *et. Maiden*) Maiden (Moran *et al.*, 1999) y los asociados a características de microdensitometría de la madera en *Larix* spp. (Prat *et al.*, 1999). También se han localizado caracteres fisiológicos ligados a marcadores moleculares para el crecimiento foliar en *Populus* (Taylor *et al.*, 1999). En el caso de *Eucalyptus tereticornis* Sm. y *Eucalyptus globulus* Labill., se han determinado los genes que regulan caracteres de la propagación vegetativa (Marques *et al.*, 1999).

Bulked Segregant Analysis is the most common method for assisted selection for molecular markers and demands the assessment of three generations. In many forest species it is not possible to apply it because there are no endogamic lines, they have a long life cycle and a high endogamic depression (Carlson *et al.*, 1994).

In the Parental Analysis in Groups it is possible to use only the female parent and her offspring, as the marker is in a heterozygous condition (Arcade *et al.*, 2002; Carlson *et al.*, 1994; Marques *et al.*, 1999).

At present it is a reality the use of molecular markers in forest species for the selection of features of economic importance (Carlson *et al.*, 1994). Thus, genomic regions that control microdensitometric parameters that belong to the characteristics of woods of hybrids of *Larix* have been found (Arcade *et al.*, 2002). Also, selection with assisted markers has been made in genetic improvement programs of retro cross for cancer resistance *Castanea dentata* (Marsh.) Borkh. (Bernatzky and Mulcahy, 1992).

In species and hybrids of *Eucalyptus* retrospective selection of elite trees has been made by parental tests with microsatelital markers as a good alternative for tactical genetic improvement at a short term (Grattapaglia *et al.*, 2004).

Also QTLs (Quantitative Traits Loci) have been determined at a transcription level, for the identification of candidate genes for the quantitative characters of wood quality and growth (Kirst *et al.*, 2004). With this technique economically important characters have been identified in *Pinus sylvestris* (Lerceteau *et al.*, 1999); and in *Picea* spp. markers of wood density were found (Markussen *et al.*, 1999). Also, genes have been identified that control growth of *Eucalyptus nitens* (H. Deane *et Maiden*) (Moran *et al.*, 1999) and those related to the microdensitometry characteristics of wood of *Larix* spp. (Prat *et al.*, 1999). Physiological characters linked to molecular markers for the foliar growth in *Populus* have been located as well (Taylor *et al.*, 1999). In *Eucalyptus tereticornis* Sm. and *Eucalyptus globulus*, Labil., the genes responsible for regulating vegetative propagation have been identified (Marques *et al.*, 1999).

The RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) technique has been used to detect molecular markers linked to genes that control white pine blister rust in *Pinus lambertiana* Douglas (Devey *et al.*, 1995); as well as those linked to the resistance to pine needle galls in *Pinus thunbergii* Parl. (Kondo *et al.*, 1999); those related to the resistance to *Anisogramma anomala* (Peck.) E. Müller in *Corylus avellana* L. (Mechlenbacher *et al.*, 2004), and to *Alternaria alternata* (Fries) Keissler in *Populus* (Su *et al.*, 2000); and *Populus* species and hybrids have been mapped (Storme *et al.*, 1999). RAPD profiles are useful in assisted selection by molecular markers, chromosome mapping and transgenesis.

La técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) se ha utilizado para detectar los marcadores moleculares ligados a genes que regulan la resistencia a la roya vesicular de los pinos blancos en *Pinus lambertiana* Douglas (Devey et al., 1995); los asociados con la resistencia a la agalla de la acícula de pino en *Pinus thunbergii* Parl. Kondo et al., 1999); aquéllos relacionados con la resistencia a *Anisogramma anomala* (Peck) E. Müller en *Corylus avellana* L. (Mechlenbacher et al., 2004) y a *Alternaria alternata* (Fries) Keissler en *Populus* (Su et al., 2000); y se han mapeado especies e híbridos de *Populus* (Storme et al., 1999). Los perfiles de RAPDs son útiles en la selección asistida por marcadores moleculares, en el mapeo cromosómico y en la transgénesis.

A través de un Análisis Segregante en Agrupaciones (Bulked Segregant Analysis) se han detectado marcadores moleculares ligados a la resistencia a *Melampsora medusae* Thüm., en *Populus deltoides* Bartram ex Marshall (Tabor et al., 2000). Así mismo, la selección asistida con marcadores moleculares ha permitido mejorar la respuesta en crecimiento bajo condiciones de estrés abiótico (Tauer et al., 1992).

El objetivo de este estudio fue detectar los perfiles de RAPD asociados con la resistencia a intensidad luminosa alta en brinzales de *Abies religiosa*, para utilizarlos en procesos de selección asistida en el futuro.

MATERIALES Y MÉTODOS

En 2005, se recolectaron semillas de medios hermanos maternos de *Abies religiosa* en la ladera sur del Parque Nacional Cumbres del Ajusco (Tlalpan, D. F.), ubicada a 19° 12' de latitud norte y 99° 15' de longitud oeste. Las semillas germinaron bajo malla-sombra de 90 % (hasta 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

A finales del primer trimestre del siguiente año, se colocaron 400 brinzales (hermanos maternos) de un año de edad cubiertos con malla-sombra de 90 %, la cual se reemplazó a las dos semanas por malla-sombra de 60 % (hasta 4000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en el vivero de la División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo. Los brinzales cuyo vigor disminuyó se retiraron y se dispusieron bajo malla-sombra de 90 %, etiquetándolos como muy sensibles a intensidad luminosa alta.

Dos semanas después, se sustituyó por malla-sombra de 40 % (hasta 6,000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y los brinzales que exhibieron menor vigor se pusieron bajo malla-sombra de 90 %, rotulándolos como sensibles. A las dos semanas los individuos supervivientes se marcaron como resistentes.

A las dos semanas, se eligieron al azar 15 ejemplares resistentes y 15 muy susceptibles a intensidad luminosa alta; de cada uno se tomó 0.1 g de acículas jóvenes, de buen vigor y libres de plagas, hongos y daños físicos. Se lavaron con

Through Bulk Segregant Analysis molecular markers linked to the resistance to *Melampsora medusae* Thüm in *Populus deltoides* have been detected Bartram ex Marshall have been detected (Tabor et al., 2000). Also, assisted selection with molecular markers has made it possible to improve the response in low growth in abiotic stress (Tauer et al., 1992).

The aim of this project was to detect the RAPD profiles related to the resistance to high light intensity in *Abies religiosa* poles, in order to use them in the future, in assisted selection processes.

MATERIALS AND METHODS

In 2005, seeds were collected from half maternal brothers of *Abies religiosa* in the southern face of the hill of Cumbres del Ajusco National Park in Tlalpan, D.F., located at 19° 12' N and 99° 15' W. Seeds germinated under a 90 % shadow mesh (until 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

At the end of the first three months of the following year, 400 one-year old poles covered with a 90 % shadow mesh were placed (maternal seedlings); after two weeks, this cover was replaced by a 60% shadow mesh (up to 4000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at the tree nursery of la División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo. Those poles which showed a reduction of their vigour were removed and were placed under a 90% shadow mesh, and were labeled as very sensible to high light intensity.

After two week, it was replaced by a 40% shadow mesh (up to 6,000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), and poles which showed a vigor reduction were removed and placed under a 90% shadow mesh, and were labeled as sensible. After two weeks, those samples that survived were labeled as resistant to high light intensity.

After two weeks 15 resistant and 15 very susceptible samples were chosen at random; from each of them were taken 0.1 g needles that were young, strong and without any fungi or physical damage. They were washed with extrano and 70% etanol; then, DNA was extracted following the Nucleon Phytopure Plant DNA Extraction™ (Amersham Biosciences, 2008) protocol; during the cell wall lysis, β -mercaptoetanol was added; RNAasa A was added; and the DNA concentration per individual at 10 pmol was standardized.

Two compound samples were formed: the first one with identical DNA (10 pM) volumes of each of the 15 resistant poles; the other one belonged to the DNA of the 15 susceptible poles. The PCR reaction was made in a Techne™ thermo-cycler, with a 91° C (2 min) cycle; 35 cycles of 30 seconds at 94° C, 30 seconds at 40° C and 90 seconds at 72° C and one cycle at 72° C (90 minutes). Each microtube contained 81.07 μL of deionized water (Sigma), 10 μL of Mg (1 M), 3 μL de MgCl_2 (50 mM) buffer, 2 μL of dNTPs (10 mM), 2.5 μL initiator, 0.93 μL ADN, 0.5 μL of Taq DNA-polymerase (Invitrogen™). 35 initiators (Operon™) with 80 % cytokines and guanines were assessed: most of them had two cytokines or guanines in both ends.

extrano y etanol al 70 %; a continuación se extrajo el ADN con el protocolo *Nucleon Phytopure Plant DNA Extraction*® (Amersham Biosciences, 2008), durante la lisis de la pared celular se agregó β -mercaptoetanol; se adicionó RNAasa A; y se estandarizó la concentración de ADN por individuo a 10 pmol.

Se hicieron dos muestras compuestas: la primera con volúmenes idénticos de ADN (10 pM) de cada uno de los 15 brinzales resistentes; la otra correspondió al ADN de los 15 brinzales susceptibles. La reacción de PCR se realizó en un termociclador Techne® con un ciclo a 91° C (2 min); 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 40° C y 90 segundos a 72° C y un ciclo a 72° C (90 minutos). Cada microtubo contenía 81.07 μ L de agua deionizada (Sigma), 10 μ L amortiguador de Mg (1 M), 3 μ L de $MgCl_2$ (50 mM), 2 μ L de dNTPs (10 mM), 2.5 μ L iniciador, 0.93 μ L ADN, 0.5 μ L de Taq DNA-polimerasa (Invitrogen®). Se evaluaron 35 iniciadores (Operon®) con 80 % de citocinas y guaninas: la mayoría con dos citocinas o guaninas en ambos extremos.

La electroforesis se llevó a cabo en un gel de UltraPure™ Agarose-1000® (Invitrogen) al 8 % (p/v). Las muestras individuales incluían 7 μ L de ADN y 5 μ L de amortiguador de carga. El marcador de peso molecular fue de 100 bp DNA Ladder® (Invitrogen®). Se tiñó con bromuro de etidio (Sigma) y visualizó en un Sistema de Análisis e Interpretación de Geles Edas 290® (Kodak).

Los iniciadores que presentaron productos de PCR se usaron para una nueva reacción de PCR con el ADN de cada brinzal (15 susceptibles y 15 resistentes). Para el corrimiento y revelado de los geles se siguió el procedimiento antes descrito.

Las variables consideradas fueron la supervivencia a la intensidad luminosa alta (ausencia o presencia); número de acículas por brinzal; altura de planta (cm); promedio de la apertura estomatal (μ m); y promedio del número de estomas por brinzal.

Para obtener los promedio de la apertura estomatal y del número de estomas por individuos se muestrearon cinco hojas por brinzal localizadas a diferente altura; se fijaron con FAA (Ruzin, 1999) (durante 24 horas); se transparentaron con blanqueador doméstico Cloralex® (por 72 horas); y se lavaron dos veces con agua destilada.

La epidermis del envés se aisló manualmente, con pinzas de disección y bajo un microscopio estereoscópico Leica Zoom 2000®; se tiñó durante cinco minutos con acetocarmín (Ruzin, 1999) y se lavó dos veces con agua destilada. Las observaciones se hicieron en un microscopio de campo claro Leica Cme® y se obtuvieron fotografías con una cámara Motic®. El número de estomas por muestra (en 0.040 mm²) se contabilizó en cinco campos, con un aumento de 400x.

Electrophoresis was made in a UltraPure™ Agarose-1000 (Invitrogen™) at 8 % (p/v) gel. Individual samples included 7 μ L of ADN and 5 μ L load buffer. The molecular weight marker was 100 bp DNA Ladder™ (Invitrogen™). Staining was made with ethidium bromide (Sigma) and was visualized through an Edas 290™ Gel Analysis and Interpretation System (Kodak).

The initiators that showed PCR products PCR were used for a new PCR reaction with the DNA of each pole (15 susceptible and 15 resistant). For gel running and revelation the formerly described procedure was followed.

The variables that were considered in regard to survival to high light intensity (absence or presence); number of needles per pole; height of the plant (cm); average stomata opening (μ m); and average number of stomata per pole.

In order to obtain stomata aperture and of the number of stomata per individuals, five needles per pole were sampled located at different height; they were fixed with FAA (Ruzin, 1999) (during 24 hours); they were made transparent with home bleach Cloralex™ (for 72 hours); and they were washed twice with distilled water.

The underside epidermis was isolated by hand with dissection tweezers and a stereoscopic LeicaZoom 2000™ microscope; it was stained for five minutes with acetocarmine (Ruzin, 1999) and was washed twice with distilled water. Observations were made with a Leica Cme™ dark field microscope and photographs were taken with a Motic™ camera. The number of stomata per sample (en 0.040 mm²) were counted in five fields with a 400x zoom.

Stomatal aperture was measured in 10 cell by pole (with a total 1000x zoom); in addition, the number of stomata per leaf and plant and the ostiole per stomata and plant were determined.

Statistical analysis was made by Pearson Product-Moment Correlations with Excel™ (Microsoft Office) between the morphologic characteristics and the profiles of the bands of each initiator, as well as for the morphological variables. Significant associations ($P=0.01$) were analyzed and without calculus relations.

RESULTS AND DISCUSSION

Pole survival

95 poles out of 400 (23.75 %) that survived high light intensity were recorded. In this regard, Camacho (1996) and Galindo (1996) refer smaller records (10-15 %).

It is worth-noticing that seeds were taken from populations located in sites of Ajusco, with a southern hillside, which makes it easier to suppose that as they are exposed to greater light intensities, they could have been pre-selected naturally for survival under high

La apertura estomatal se midió en 10 células por brinjal (con un aumento total de 1000x); además, se calculó el número de estomas por hoja y planta; y el área del ostiolo por estoma y planta.

El análisis estadístico se hizo mediante correlaciones producto-momento de Pearson con Excel® (Microsoft Office) entre las características morfológicas y los perfiles de bandas de cada iniciador; así como para las variables morfológicas. Se analizaron las asociaciones significativas ($P=0.01$) y sin relaciones de cálculo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Supervivencia de brinzales

Se registraron 95 brinzales de 400 (23.75 %) que sobrevivieron a la intensidad luminosa alta. Al respecto, otros autores consignan porcentajes menores (10-15 %) (Camacho, 1996; Galindo, 1996).

Es importante señalar que la semilla fue recolectada de poblaciones ubicadas en sitios del Ajusco con exposición sur; por lo que es factible suponer, que al estar expuestas a mayores intensidades luminosas pudiesen haber sido preseleccionadas de manera natural para la supervivencia en condiciones de alta intensidad luminosa. En general, se reconoce que la luz es un factor primordial para el establecimiento exitoso de las especies forestales (Koike, 2001).

Davies (2001) determinó para 11 taxa arbóreos simpátricos, en Borneo, que las tasas de mortalidad varían entre las especies. La mortalidad estuvo significativamente relacionada al tamaño del árbol, en la mayoría de ellas.

La supervivencia es una variable compleja, producto de la acción e interacción de muchas otras variables aisladas; por ejemplo, del tamaño de la semilla, la disponibilidad de nitrógeno y la tasa de crecimiento bajo sombra profunda (Walters y Reich, 2000). Un elemento muy importante que incide en ella es la competencia entre raíces (Coomes y Grubb, 2000).

En especies arbóreas y arbustivas de zonas templadas ubicadas en América, Europa y Asia se han documentado correlaciones negativas entre la tolerancia a la sombra y la sequía; así como entre la primera y la correspondiente a la inundación (Niinemets, 2006). Si se considera que los taxa no susceptibles a la sombra tienen plasticidad fisiológica y morfológica (Kubiske y Abrams, 1994), es probable que esto les haya conferido una preadaptación.

Los iniciadores evaluados fueron 35, de ellos, solo nueve resultaron polimórficos y mostraron marcadas diferencias entre productos de amplificación, por el método de RAPD (5'-GCATCCCGGC-3', 5'-GCGGGGATGC-3', 5'-CCGCCGTGG-3', 5'-CCCGCAACG-3',

light intensity conditions. In general terms, it is acknowledged that light is a major factor for the successful establishment of forest species (Koike, 2001).

Davies (2001) determined for 11 sympatric tree taxa in Borneo, that mortality rates vary among species; it was significantly related to the size of the tree, in most of them.

Survival is a complex variable, as it is a product of the action and interaction of many other isolated variables; for instance, of seed size, nitrogen availability and growth rate in deep shadow (Walters and Reich, 2000). One very important element that affects it is root competence (Coomes and Grubb, 2000).

In tree and shrub of species mild weather zones in America, Europe and Asia negative correlations have been recorded between shadow tolerance and drought as well as with shadow and flooding (Niinemets, 2006). If it is taken into account that taxa that are not susceptible to shadow have physiological and morphological plasticity (Kubiske and Abrams, 1994), probably it has provided them a preadaptation potential.

There were 35 assessed initiators, nine of which were polymorphic and showed clear differences among amplification products by the RAPD method (5'-GCATCCCGGC-3', 5'-GCGGGGATGC-3', 5'-CCGCCGTGG-3', 5'-CCCGCAACG-3', 5'-CGGCCGTAGG-3', 5'-GCGGCCATCC-3', 5'-CCGGCCTTCC-3', 5'-CCCGCCTTCC-3' y 5'-ATGTGTGCG-3').

At the end of the first analysis nine polymorphic initiators were obtained, four monomorphic and 15 without significant results. Six out of the nine polymorphic in each one of the resistant and susceptible individuals were tested, and from them, only the 5'-CCCGCAACG-3' initiator did not generate amplification products. 5'-GCGGGGATGC-3' (with 12 bands) had the greatest number of amplification products (Table 1, Figure 1).

Amplification products and survival correlation

In five amplification products (from three initiators) a correlation between survival and light intensity was determined (Table 1). There are records about the genetic control of tolerance to light intensity; for example, phosphatidilglycerol synthesis is controlled by a simple gene; this compound allows cells to be protected under high light conditions, by dimerization and reactivation of Photosystem II, which favors the keep the photosynthetic process (Sakurai *et al.*, 2003).

Tetrapirrol biosynthesis is strictly regulated to prevent the accumulation of free intermediaries and is related to the control of some genes (Sperling *et al.*, 1997). In addition, the oxidoreductase enzyme of protochlorophyllide protects plant cells from photodynamical damage (Su *et al.*, 2001). Finally, the cubic phase of paracrystalline PBL has been proposed as a buffer

5'-CGGCGGTAGG-3', 5'-GCCGCCATCC-3', 5'-CCGGCCTTCC-3', 5'-CCCGCCTTCC-3' y 5'-ATGTGTGCG-3').

Al final del primer análisis se obtuvieron nueve iniciadores polimórficos, cuatro monomórficos y 15 sin resultados significativos. Se probaron seis iniciadores de los nueve polimórficos en cada uno de los individuos resistentes y susceptibles, y de ellos solamente el iniciador 5'-CCCCGCAACG-3' no generó productos de amplificación. El que tuvo más productos de amplificación fue 5'-GCCGGGATGC-3' (con 12 bandas) (Cuadro 1, Figura 1).

Correlación de productos de amplificación y supervivencia

En cinco productos de amplificación (provenientes de tres iniciadores) se determinó la correlación entre la supervivencia y la intensidad luminosa (Cuadro 1). En la literatura hay registros sobre el control genético de la tolerancia a la intensidad luminosa; por ejemplo, la síntesis del fosfatidilglicerol es regulada por un gen simple; este compuesto permite que las células se protejan en condiciones de alta luminosidad, mediante dimerización y reactivación del Fotosistema II, lo que favorece el mantenimiento del proceso fotosintético (Sakurai *et al.*, 2003).

La biosíntesis del tetrapirrol está estrictamente regulada para prevenir la acumulación de intermediarios libres, y responde al control de ciertos genes (Sperling *et al.*, 1997). Además, la enzima oxidorreductasa de la protoclorofila protege a las plántulas del daño fotodinámico (Su *et al.*, 2001). Por último, la fase cúbica del PBL paracristalino ha sido propuesta como un amortiguador contra el daño foto-oxidativo, en condiciones de altas intensidades de luz (Franck *et al.*, 2000). Por lo tanto, la supervivencia a la intensidad luminosa alta puede explicarse por muchos factores, algunos de ellos controlados genéticamente.

La altura es una variable importante, porque con ella es posible inferir la edad del árbol, y *Abies religiosa* pierde susceptibilidad a la intensidad luminosa con la edad.

El promedio de altura de los brinzales susceptibles fue de 34.3 cm, mientras que en los resistentes fue de 33.5 cm; sin embargo, no hubo diferencias significativas ($P=0.05$) entre ambos, lo cual pudo responder a que el intervalo de altura fue muy estrecho (18 a 40 cm). Es posible que si se amplía, se tengan resultados diferentes.

against photo-oxidative damage under high light intensity conditions (Franck *et al.*, 2000). Therefore, survival to high light intensity may be explained by many factors, some of which are genetically controlled.

Height

Height is an important variable, since with it age of trees is possible to be inferred, and *Abies religiosa* loses susceptibility to light intensity with age.

Height average of the susceptible poles was 34.3 cm while in the resistant ones it was 33.5 cm, but there were no significant differences ($P=0.05$) between them, which might respond to the fact that the height interval was rather narrow (18 a 40 cm). If it widens, results might behave otherwise.

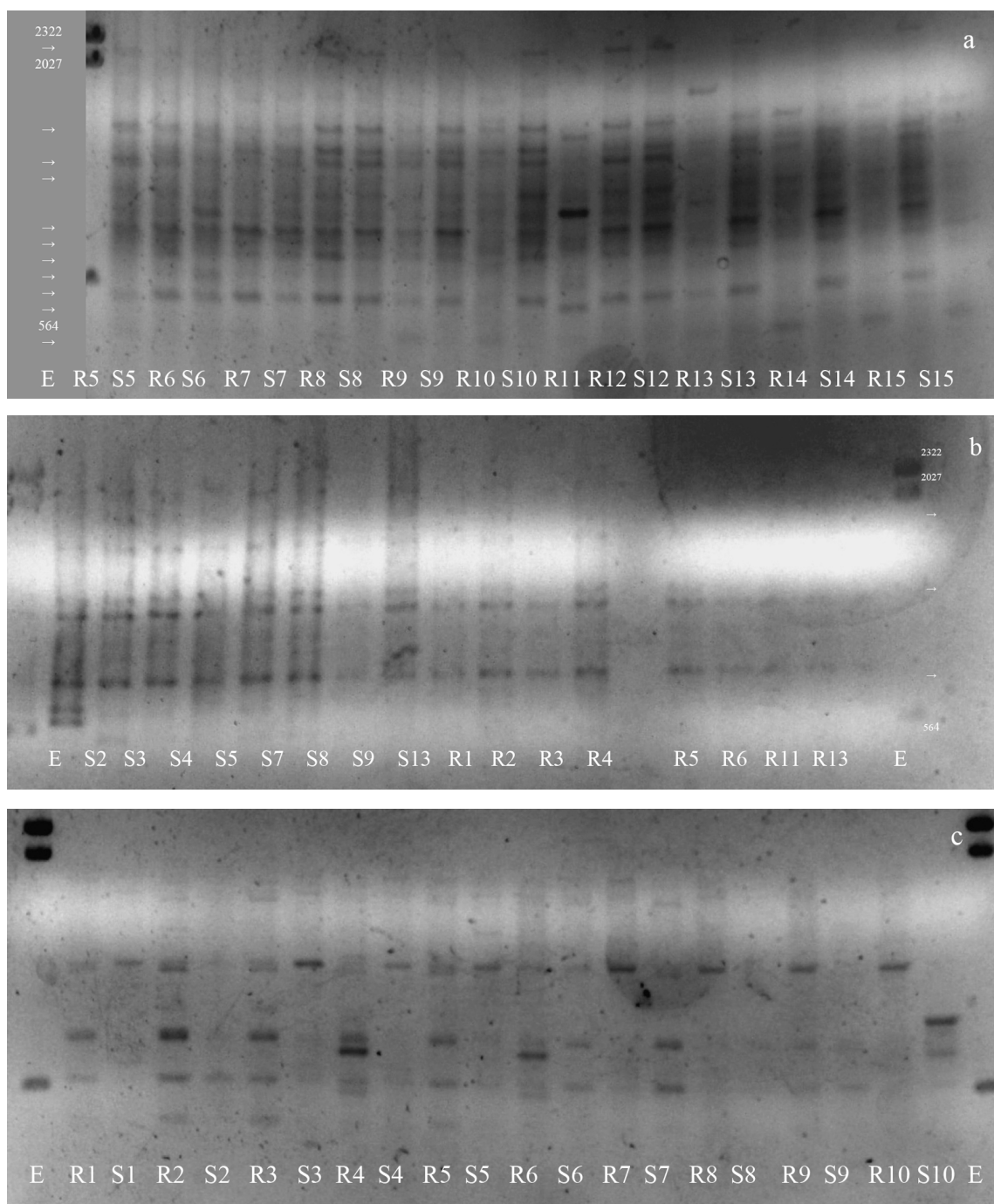
Umbrophyllous conditions are limiting for the growth of autotrophic organisms. In this regard, Olusegun *et al.* (1994) report that 12 forest species under a low light intensity reduce their growth in height, while *Betula papyrifera* Marsh., *B. alleghaniensis* Britton, *Ostrya virginiana* (Mill.) K. Koch, *Acer saccharum* Marsh. and *Quercus rubra* L. vary their response under shadow conditions, according to the species (Walters *et al.*, 1996). Poorter *et al.* (2003) assessed 53 tropical trees with a different tolerance to shadow, and determined that height was strongly correlated with the architecture of the plant, as those that assign many resources to lateral stems tend to have a smaller aspect.

In general terms, it is acknowledged that shadow reduces growth in most forest species. Thus, Pagès *et al.* (2003) observed that the direct effects of shadow are negative for all the non-tolerant taxa, but the impact over *Picea abies* (L.) Karst. and *Abies alba* Mill. was higher than in *Fagus sylvatica* L. and *Acer pseudoplatanus* L.

There are other important factors in growth of a pole under a canopy; for example, nutrition. Catovsky and Bazzaz (2002) report that the availability of nitrogen affects the regeneration of mild-weather species from the seed bank of the undergrowth. Kobe (2006) declared that the growth of a pole is in terms of light, water availability in soil and leaf nitrogen.

Correlation between amplification products and height

Four bands were obtained that significantly correlated ($P=0.01$) with the height of the pole (Table 1). This is coincidental with several research studies in regard to the heredability of height in forest species (Clark *et al.*, 1998; Jindal, 1998; López *et al.*, 1999; Mohammad *et al.*, 2005; Palmer, 2006; St. Clair, 2000). Thus, at least 11 loci are associated to this variable in *Glycine max* (L.) Merr. (Lee *et al.*, 1996). In contrast to what is in the record for *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., in which height and flowering are controlled by one single gene of partial dominance (Kearsey *et al.*, 2003).



Las flechas señalan los perfiles de RAPDs.
 E= escalerilla; R= brinzales resistentes; S= brinzales susceptibles a la intensidad luminosa alta.
 Arrows point out the profiles of RAPDs.
 E= "escalerilla"; R= resistant poles; S= poles susceptible to high light intensity

Figura 1. Patrones de amplificación RAPD y peso molecular de los productos obtenidos. Iniciadores: a) 5'-CCGGGATGC-3', b) 5'-CCGGCCTTCC-3', c) 5'-CCGCCGTTGG-3'.
 Figure 1. RAPD amplification patterns and molecular weight of the obtained products. Initiators: a) 5'-CCGGGATGC-3', b) 5'-CCGGCCTTCC-3', c) 5'-CCGCCGTTGG-3'.

Cuadro 1. Valores de las correlaciones significativas ($P \leq 0.01$) entre iniciadores y variables independientes.
 Table 1. Values of the significant correlations ($P \leq 0.01$) between initiators and independent variables.

Iniciador	Tamaño de banda (pb)	Supervivencia	Altura	Hojas por planta	Estomas por 0.04 mm ²	Ancho de ostíolo	Estomas por hoja	Estomas por planta	Área de ostíolo	Área de ostíolos por planta
5'-CCGCCGTGG-3'	570.00	0.52				0.51			-0.47	
	759.06					-0.50		0.53		
	832.21				-0.62	0.51	-0.62		0.53	0.65
	1368.65	0.58		0.54		-0.54		0.64	-0.50	
	1612.48			0.51				0.50		
5'-CCGGCCTCC-3'	1351.77			-0.51		0.76		-0.58	0.75	0.63
	1801.92	-0.78		-0.56	-0.50	0.70	-0.50	-0.66	0.70	0.50
	156.58	-0.60		-0.83		0.53		-0.60	0.55	
	467.70	-0.60		-0.83		0.53		-0.60	0.55	
	986.23		0.50	0.65				0.77		
5'-CGGCGTAGG-3'	1119.57					0.54			0.57	0.83
	1267.72		-0.80		0.56		0.56			
	1371.43					0.54			0.57	0.83
	2082.56					0.54			0.57	0.83
	840.78		-0.51							
5'-GCCGGGATGC-3'	1473.43		0.52							

Altura

La condición sombría es limitante para el crecimiento de los organismos autótrofos. Al respecto, Olusegun *et al.* (1994) consignan que 12 especies forestales bajo condiciones de menor intensidad luminosa reducen su crecimiento en altura, en tanto que *Betula papyrifera* Marsh., *B. alleghaniensis* Britton, *Ostrya virginiana* (Mill.) K. Koch, *Acer saccharum* Marsh. y *Quercus rubra* L. presentan respuestas variables bajo condiciones de sombra, en función de la especie (Walters *et al.*, 1996). Poorter *et al.* (2003) evaluaron 53 árboles tropicales con diferente tolerancia a la sombra, y determinaron que la altura estaba fuertemente correlacionada con la arquitectura de la planta, pues aquellas que destinan muchos recursos a la formación de tallos laterales tienden a ser de menor porte.

En general, se reconoce que la sombra reduce el crecimiento en la mayoría de las especies forestales. Así, Pagès *et al.* (2003) observaron que los efectos directos del sombreado son negativos para todas las taxa no tolerantes, pero la afectación en *Picea abies* (L.) Karst. y *Abies alba* Mill. fue superior que en *Fagus sylvatica* L. y *Acer pseudoplatanus* L.

Existen otros factores importantes en el crecimiento de un brinzal bajo el dosel; por ejemplo, la nutrición. Catovsky y Bazzaz (2002) documentan que la disponibilidad de nitrógeno influye en la regeneración de especies arbóreas de clima templado

Number of leaves

Seven amplification products coming from three initiators that significantly correlated with the number of leaves per individual were detected (Table 1). It would be expected that the resistant poles had a smaller amount of leaves, as this would diminish evapotranspiration. However, in susceptible poles less leaves were counted (666 leaves per plant), than in resistant poles (1,110 leaves per plant). This suggests that in resistant poles, the closure of stomata was effective.

In *Gossypium hirsutum* L., JESPR-178 loci revealed the highest association with natural leaf shedding (Abdurakhmonov *et al.*, 2005). In *Arabidopsis thaliana*, genes that regulate the expressivity of the adaxial meristem have been found (Grigg *et al.*, 2005); and in *Pinus sylvestris*, at least 42 genes take part in the morphogenesis of needles (Zelena and Sorochyns'kyi, 2005).

In a study carried out with two alpine herb species, *Podophyllum hexandrum* Royle (shadow tolerant) and *Rheum emodi* Wall. (light demanding), it was concluded that the difference in acclimation to low light intensity is a response to changes in foliar morphology and anatomy (Pandey, 2006).

a partir del banco de semillas del sotobosque. Kobe (2006) reconoce que el crecimiento de un brinjal es función de la luz, de la disponibilidad de agua en el suelo y del nitrógeno foliar.

Correlación de los productos de amplificación y la altura

Se obtuvieron cuatro bandas que correlacionaron significativamente ($P=0.01$) con la altura del brinjal (Cuadro 1). Esto coincide con lo citado en diversas investigaciones referentes a la heredabilidad de la altura en especies forestales (Clark *et al.*, 1998; Jindal, 1998; López *et al.*, 1999; Mohammad *et al.*, 2005; Palmer, 2006; St. Clair, 2000). Así, al menos 11 loci se asocian con dicha variable en *Glycine max* (L.) Merr. (Lee *et al.*, 1996); a diferencia de lo registrado para *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., planta en la cual la altura y la floración son controladas por un solo gen de dominancia parcial (Kearsey *et al.*, 2003).

Número de hojas

Se detectaron siete productos de amplificación, provenientes de tres iniciadores que correlacionaron de manera significativa con el número de hojas por individuo (Cuadro 1). Se esperaba que los brinzales resistentes tuvieran menor cantidad de hojas, ya que esto reduciría la evapotranspiración. Sin embargo, en los brinzales susceptibles se contabilizaron menos hojas (666 hojas por planta), que en los brinzales resistentes (1,110 hojas por planta). Lo anterior sugiere que en los brinzales resistentes el cierre de sus estomas fue eficaz.

En *Gossypium hirsutum* L., el loci JESPR-178 reveló la asociación más alta con el deshoje natural (Abdurakhmonov *et al.*, 2005). En *Arabidopsis thaliana*, se han identificado genes que regulan la expresión del meristemo adaxial (Grigg *et al.*, 2005); y en *Pinus sylvestris*, al menos 42 genes participan en la morfogénesis de las acículas (Zelena y Sorochynskyi, 2005).

En un estudio realizado con dos especies herbáceas alpinas, *Podophyllum hexandrum* Royle (tolerante a sombra) y *Rheum emodi* Wall. (demandante de luz), se concluyó que la diferencia en aclimatación a baja intensidad luminosa responde a los cambios en la morfología y anatomía foliares (Pandey, 2006).

Apertura estomatal

En todos los individuos resistentes se observaron los estomas cerrados y en los susceptibles estuvieron abiertos (Figura 2). La apertura estomatal está controlada por factores genéticos, además de los agentes ambientales. En *Gossypium hirsutum* y *G. barbadense* L., se identificaron rasgos cuantitativos de los loci (QTL) que inciden en la conductancia estomatal (Ulloa *et al.*, 2000).

Stomatal opening

In all resistant individuals were observed closed stomata and in the susceptible, they were open stomatal aperture is controlled by genetic factors, besides the environmental elements. In *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense* L., quantitative features of the (QTL) loci that influence stomatal conductance were identified (Ulloa *et al.*, 2000).

In *Arabidopsis thaliana* Gray (2005) and Liang *et al.* (2005) have documented the genes that codify the transcription factors involved in the closure of stomata; moreover, it has been proved that PHOT1 and PHOT2 phototropins are receptors of blue light in stomata and control stomatal aperture (Kinoshita *et al.*, 2001). Olusegun *et al.* (1994) describe differential stomatal responses among 12 forest species subjected to a lower light intensity.

The effects of water and light availability in the assimilation of carbon differ considerably between tolerant and intolerant species to shadow. The first have physiological and morphological plasticity to make light capture and carbon assimilation easier



Figura 2. Estomas de un brinjal resistente (izquierda) y otro susceptible (derecha) de *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. & Cham.

Figure 2. *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. & Cham. stomata of a resistant pole (left) and a susceptible (right) pole.

En *Arabidopsis thaliana* se documentan genes que codifican los factores de transcripción implicados en el cierre de estomas (Gray, 2005; Liang *et al.*, 2005); así mismo se ha demostrado que las fototropinas PHOT1 y PHOT2 son los receptores de luz azul en los estomas y regulan la apertura estomatal (Kinoshita *et al.*, 2001). Olusegun *et al.* (1994) consignan respuestas estomatales diferenciales entre 12 especies forestales sometidas a menor intensidad luminosa.

Los efectos de disponibilidad de agua y luz en la asimilación de carbono difieren considerablemente entre las especies tolerantes e intolerantes a la sombra. Las primeras tienen plasticidad fisiológica y morfológica para facilitar la captura de luz y la asimilación de carbono, bajo condiciones sombrías (Kubiske y Abrams, 1994). Además, en términos generales, la ausencia de cierre estomatal les permite una mejor adaptación a las condiciones de luz reducida durante la sequía (Kubiske *et al.*, 1996).

Supervivencia

La supervivencia a intensidad luminosa alta presentó el mayor número de correlaciones con otras variables morfológicas. En la literatura se cita que la resistencia a la intensidad luminosa alta es una variable compleja que está determinada por muchas de tipo morfológico, fisiológico y fenológico (Prasad, 1997). No obstante, las que tuvieron una correlación más grande (negativa) con la supervivencia fueron las relacionadas con el ancho y el área del ostiolo. En las plántulas de *Abies religiosa* se debe considerar a la apertura estomatal como un factor determinante para su supervivencia en condiciones de intensidad luminosa alta (Cuadro 2).

Cuadro 2. Valores de las correlaciones producto-momento de Pearson significativas ($P \leq 0.01$) entre variables independientes.
Table 2. Values of the significant ($P \leq 0.01$) Pearson product-moment correlations among independent variables.

	Supervivencia	Estomas / 0.04 mm ²	Estomas / hoja	Estomas / planta
Hojas / planta (#)	0.58			
Estomas / 0.04 mm ²	0.53			
Ancho del ostiolo (µm)	-0.93	-0.56	-0.56	-0.56
Estomas / hoja (#)	0.53			
Estomas / planta (#)	0.76			
Área del ostiolo (µm ²)	-0.86	-0.53	-0.53	-0.61
Área del ostiolo / planta (mm ²)	-0.73			

La situación umbría es limitante para la fotosíntesis. Por ejemplo, Kobe *et al.* (1995) evaluaron en campo la supervivencia de brinzales de 10 especies dominantes del género *Quercus*, y determinaron que dicha persistencia está fuertemente correlacionada con la tolerancia a la sombra. Mientras que, Walters *et al.* (1996) en condiciones de campo y bajo sombra consignan que para *Betula papyrifera*, *B. alleghaniensis*, *Ostrya virginiana*, *Acer saccharum* y *Quercus rubra* es función de la especie.

under shadow conditions (Kubiske and Abrams, 1994). In addition, in general terms, the absence of stomatal closure lets them have a better adaptation to reduced light conditions during (Kubiske *et al.*, 1996).

Survival

Survival to high light intensity showed the greatest number of correlations with other morphological variables. In literature is quoted that resistance to high light intensity is a complex variable that is determined by many others of morphological, physiological and phenological type (Prasad, 1997). Nevertheless, those with a greater correlation (negative) with survival were related with the width and area of the ostiole. In *Abies religiosa* seedlings, stomatal aperture must be taken as a major factor for their survival under high light conditions (Table 2).

The umbrophyllous situation is limiting to photosynthesis. For instance, Kobe *et al.* (1995) evaluated at the field the survival of poles of 10 dominant species of *Quercus*, and determined that such persistence is strongly correlated to shadow tolerance. Walters *et al.* (1996), on the other hand, stated that at the field and under shadow conditions, in *Betula papyrifera*, *B. alleghaniensis*, *Ostrya virginiana*, *Acer saccharum* *Quercus rubra* it depends on the species.

CONCLUSIONS

It was observed 25 % resistant poles of *Abies religiosa* to high light intensity. The assessment of survival variables, height of the individuals, number of leaves of poles and stomatal aperture suggest that they are morphological characteristics that are genetically controlled.

CONCLUSIONES

Se observaron 25 % de brinzales de *Abies religiosa* resistentes a la intensidad luminosa alta.

La evaluación de las variables supervivencia, altura de los individuos, número de hojas en brinzales y apertura estomatal sugieren que son características morfológicas que están controladas genéticamente.

Se descubrieron nueve iniciadores que revelaron bandas significativamente correlacionadas con las variables anteriores.

La supervivencia en condiciones de intensidad luminosa alta está determinada, principalmente, por la apertura estomatal. 🌿

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Comisión Nacional Forestal y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento otorgado a través del proyecto "Tecnologías para la restauración de los bosques en declinación del Distrito Federal" (CONAFOR-2002-C01-6181).

REFERENCIAS

- Abdurakhmonov, I. Y., A. A. Abdullaev, S. Saha, Z. T. Buriev, D. Arslanov, Z. Kuryazov, G. T. Mavlonov, S. M. Rizaeva, U. K. Reddy, J. N. Jenkins, A. Abdullaev and A. Abdukarimov. 2005. Simple sequence repeat marker associated with a natural leaf defoliation trait in tetraploid cotton. *J. Heredity* 96(6): 644-653.
- Álvarez-Moctezuma, J. G., I. Alá-Tejeda, M. T. Colinas-León and J. Sahagún-Castellanos. 2007. Interspecific differences in postharvest quality on Mexican Christmas trees. *Silvae Genetica* 56(2): 65-72.
- Arcade, A., P. Faivre-Rampant, L. E. Piques and D. Prat. 2002. Localisation of genomic regions controlling microdensitometric parameters of wood characteristics in hybrid larches. *Annals Forest Science* 59(5-6): 607-615.
- Archibald, J. M. and P. J. Keeling. 2002. Recycled plastids: a 'green revolution' in eukaryotic evolution. *Trends Genet* 18(11):577-584.
- Bernatzky, R. and D. L. Mulcahy. 1992. Marker-aided selection in a backcross breeding program for resistance to chestnut blight in American chestnut. *Can J For Res* 22(7): 1031-1035.
- Bojorges S., J. A. 1990. Índice del sitio para oyamel (*Abies religiosa*) en Zoquigapan. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo. de Méx. México. 57 p.
- Brunner, A. M., J. Li, S. P. Difazio, O. Shevchenko, B. E. Montgomery, R. Mohamed, H. Wei, C. Ma, A. A. Elias, K. VanWormer and S. H. Strauss. 2007. Genetic containment of forest plantations. *Tree Genetics and Genomes* 3(2):75-100.
- Burdon, R. D. and W. J. Libby. 2006. Genetically Modified Forests: From Stone Age to Modern Biotechnology. Forest History Society, Durham, N.C. USA. 79 p.
- Camacho C., A. 1996. Germinación de *Abies religiosa* en condiciones naturales. Primera Reunión Científica Nacional. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Pecuarias y Forestales. México, D.F. México, pp. 28.
- Carlson, J. E., Y. P. Hong, G. R. Brown and J. C. Glaubitz. 1994. Fish, DNA amplification markers & Conifers. In: Greshoff, P. M. (Ed.). *Plant Genome Analysis*. Cap. 7. Boca Raton, FL, USA. pp. 69-82.

Nine initiators that revealed significantly correlated bands with the previous variables were found.

Survival under high light conditions is determined, majorly, by stomatal aperture. 🌿

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to the Comisión Nacional Forestal and to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for having sponsored the project entitled "Tecnologías para la restauración de los bosques en declinación del Distrito Federal" (CONAFOR-2002-C01-6181).

- Catovsky, S. and F. A. Bazzaz. 2002. Nitrogen availability influences regeneration of temperate tree species in the understory seedling bank. *Ecological Applications* 12(4): 1056-1070.
- Chacalo, A., A. Aldama and J. Grabinsky. 1994. Street tree inventory in Mexico City. *Journal of Arboriculture* 20(4): 222-226.
- Clark, D., T. Rollinson, B. McIntosh, P. Hill-Tout, I. Forshaw, M. Gale, C. Macdonald, T. Cooper, O. Adebawale, A. Bosanquet and G. Wardell. 1998. Forest Research 50 years of tree breeding Field progeny, *Sitka spruce*. Forest Commission. London, UK. www.forestry.gov.uk/website/forestresearchnsf/byunique/infid5wrf8d?Open&PrintFriendly=y (28 de julio de 2006).
- Coomes, D. A. and P. J. Grubb. 2000. Impacts of root competition in forests and woodlands: a theoretical framework and review of experiments. *Ecological Monographs* 70 (2): 171-207.
- Davies, S. J. 2001. Tree mortality and growth in 11 sympatric *Macaranga* species in Borneo. *Ecology* 82(4): 920-932.
- Devey, M. E., A. Delfino-Mix, B. B. Kinloch and D. B. Neale. 1995. Random amplified polymorphic DNA markers tightly linked to a gene for resistance to white pine blister rust in sugar pine. *Proc Natl. Acad. Sc. USA* 92: 2066-2077.
- Elstrand, N. C. 2006. Genetic engineering and pollen flow. *Agricultural Biotechnology in California Series*, Publ. 8182. University of California. Davis, CA. USA. 4 p.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2004. Preliminary review of biotechnology in forestry, including genetic modification. Forest Genetic Resources Working Paper FGR/59E, Forest Resources Development Service, Forest Resources Division. Rome, Italy. <http://www.fao.org/docrep/008/ae574e/ae574e00.htm> (24 de agosto 2011).
- Fillatti, J. J., J. Selmer, B. McCown, B. Haissig and L. Comai. 1987. *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Mol Gen Genet* 206(2):192-199.

- Franck, F., U. Sperling, G. Frick, B. Pochert, B. Cleve, K. Apel and G. A. Armstrong. 2000. Regulation of etioplast pigment-protein complexes, inner membrane architecture, & proto-chlorophyllide a chemical heterogeneity by light-dependent NADPH: proto-chlorophyllide oxidoreductases A & B. *Plant Physiol.* 124: 1678-1696.
- Galindo J., L. 1996. Regeneración natural de *Abies religiosa* y sobrevivencia de plántulas. Primera Reunión Científica Nacional. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Pecuarias y Forestales. México, D.F. México, pp. 35.
- Gómez G., R. 2003. Estado del conocimiento de *Abies religiosa* (HBK.) Schltdl. et Cham. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo. de Méx. México. 142 p.
- González G., M. J. 1985. Comportamiento de la germinación y crecimiento inicial de *Abies religiosa* (HBK.) Schltdl. et Cham. en diferentes aperturas de dosel, preparaciones de suelo y variantes de siembra en Zoquiapan, Méx. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo. de Méx. México. 82 p.
- Gould, S. B., R. F. Waller and G. I. McFadden. 2008. Plastid Evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:491-517.
- Grattapaglia, D., C. Plomion, M. Kirst and R. R. Sederoff. 2009. Genomics of growth traits in forest trees. *Current Opinion in Plant Biology* 12(2):148-156.
- Grattapaglia, D., V. J. Ribeiro and G. D. S. P. Rezende. 2004. Retrospective selection of elite parent trees using paternity testing with microsatellite markers: an alternative short term breeding tactic for *Eucalyptus*. *Theor. Appl. Genet.* 109(1): 192-199.
- Gray, J. E. 2005. Guard cells: transcription factors regulate stomatal movements. *Curr. Biol.* 15(15):593-595.
- Grigg, S. P., C. Canales, A. Hay and M. Tsiatis. 2005. SERRATE coordinates shoot meristem function & leaf axial patterning in *Arabidopsis*. *Nature* 437:1022-1026.
- Groover, A. T. 2005. What genes make a tree a tree? *Trends Plant Sci* 10(5):210-214.
- Harry D. E. and S. H. Strauss. 2010. Biotechnology and Genetic Engineering in Forest Trees. Department of Forest Ecosystems and Society. Oregon State University. Corvallis, Oregon. <http://agribiotech.info/details/Strauss%20and%20Harry%20Draft%20Final%2002%20print.pdf>. (24 de agosto 2011).
- Jindal, S. K. 1998. Combined selection for tree height improvement in *Prosopis cineraria*. Proceedings of a conference held at the Central Arid Zone Research Institute, Jodhpur, India. In: Tewari, J. C., N. M. Pasiecznik, L. N. Harsh and P. J. C. Harris (Ed.). *The Prosopis Society of India & the Henry Doubleday Research Association*. University of Jodhpur. Jodhpur, Jodhpur, India. pp. 54-57.
- Kearsey, M. J.; H. S. Pooni and N. H. Syed. 2003. Genetics of quantitative traits in *Arabidopsis thaliana*. *Heredity* 91: 456-464.
- Kinoshita, T., M. D. Suetsugu, N. T. Kagawa, M. Wada and K. Shimazaki. 2001. Phot1 & phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414: 656-60.
- Kirst, M., A. A. Myburg and R. R. Sederoff. 2004. Microarrays & transcript level QTLs identify candidate genes for the quantitative traits of wood quality & growth in *Eucalyptus*. In: *Plant & Animal Genomes XII Conference*. San Diego, CA. USA. 611p.
- Kobe, R. K. 2006. Sapling growth as a function of light and landscape-level variation in soil water and foliar nitrogen in northern Michigan. *Oecologia* 147(1): 119-133.
- Kobe, R. K., S. W. Pacala, J. A. Silander and C. D. Canham. 1995. Juvenile tree survivorship as a component of shade tolerance. *Ecological Applications* 5 (2): 517-535.
- Koike, F. 2001. Plant traits as predictors of woody species dominance in climax forest communities. *Journal of Ecology* 12(3):327-336.
- Kondo, T., K. Terada, E. Hayashi, N. Kuramoto, M. Okamura and H. Kawasaki. 2000. RAPD markers linked to a gene for resistance to pine needle gall midge in Japanese black pine (*Pinus thunbergii*). *Theor. Appl. Genet.* 100:391-395.
- Kubiske, M. E., M. D. Abrams and S. A. Mostoller. 1996. Stomatal and nonstomatal limitations of photosynthesis in relation to the drought and shade tolerance of tree species in open and understory environments. *Trees-Structure and Function*. 11 (2): 76-82.
- Kubiske, M. E. and M. D. Abrams. 1994. Ecophysiological analysis of temperate woody species on contrasting sites during wet and dry years. *Oecologia*. 98(3-4):303-312.
- Lee, S. H., M. A. Bailey, M. A. R. Mian, T. E. Carter, D. A. Ashley, R. S. Hussey, W. A. Parrott and H. R. Boerma. 1996. Molecular Markers Associated with Soybean Plant Height, Lodging, & Maturity across Locations. *Crop Sci.* 36(3):728-735.
- Lerceteau, E., C. Plomion and B. Anderson. 1999. Quantitative trait loci (QTL) for economically important traits in *Pinus sylvestris*. *Forest Biotechnology*. 1 (1): 38-41.
- Liang, Y. K., C. Dubos, I. C. Dodd, G. H. Holroyd, A. M. Hetherington and M. M. Campbell. 2005. AtMYB61, an R2R3-MYB transcription factor controlling stomatal aperture in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* 15(13): 1201-1206.
- López, A., J. J. Vargas H.; C. Ramírez H. y J. López U. 1999. Variación intraespecífica en el patrón de crecimiento del brote terminal de *Pinus greggii* Engelm. *Revista Chapingo serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 5(2):133-140.
- Markussen, T., A. Tusch, B. Karlsson, L. Wilhelmsson, R. Stephan and M. Fladung. 1999. Identification of QTL markers for wood density of *Picea*. *Forest Biotechnology*. 1 (1): 29-31.
- Marques C., M., J. Vasquez-Kool, V. J. Carocha, J. G. Ferreira, D. M. O'Malley, B. H. Liu and R. Sederoff. 1999. Genetic dissection of vegetative propagation traits in *Eucalyptus tereticornis* & *E. globulus*. *Theor. Appl. Genet.* 99: 936-946.
- Martínez V., H. y N. Ochoa S. 2010. Avances de la Genética Forestal en México. Tesis de licenciatura. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo. de Méx. México. 238 p.
- May E., N. G. 2001. Dinámica de la regeneración de *Abies religiosa* (HBK.) Schltdl. et Cham. y *Pinus hartwegii* Lindl., en la Estación Forestal Experimental Zoquiapan, Estado de México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo. de Méx. México. 78 p.
- Mechlenbacher, S. A., R. N. Brown, J. W. Davis, H. Chen, N. V. Bassil, D. C. Smith and T. L. Kubisiak. 2004. RAPD markers linked to eastern filbert blight resistance in *Corylus avellana*. *Theor. Appl. Genet.* 108: 651-656.
- Mohammad, N., P. Raharjo, and E. W. Kusdiandra. 2005. Early genetic information of *Shorea leprosula* Miq. half-sib progeny test in Nanga Nuak Pt. Sari Bumi Kusuma, Central Kalimantan. Faculty of Forestry, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia. www.apafri.org/8thdip/Session%204/Session%204%20Mainem.doc (27 de julio de 2006).
- Moran, G. F., L. Emebiri, K. Groom, J. Owen, M. Byne and E. Williams. 1999. QTL for growth in *Eucalyptus nitens*. *Forest Biotechnology*. In: *Memory Conference*. Oxford University. Oxford, UK. pp. 44-48. (11-16 de julio de 1999).
- Niinemets, Ü. and F. Valladares. 2006. Tolerance to shade, drought, and water logging of temperate northern hemisphere trees and shrubs. *Ecological Monographs*. 76(4):521-547.
- Olusegun, O. O., J. E. Ash, M. S. Hopkins and A. W. Graham. 1994. Influence of Seed Size and Seedling Ecological Attributes on Shade-Tolerance of Rain-Forest Tree Species in Northern Queensland. *Journal of Ecology* 82(1): 149-162.
- Pagès, J.-P., G. Pache, D. Joud, N. Magnan and R. Michalet. 2003. Direct and indirect effects of shade on four forest tree seedlings in the French Alps. *Ecology* 84(10): 2741-2750.
- Palmer, A. T. 2006. Heritability. Lakehead University. <http://flash.lakeheadu.ca/~atpalmer/Miscellaneous/heritability.doc>. (27 de julio de 2006).
- Pandey, S. 2006. Morpho-anatomical and physiological leaf traits of two alpine herbs, *Podophyllum hexandrum* and *Rheum emodi* in the Western Himalaya under different irradiances. *Photosynthetica* 44(1) 11-16.
- Pilate, G., E. Guiney, K. Holt, M. Petit-Conil, C. Lapierre, J.-C., Leplé, B. Pollet, I. Mila, E. A. Webster, H.G. Marstorp, D. W. Hopkins, L. Jouanin, W. Boerjan, W. Schuch, D. Cornu and C. Halpin. 2002. Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. *Nat Biotechnol* 20(6):607-612.
- Poorter, L., F. Bongers, F. J. Sterck, and H. Wöll. 2003. Architecture of 53 rain forest tree species differing in adult stature and shade tolerance. *Ecology* 84:602-608.

- Prasad, M. N. V. 1997. Plant ecophysiology. John Wiley & Sons Inc. New York, NY, USA. 552 p.
- Prat, D., A. Archade, P. Faivre-Rampant and L. E. Paques. 1999. QTL detection in a factorial mating design: analysis of wood microdensitometry characters in larch. Forest Biotechnology. Oxford University. Oxford, UK. pp. 95-99. (24 de agosto de 2006).
- Ríos O., F. R. 2010. Revisión bibliográfica sobre diversos trabajos realizados con transgénicos forestales. Tesis de licenciatura. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo. de Méx. México. 88 p.
- Rodríguez-Calcerrada, J., J. A. Pardos, L. Gil and I. Aranda. 2006. Acclimation to light in seedlings of *Quercus petraea* (Mattuschka) Liebl. and *Quercus pyrenaica* Willd. planted along a forest-edge gradient. Trees-Structure and Function. 21 (1): 45-54.
- Ruzin, S. E. 1999. Plant Microtechnique and Microscopy. Oxford University Press. New York, NY, USA. 334 p.
- Rzedowski, J. 2006. Vegetación de México. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. <http://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/librosDig/pdf/VegetacionMxCont.pdf> (24 de agosto de 2006).
- Sakurai, I., M. Hagio, Z. Gombos, T. Tyystjärvi, V. Paakkari, E. M. Aro and H. Wada. 2003. Requirement of phosphatidylglycerol for maintenance of photosynthetic machinery. Plant Physiol. 133(13):76-84.
- Schouten, H. J., F. A. Krens and E. Jacobsen. 2006. Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants: international regulations for genetically modified organisms should be altered to exempt cisgenesis. EMBO Rep 7(8):750-753.
- Smouse, P. E., J. J. Robledo-Arnuncio and S. C. González-Martínez. 2007. Implications of natural propagule flow for containment of genetically modified forest trees. Tree Genetics & Genomes 3(2): 141-152.
- Sperling, U., V. Cleve, G. Frick, K. Apel and G. A. Armstrong. 1997. Over expression of light-dependent PORA or PORB in plants depleted of endogenous POR by far-red light enhances seedling survival in white light & protects against photooxidative damage. The Plant J. 12(3): 649-658.
- St. Clair, B. 2000. Genetic variation in height growth of Willamette Valley Ponderosa Pine: results from four-year-old trees in the ODF Schroeder seed orchard. USDA Forest Service Pacific Northwest Research Station. www.westernforestry.org/wvppca/geneticvariation.htm. (27 de julio de 2006).
- Storme, V., J. Zhang, M. T. Cervera, M. Steenackers, B. Ivens, S. Neyrinck, K. Schamp, B. Michels, H. Zhang, M. Van-Montagu and W. Boerjan. 1999. Genetic mapping of poplar. Forest Biotechnology. In: Memory Conference. Oxford University. Oxford, UK. pp. 83-85. www.iufro.org/download/file/5356/4591/20406-oxford99.pdf (24 de agosto de 2006).
- Su, Q., G. Frick, G. A. Armstrong and K. Apel. 2001. POR C of *Arabidopsis thaliana*: A third light- & NADPH-dependent protochlorophyllide oxidoreductase that is differentially regulated by light. Plant Mol. Biol. 47(6): 805-813.
- Su, X. H., X. H. Zhang, J. H. Li, Q. W. Zhang and X. W. Zeng. 2000. Identification of RAPD molecular markers for resistance against *Alternaria alternata* in poplar. Scientia Silvae Sinicae 36: 73-76.
- Tabor, G. M., T. L. Kubisiak, N. B. Klopfenstein, R. B. Hall and H. S. McNabb. 2000. Bulk segregant analysis identifies molecular markers linked to *Melampsora medusae* resistance in *Populus deltoides*. Phytopathology 90(9): 1039-1042.
- Tauer, C. G., S. W. Hallgren and B. Martin. 1992. Using marker-aided selection to improve tree growth response to abiotic stress. Can J For Res 22(7): 1018-1030.
- Taylor, G., S. Bunn, R. Ferris and H. D. Bradshaw. 1999. Linking physiological traits to molecular markers: putative QTL for leaf growth in poplar. Forest Biotechnology. Universidad de Oxford. 1 (1): 23-27.
- Tuskan, G. A., S. DiFazio, S. Jansson, J. Bohlmann, I. Grigoriev, U. Hellsten, N. Putnam, S. Ralph, S. Rombauts, A. Salamov, J. Schein, L. Sterck, A. Aerts, R. R. Bhallerao, R. P. Bhallerao, D. Blaudez, W. Boerjan, A. Brun, A. Brunner, V. Busov, M. Campbell, J. Carlson, M. Chalot, J. Chapman, G.-L. Chen, D. Cooper, P. M. Coutinho, J. Couturier, S. Covert, Q. Cronk, R. Cunningham, J. Davis, S. Degroove, A. Déjardin, C. dePamphilis, J. Detter, B. Dirks, I. Dubchak, S. Duplessis, J. Ehling, B. Ellis, K. Gendler, D. Goodstein, M. Gribskov, J. Grimwood, A. Groover, L. Gunter, B. Hamberger, B. Heinze, Y. Helariutta, B. Henrissat, D. Holligan, R. Holt, W. Huang, N. Islam-Faridi, S. Jones, M. Jones-Rhoades, R. Jorgensen, C. Joshi, J. Kangasjärvi, J. Karlsson, C. Kelleher, R. Kirkpatrick, M. Kirst, A. Kohler, U. Kalluri, F. Larimer, J. Leebens-Mack, J.-C. Leplé, P. Locascio, Y. Lou, S. Lucas, F. Martin, B. Montanini, C. Napoli, D. R. Nelson, C. Nelson, K. Nieminen, O. Nilsson, V. Pereda, G. Peter, R. Philippe, G. Pilate, A. Poliakov, J. Razumovskaya, P. Richardson, C. Rinaldi, K. Ritland, P. Rouzé, D. Ryabov, J. Schmutz, J. Schrader, B. Segerman, H. Shin, A. Siddiqui, F. Sterky, A. Terry, C.-J. Tsai, E. Uberbacher, P. Unneberg, J. Vahala, K. Wall, S. Wessler, G. Yang, T. Yin, C. Douglas, M. Marra, G. Sandberg, Y. Van de Peer and D. Rokhsar. 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). Science 313(5793): 1596-1604.
- Ulloa, M., R. G. Cantrell, R. G. Percy, E. Zeiger and Z. Lu. 2000. Breeding & genetics QTL analysis of stomatal conductance & relationship to lint yield in an interspecific cotton. The Journal of Cotton Science 4:10-18.
- Valenzuela H., T. 2001. Estimación del secuestro de carbono en bosques naturales de *Abies religiosa*. Tesis. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo. de Méx. México. 127 p.
- Walters, M. B., and P. B. Reich. 1996. Are Shade Tolerance, Survival, and Growth Linked? Low light and Nitrogen Effects on Hardwood Seedlings. Ecology 77(3): 841-853.
- Walters, M. B. and P. B. Reich. 2000. Seed size, nitrogen supply, and growth rate affect tree seedling survival in deep shade. Ecology 81(7):1887-1901.
- Zelena, L. B. and B. V. Sorochyn's'kyi. 2005. Characteristics of gene expression in morphologically abnormal needles of Scots pine. Ukr. Biokhim Zh. 77(1):78-83.



Carlos Mallén, (2010).