

From Forest Nursery Notes, Summer 2011

**57. Altitudinal genetic variation among *Pinus patula* populations from Oaxaca, Mexico, in growth chambers simulating global warming temperatures.** Saenz-Romero, C., Beaulieu, J., and Rehfeldt, G. E. *Agrociencia* 45:399-411. 2011.

# ALTITUDINAL GENETIC VARIATION AMONG *Pinus patula* POPULATIONS FROM OAXACA, MÉXICO, IN GROWTH CHAMBERS SIMULATING GLOBAL WARMING TEMPERATURES

## VARIACIÓN GENÉTICA ALTITUDINAL ENTRE POBLACIONES DE *Pinus patula* DE OAXACA, MÉXICO, EN CÁMARAS DE CRECIMIENTO SIMULANDO TEMPERATURAS DE CALENTAMIENTO GLOBAL

Cuauhtémoc Sáenz-Romero<sup>1\*</sup>, Jean Beaulieu<sup>2</sup>, Gerald E. Rehfeldt<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (IIAF-UMSNH). Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro. Tarímbaro, Michoacán 58880, México. (csaenzromero@gmail.com). <sup>2</sup>Centre canadien sur la fibre de bois, Service canadien des forêts, Ressources naturelles, Canada. 1055 rue du P.E.P.S., CP 10380 Succ. Sainte-Foy, Québec QC, G1V 4C7, Canada. (jean.beaulieu@rncan-nrcan.gc.ca). <sup>3</sup>Forestry Sciences Laboratory, Rocky Mountain Research Station, USDA Forest Service, 1221 S. Main, Moscow, Idaho 83843, USA. (jrehfeldt@gmail.com).

### ABSTRACT

Climatic change will decouple the matching between genotypes and environments. Studying the patterning of genetic variation among pine populations along altitudinal gradients under simulated climatic change temperatures, would provide insights about how to realign the present populations to future environments. Fourteen *Pinus patula* populations from the forests of the Native Indian Community of Ixtlán de Juárez, state of Oaxaca, México, were collected in January-March 2005 and 2006 along an altitudinal gradient (2400 m to 3050 m, one population every 50 m of altitudinal difference). Seedlings were grown in growth chambers at the Laurentides Forestry Center, Quebec city, Canada, under two temperature treatments aiming to simulate: contemporary temperature (average 17 °C) and a future global warming scenario (average 21 °C). Seedlings were evaluated after inducing a second growing season (between 8 and 12 months of age). Populations differed significantly ( $p \leq 0.001$ ) for seedling height and aerial dry weight, and exhibited a significant ( $p \leq 0.02$ ) although weak altitudinal clinal pattern, with populations from lower altitudes having on average taller and heavier seedlings than populations from higher altitudes ( $r^2 = 0.064$  and  $r^2 = 0.094$ ).

**Key words:** altitudinal gradients, altitudinal seed zoning, assisted migration, climate change, genetic differentiation.

### RESUMEN

El cambio climático desfasará el acoplamiento entre genotipos y ambientes. El estudio de los patrones de variación genética entre las poblaciones de pinos a lo largo de gradientes altitudinales, bajo temperaturas simuladas de cambio climático, daría indicios sobre cómo realinear las poblaciones actuales a ambientes futuros. Se recolectaron 14 poblaciones de *Pinus patula* de los bosques de la Comunidad indígena de Ixtlán de Juárez, estado de Oaxaca, México, en enero-marzo de 2005 y 2006, a lo largo de un gradiente altitudinal (2400 m hasta 3050 m, una población cada 50 m de diferencia de altitud). Las plántulas fueron cultivadas en cámaras de crecimiento en el Laurentides Forestry Center (Centro Forestal de Laurentides), Quebec, Canadá, bajo dos tratamientos de temperatura con el objetivo de simular: la temperatura actual (promedio 17 °C) y un escenario futuro de calentamiento global (promedio 21 °C). Las plántulas fueron evaluadas después de la inducción de una segunda temporada de crecimiento (entre 8 y 12 meses de edad). Las poblaciones difirieron significativamente ( $p \leq 0.001$ ) en la altura de las plántulas y el peso seco aéreo, y mostraron un significativo ( $p \leq 0.02$ ) aunque débil patrón clinal de altitud, con poblaciones de altitudes menores registrando en promedio plántulas más altas y de mayor peso que aquellas originadas a mayor altitud ( $r^2 = 0.064$  y  $r^2 = 0.094$ ).

**Palabras clave:** gradientes altitudinales, zonificación altitudinal de semillas, migración asistida, cambio climático, diferenciación genética.

\* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: October, 2010. Approved: April, 2011.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 45: 399-411. 2011.

## INTRODUCTION

*Pinus patula* is one of the most important pine species for intensive commercial plantations worldwide due to its exceptional fast growth rate, good stem form and wood characteristics for cellulose products (Dvorak *et al.*, 2000). Indeed, over 1 million ha had been planted by year 1990 in southern and western Africa and in western South America (Birks and Barnes, 1990). These included 300 000 ha of *P. patula* plantations under operational management in South Africa (Dvorak, 2003), 100,000 ha in Swaziland and 50 000 in Colombia (Dvorak, 1997). Despite its high potential for intensively managed plantations in México (Velázquez-Martínez *et al.*, 2004; Luna-Rodríguez *et al.*, 2005), where it is endemic (Perry, 1991; Farjon and Styles, 1997), it has not been extensively planted in México so far (Velázquez-Martínez *et al.*, 2004): there are approximately 4230 ha planted in this country (Aurelio Fierros, 2010, personal communication<sup>4</sup>).

Due to global warming, in 2090 the annual average temperature would be increased by 3.7 °C in México (Saenz-Romero *et al.*, 2010). Depending on the scenario, the extent of suitable habitat for *P. patula* could shrink from 3 % to 39 % by year 2050 (van Zonneveld *et al.*, 2009). Because tree species are made of a collection of populations genetically adapted to local climate, these populations could come under such stress that either adaptation to the new conditions or migration might be required to avoid extirpation (Rehfeldt *et al.*, 2006; St Clair and Howe, 2007; Aitken *et al.*, 2008). Forest tree species might need human help to cope with changes that exceed their capacity of adaptation. Assisted migration is a strategy designed to migrate a plant only fast enough to track shifting habitats, and a series of moves will be required to keep the plant within its shifting natural range and in pace with a changing climate (Keel, 2007).

There are indications that *P. patula* populations from higher elevations are less productive than populations from lower altitudes, although those are results from studies where provenances of different altitudes came from different latitudes and

## INTRODUCCIÓN

*Pinus patula* es una de las especies de pino más importantes para las plantaciones comerciales intensivas en el mundo debido a su tasa de crecimiento excepcionalmente rápido, buena forma de tronco y características favorables de la madera para los productos de celulosa (Dvorak *et al.*, 2000). De hecho, se sembraron más de 1 millón ha en 1990 en el sur y oeste de África y en el oeste de América del Sur (Birks y Barnes, 1990). De éstas, 300 000 ha se plantaron con *P. patula* en el sur de África (Dvorak, 2003), 100 000 ha en Swazilandia y 50 000 en Colombia (Dvorak, 1997). A pesar de su alto potencial para cultivo intensivo en México (Velázquez-Martínez *et al.*, 2004; Luna-Rodríguez *et al.*, 2005), donde es endémica (Perry, 1991; Farjon y Styles, 1997), esta especie no ha sido ampliamente cultivada en este país (Velázquez-Martínez *et al.*, 2004). Hay aproximadamente 4230 ha plantadas con *P. patula* en México (Aurelio Fierros, 2010; comunicación personal<sup>4</sup>).

Debido al calentamiento global, en 2090 la temperatura media anual aumentaría en 3.7 °C en México (Sáenz-Romero *et al.*, 2010). Dependiendo del escenario, la extensión del hábitat adecuado para *P. patula* podría reducirse de 3 % a 39 % para el año 2050 (van Zonneveld *et al.*, 2009). Dado que las especies de árboles se componen de una serie de poblaciones genéticamente adaptadas al clima local, éstas podrían verse sometidas a tal estrés que sería necesaria ya sea la adaptación a las nuevas condiciones o la migración, para evitar su extirpación (Rehfeldt *et al.*, 2006; St Clair y Howe, 2007; Aitken *et al.*, 2008). Es posible que las especies forestales de árboles necesiten ayuda humana para enfrentar los cambios que exceden a su capacidad de adaptación. La migración asistida es una estrategia diseñada para migrar una planta lo suficientemente rápido como para ajustarse a los hábitats cambiantes, y se requerirá de una serie de pasos para mantener la planta dentro de su rango natural de cambios, siguiendo el ritmo del cambio climático (Keel, 2007).

Hay indicios de que las poblaciones de *P. patula* de los sitios más elevados son menos productivas que las poblaciones de menores altitudes, aunque éstos son resultados de estudios en que las altitudes registradas

<sup>4</sup>Gerencia de plantaciones Forestales Comerciales, Comisión Nacional Forestal, Guadalajara, Jalisco, México. Información updated May 18<sup>th</sup>, 2010.

longitudes (Salazar-García *et al.*, 1999; Dvorak *et al.*, 2000; Velázquez-Martínez *et al.*, 2004). Thus, there is a need to study the genetic differentiation among populations along altitudinal gradients, without having the confounded effect of distant latitudes and longitudes to confirm the trend reported. Studying population variation along altitudinal gradients presents an opportunity to: 1) understand the microevolutionary patterning of genetic differentiation among populations for quantitative traits whose variation is indicative of environmental adaptations; 2) use such knowledge to develop guidelines to transfer seed sources adapted to current temperatures and for assisting migration due to predicted temperature increments (Saenz-Romero *et al.*, 2006).

Studies in growth chambers provide an opportunity to simulate temperature conditions expected in the future, and, therefore, provide a better understanding of the performance of genotypes or provenances (Sonesson and Eriksson, 2000). Due to the lack of research on *P. patula* in growth chambers, the present study is as a first step to on such approach, testing temperatures that simulate those on current climate and predicted by General Circulation Models (GCM) (Christensen *et al.*, 2007; Saenz-Romero *et al.*, 2010) following global warming. Thus, the objectives of the present study were to determine whether: 1) there is genetic differentiation for seedling growth traits among populations located along an altitudinal gradient in northern Oaxaca, México; 2) such differentiation can be explained by this gradient; 3) differential growth occurs in response to temperatures that simulate (in growth chambers) present and future conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### Seed collection and plant production

Wind-pollinated cones were collected from 11 randomly selected trees from each of 14 *P. patula* natural stands distributed along an altitudinal transect, from 2400 m (17° 22.353' N, 96° 28.971' W) to 3050 m (17° 22.669' N, 96° 26.920' W), in the forests of the Native Indian Community of Ixtlán de Juárez, state of Oaxaca, México. Sampled populations were separated by an altitudinal interval of approximately 50 m, in order to have an intensive altitudinal sampling, but avoiding overlapped sampling of the populations. The group of trees from which the cones were

procedían de diferentes latitudes y longitudes (Salazar-García *et al.*, 1999; Dvorak *et al.*, 2000; Velázquez-Martínez *et al.*, 2004). Por tanto, es necesario estudiar la diferenciación genética entre las poblaciones a lo largo de gradientes altitudinales, sin tener el efecto confundido de latitudes y longitudes lejanas para confirmar la tendencia registrada. El estudio de las variaciones de la población a lo largo de gradientes altitudinales permite: 1) entender los patrones microevolutivos de diferenciación genética entre poblaciones, para los rasgos cuantitativos cuya variación es indicativa de adaptaciones ambientales; 2) utilizar esos conocimientos para desarrollar directrices para la transferencia de fuentes de semillas adaptadas a las temperaturas actuales y ayudar a la migración debido a los aumentos de temperatura pronosticados (Saenz-Romero *et al.*, 2006).

Los estudios en cámaras de crecimiento proporcionan la oportunidad de simular las condiciones de temperatura que se esperan en el futuro y, por tanto, dar una mejor comprensión de la evolución de los genotipos o procedencias (Sonesson y Eriksson, 2000). Debido a la falta de estudios sobre *P. patula* en cámaras de crecimiento, el presente estudio es un primer paso para tal enfoque, probando temperaturas que simulan las del clima actual y las predichas por Modelos de Circulación General (MCG) (Christensen *et al.*, 2007; Saenz-Romero *et al.*, 2010), debido al calentamiento global. Así, los objetivos del presente estudio fueron determinar si: 1) existe una diferenciación genética en las características de crecimiento de las plántulas en las poblaciones situadas a lo largo de un gradiente altitudinal en el norte de Oaxaca, México; 2) esta diferenciación se explica por este gradiente; 3) el crecimiento diferencial se produce en respuesta a las temperaturas que simulan (en cámaras de crecimiento) las condiciones presentes y futuras.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección de semillas y la producción de plantas

Los conos polinizados por el viento fueron recogidos de 11 árboles seleccionados al azar de cada uno de los 14 rodales naturales de *P. patula* distribuidos a lo largo de un transecto altitudinal desde 2400 m (17° 22.353' N, 96° 28.971' O) a 3050 m (17° 22.669' N, 96° 26.920' O), en los bosques de la Comunidad indígena de Ixtlán de Juárez, estado de Oaxaca, México. Las poblaciones muestreadas fueron separadas por un intervalo altitudinal

collected in each stand are hereafter called population while the location of a population is called provenance.

Seeds were extracted manually and an evenly number of seeds per mother tree were mixed by provenances. Seed was washed with running tap water for 48 h, stratified for 17 d at 4 °C and sowed on 11-12 April, 2007, in 320 cm<sup>3</sup> containers (IPL Rigi-Pot® 15-320; Saint-Damien, Quebec, Canada) filled with a mix of Fafard® peat-moss and Holiday®'s vermiculite (3:1 v:v). Two sound seeds were placed in each cell of the container and were then covered with a 0.5 cm layer of inert silicate, to avoid washing out of the seed by the irrigation. After germination, surplus seedlings were eliminated or transplanted in empty cells to achieve one seedling per container. Transplanting was conducted at a very early age (3 to 4 d after germination). The number of transplanted seedlings was less than 10 % of the total number of seedlings raised.

Seedlings were arranged in a randomized complete block design with 18 blocks, within which each of the 14 provenances were represented by a three-seedling row plot. Blocks of seedlings were distributed side by side and to prevent edge effects, blocks were accommodated in sets, such as seedlings of the border of the trays always had as neighbour side-by-side either seedlings of the same block or from other block, or surplus seedlings placed in the same type of containers to serve as protection rows.

Seedlings were raised according to the following schedule: 1) four months of growth in a greenhouse at the Laurentian Forestry Center, Canadian Forest Service, Natural Resources Canada, Quebec, Canada; 24 °C during the day and at 18 to 20 °C during night; cycles of 16 h of light and 8 h of darkness; watering and fertilization as needed (see details below); 2) transfer to an outdoors shadehouse in August 2007 (4-month-old), to promote bud setting, maintaining the same experimental design; 3) transfer to a cold room in October, 2007 (6-month-old), to satisfy chilling requirements at 2 °C in complete darkness for 6 weeks; 4) transfer to a greenhouse for four weeks, one week at 7 °C, one week at 10 °C and two weeks at 16 °C for acclimation.

### Growth chambers experiment

Seedlings (8-month-old) were transferred to growth chambers for four months (Environmental Growth Chambers GC-15; Chagrin Falls, Ohio, USA) to simulate the first part of the growing season under present temperatures in México (average 17 °C; cycles of 20 °C day and 14 °C night) and future predicted global warming temperature (average 21 °C; cycles of 24 °C day and 18 °C night).

Temperature regimes for the growth chambers attempted to simulate the average monthly temperatures that occurs between March and April (time when the elongation of the first shoot

de unos 50 m, con el fin de tener un muestreo intensivo de altitud, pero evitando el muestreo superpuesto de las poblaciones. El grupo de árboles de los que se recogieron los conos en cada rodal se denominarán de ahora en adelante población, mientras que la ubicación de una población será la procedencia.

Las semillas se extrajeron manualmente y un mismo un número de semillas por árbol se mezcló por procedencias. Las semillas se lavaron con agua de la llave durante 48 h, fueron estratificadas durante 17 d a 4 °C y sembradas el 11-12 de abril de 2007, en contenedores de 320 cm<sup>3</sup> (IPL Rigi-Pot® 15-320, Saint-Damien, Quebec, Canadá) llenos de una mezcla de musgo de turba Fafard® y vermiculita Holiday®'s (3:1 v:v). Dos semillas variables fueron colocadas en cada contenedor y se cubrieron con una capa de 0.5 cm de silicato inerte, para evitar el lavado de la semilla por el riego. Después de la germinación, las plántulas excedentes fueron eliminadas o trasplantadas en contenedores vacíos para tener una plántula por contenedor. El trasplante se llevó a cabo a una edad muy temprana (3 a 4 d después de la germinación). El número de plántulas trasplantadas fue inferior al 10 % del número total de plántulas cultivadas.

Las plántulas fueron colocadas con un diseño de bloques completos al azar de 18 bloques, en el que cada una de las 14 procedencias fue representada por una parcela de tres plántulas por hilera. Los bloques de las plántulas se distribuyeron uno al lado del otro y para evitar efectos de borde, los bloques se acomodaron en grupos, para que las plántulas en los bordes de las bandejas siempre tuvieron como vecino ya sea plántulas del mismo bloque o de otro, o bien plántulas excedentes colocadas en el mismo tipo de recipientes para servir como hileras de protección.

Las plántulas se cultivaron de acuerdo con el calendario siguiente: 1) cuatro meses de crecimiento en un invernadero en Laurentian Forestry Center, Servicio Forestal Canadiense, Recursos Naturales de Canadá, Quebec, Canadá; 24 °C durante el día y de 18 a 20 °C durante la noche; ciclos de 16 h de luz y 8 h de oscuridad; riego y fertilización, según sea necesario (ver detalles más abajo); 2) traslado a un sombreadero al aire libre en agosto de 2007 (4 meses de edad), para promover el desarrollo de brotes, manteniendo el mismo diseño experimental; 3) traslado a un cuarto frío en octubre de 2007 (6 meses de edad), para satisfacer las necesidades de frío a 2 °C en completa oscuridad durante 6 semanas; 4) traslado a un invernadero durante cuatro semanas: una semana a 7 °C, otra semana a 10 °C y dos semanas a 16 °C para la aclimatación.

### Experimento de cámaras de crecimiento

Las plántulas (8 meses de edad) se trasladaron a cámaras de crecimiento durante cuatro meses (Environmental Growth Chambers GC-15; Chagrin Falls, Ohio, EE.UU.) para simular



occurs at an intermediate altitude of the actual natural altitudinal range, 2725 m); temperature estimations were made based on 1961-1990 records of the nearest weather station, at Ixtlán de Juárez, Oaxaca, 17° 20' N, 96° 29' W, 2075 m; estimation for 2725 m was made by correction using a lapse rate of 0.5 °C for each 100 m of altitudinal difference. Future temperatures, estimated from General Circulation Model scenarios as 4 °C higher than present temperatures, were chosen to simulate the average increase of temperature estimated for Mexico and Central America, for March-May, 2080 to 2099, using an average of output from 21 global models for the A1B scenario (Christensen *et al.*, 2007).

Both temperature regimes were randomly assigned to the six available growth chambers: three chambers for present and three for future temperatures. Three blocks were randomly allocated to each chamber on December 24<sup>th</sup>, 2007 when the seedlings were 8 months of age. Blocks and containers within blocks were rotated on approximately 10-day intervals to minimize possible edge effects inside the chambers.

Daylengths were maintained at 12 h with an uninterrupted night. Illumination averaged 184.3  $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ . We aimed at a compromise between light intensity below the risk of foliage damage (previous experience with full light capacity of the chambers induced some foliage damage), and enough to achieve some level of net photosynthesis (in previous experiments approximately 60  $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$  was the light compensation point for *Picea glauca* in the same growth chambers<sup>5</sup>). Seedlings did not show signs of etiolation with the light provided. Measurement was made at a height equivalent to the average base of the leading buds. There were no significant differences of illumination among groups of chambers with different temperatures (ANOVA,  $p=0.74$ ).

Temperatures were recorded hourly with dataloggers, placed at a mid-height inside the growth chambers (StowAway TidbiT, USA; temperatures fluctuated between  $\pm 0.3$  to  $\pm 0.7$  °C around the temperature set). Each plant received three times per week approximately 88 mL of water, with soluble fertilizer one time per week. Watering was enough to fully reach field capacity in both treatments; although substrate under the higher temperature treatment was drier than the containers under the treatment of lower temperature before the next watering. Moisture contents were not significantly different among treatments (moisture measured with a Field Scout TDR 100, Spectrum Technologies Inc, USA; ANOVA among treatments after watering:  $p=0.960$ ; right before next watering:  $p=0.084$ ; Figure 1 shows the maximum and minimum moisture content for each treatment at two consecutive waterings). Soluble fertilizer provided (per

la primera parte de la temporada de crecimiento con las temperaturas actuales de México (promedio de 17 °C; los ciclos de 20 °C en el día y 14 °C por la noche) y la temperatura predicha por el calentamiento global (media de 21 °C, ciclos de 24 °C en el día y 18 °C por la noche).

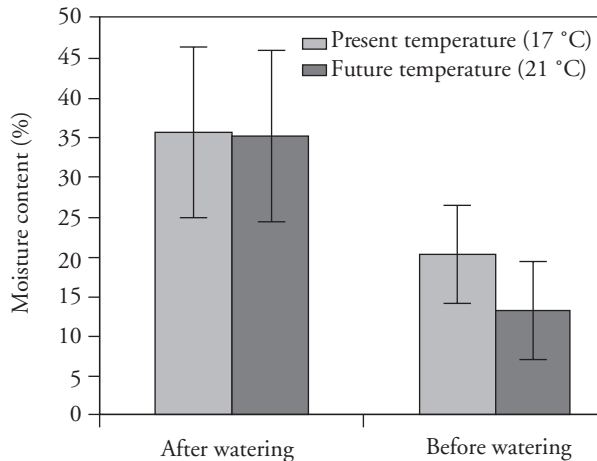
Con los regímenes de temperatura para las cámaras de crecimiento, se intentó simular las temperaturas medias mensuales que se producen entre marzo y abril (época en que el alargamiento del primer brote ocurre a una altura intermedia del actual rango altitudinal natural, 2725 m). Los cálculos para temperatura se hicieron sobre la base de los registros de 1961-1990 de la estación meteorológica más cercana, en Ixtlán de Juárez, Oaxaca, 17° 20' N, 96° 29' O, 2075 m; el cálculo para 2725 m se realizó por corrección con un gradiente de 0.5 °C por cada 100 m de diferencia de altitud. Las temperaturas futuras, calculadas a partir de escenarios de Modelos de Circulación General en 4 °C más elevadas que la temperatura actual, fueron elegidas para simular el aumento promedio de temperatura calculado para México y América Central, en marzo-mayo de 2080 a 2099, usando un promedio de resultados de 21 modelos globales para el escenario A1B (Christensen *et al.*, 2007).

Los dos regímenes de temperatura fueron asignados al azar a las seis cámaras de crecimiento disponibles: tres cámaras para las temperaturas actuales y tres para las futuras. Tres bloques fueron asignados al azar a cada cámara el 24 de diciembre de 2007, cuando las plántulas tenían 8 meses de edad. Los bloques y contenedores dentro de los bloques fueron rotados en intervalos de aproximadamente 10 d, para reducir al mínimo los posibles efectos del borde dentro de las cámaras.

Los fotoperiodos se mantuvieron en 12 h, con una noche sin interrupciones. La iluminación promedio fue 184.3  $\mu\text{mol seg}^{-1} \text{m}^{-2}$ . El objetivo fue llegar a una situación de equilibrio entre la intensidad de la luz por debajo del riesgo de daños en el follaje (una experiencia previa con plena capacidad de luz de las cámaras produjo daño foliar), y lo suficiente para lograr un cierto nivel de fotosíntesis neta (en experimentos anteriores, aproximadamente 60  $\mu\text{mol seg}^{-1} \text{m}^{-2}$  fue el punto de compensación de luz de *Picea glauca* en las mismas cámaras de crecimiento<sup>5</sup>). Las plántulas no mostraron signos de etiolación con la luz proporcionada. La medición se hizo a una altura equivalente a la base promedio de los brotes principales. No hubo diferencias significativas entre los grupos en relación a la iluminación de las cámaras con diferentes temperaturas (ANDEVA,  $p=0.74$ ).

Las temperaturas se registraron cada hora con registradores de datos situados a una altura media dentro de las cámaras de crecimiento (StowAway TidbiT, EE.UU.; las temperaturas fluctuaron entre  $\pm 0.3$  y  $\pm 0.7$  °C en torno a la temperatura

<sup>5</sup>Yves Dubuc (2007). Personal communication. Centre des foresterie de las Laurentides, Service Canadien des Forêts, Ressources Naturelles Canada, Sainte-Foy, Québec, Canada.



**Figure 1. Substrate moisture content (%) before and after watering for the two temperature treatments. Vertical bars indicate 95 % confidence interval.**

**Figura 1. Contenido de humedad (%) del sustrato antes y después del riego para los dos tratamientos de temperatura. Las barras verticales indican 95 % del intervalo de confianza.**

plant) during the growth period in the growth chambers was approximately 145 mg N, 83 mg P and 145 mg K.

**Data recording and statistical analysis**

Initial seedling height was measured right after the seedlings were placed inside the growth chambers (when seedlings were eight months of age from sowing date), and final height was measured right before the growth chamber experiment ended (12 months of age). Measures (mm) were made from a solid surface lying across the surface of the containers to minimize measurement errors.

After final height measurement, seedlings were harvested to evaluate dry weight of above- and below-ground portions. Because harvesting of root system was time consuming and human resources were limited, only three blocks within one temperature treatment could be treated. Analyses of those three blocks did not show statistical differences among populations (ANOVA, p=0.979), among blocks (p=0.900) or interaction block by provenance (p=0.156). Thus, our results of dry weight deal with only the aerial portions.

In order to control the effect of differences on initial seedling size at the beginning of the experiment, analyses of variance of final seedling height and aerial dry weight were conducted using initial seedling height (eight months of age) as covariate. Analysis of covariance of final height and aerial dry-weight was performed using MIXED procedure (Littell *et al.*, 1996; SAS Institute Inc., 1999), with the following full model:

establecida). Cada planta recibió aproximadamente 88 mL de agua, tres veces por semana, con fertilizantes solubles una vez por semana. El riego fue suficiente para alcanzar plenamente la capacidad de campo en ambos tratamientos, aunque el sustrato bajo el tratamiento de temperatura más alta se secaba más que los contenedores con el tratamiento de una temperatura más baja antes del siguiente riego. Los contenidos de humedad no fueron significativamente diferentes entre los tratamientos (la humedad medida con un Field Scout TDR 100, Spectrum Technologies Inc., EE.UU.; el análisis de varianza (ANDEVA) entre los tratamientos después del riego: p=0.960; justo antes del siguiente riego: p=0.084; la Figura 1 muestra los valores máximo y mínimo del contenido de humedad para cada tratamiento en dos riegos consecutivos). Los fertilizantes solubles (por planta) aplicados durante el período de crecimiento en las cámaras de crecimiento fueron aproximadamente: 145 mg de N, 83 mg de P y 145 mg de K.

**Registro de datos y análisis estadísticos**

La altura inicial de las plántulas se midió inmediatamente después de colocarlas dentro de las cámaras de crecimiento (cuando las plántulas tuvieron ocho meses de edad a partir de la fecha de siembra), y la altura final se midió justo antes de que terminara el experimento de las cámaras de crecimiento (12 meses de edad). Las mediciones (mm) se realizaron a partir de una superficie sólida que se extendía a través de la superficie de los contenedores, para minimizar los errores de medición.

Después de la medición de la altura final, las plántulas se cosecharon para evaluar el peso seco de las partes aéreas y por debajo del suelo. Debido a que la cosecha de las raíces tomaba mucho tiempo y los recursos humanos eran limitados, sólo se pudieron tratar tres bloques dentro de un tratamiento de temperatura. Los análisis de los tres bloques no mostraron diferencias estadísticas entre las poblaciones (ANDEVA, p=0.979), entre los bloques (p=0.900) o interacción entre los bloques por procedencia (p=0.156). Por tanto, los resultados de peso seco se refieren sólo a las partes aéreas.

Con el fin de controlar el efecto de las diferencias en el tamaño inicial de las plántulas, en el inicio del experimento, se realizaron análisis de varianza de la altura final de las plántulas y el peso seco aéreo, utilizando la altura inicial de las plántulas (ocho meses de edad) como covariable. El análisis de covarianza de la talla final y el peso seco aéreo se realizó mediante el procedimiento MIXED (Littell *et al.*, 1996; SAS Institute Inc., 1999.), con el siguiente modelo completo:

$$\begin{aligned}
 Y_{ijklm} = & \mu + T_i + s_{ik} + u_{ikl} + p_j + v_{ij} + w_{ijk} + z_{ijkl} + \beta X_{ijklm} + \gamma_i X_{ijklm} \\
 & + c_{ik} X_{ijklm} + d_{ikl} X_{ijklm} + f_j X_{ijklm} + g_{ij} X_{ijklm} + h_{ijk} X_{ijklm} + q_{ijkl} X_{ijklm} \\
 & + \varepsilon_{ijklm} \quad (1)
 \end{aligned}$$

$$Y_{ijklm} = \mu + T_i + s_{ik} + u_{ikl} + p_j + v_{ij} + w_{ijk} + z_{ijkl} + \beta X_{ijklm} + \gamma_i X_{ijklm} + c_{ik} X_{ijklm} + d_{ikl} X_{ijklm} + f_j X_{ijklm} + g_{ij} X_{ijklm} + h_{ijk} X_{ijklm} + q_{ijkl} X_{ijklm} + \varepsilon_{ijklm} \quad (1)$$

where  $Y_{ijklm}$  = seedling height or aerial dry weight of the  $m^{th}$  seedling ( $m = 1, 2$  or  $3$ ) of the  $l^{th}$  block ( $l = 1, 2,$  or  $3$ ) of the  $k^{th}$  growth chamber ( $k = 1, 2$  or  $3$ ) from population  $j$  ( $j = 1, \dots, 14$ ) subjected to the  $i^{th}$  temperature ( $i=1$  or  $2$ );  $\mu$  = overall mean;  $T_i$  = the fixed effect of the  $i^{th}$  temperature;  $s_{ik}$  = the random effect of the  $k^{th}$  growth chamber nested in the  $i^{th}$  temperature, it is assumed that  $s_{ik} \sim N(0, \sigma_s^2)$ ;  $u_{ikl}$  = the random effect of the  $l^{th}$  block nested in the  $k^{th}$  growth chamber and  $i^{th}$  temperature, it is assumed that  $u_{ikl} \sim N(0, \sigma_u^2)$ ;  $p_j$  = the random effect of the  $j^{th}$  population, it is assumed that  $p_j \sim N(0, \sigma_p^2)$ ;  $v_{ij}$  = the random effect of population  $j$  specific to temperature  $i$ , it is assumed that  $v_{ij} \sim N(0, \sigma_v^2)$ ;  $w_{ijk}$  = the random effect of the group of seedlings from population  $j$  grown in growth chamber  $k$  at temperature  $i$ , it is assumed that  $w_{ijk} \sim N(0, \sigma_w^2)$ ;  $z_{ijkl}$  = the random effect of the group of seedlings from population  $j$  assigned to block  $l$  of growth chamber  $k$  and temperature  $i$ , it is assumed that  $z_{ijkl} \sim N(0, \sigma_z^2)$ ;  $X_{ijklm}$  = covariate, the fixed effect of seedling height at the beginning of the experiment (at 8 months);  $\beta$  = average coefficient of the regression of  $Y$  on the covariate  $X$  over all conditions after correction for all fixed and random effects except residual error;  $g_i$  = the fixed deviation of the slope of the regression of  $Y$  on  $X$  specific to the  $i^{th}$  temperature treatment from  $b$ ;  $c_{ik}$ ,  $d_{ikl}$ ,  $f_j$ ,  $g_{ij}$ ,  $h_{ijk}$  and  $q_{ijkl}$  are the random deviations of the slope of the regression of  $Y$  on  $X$  specific to the units defined by their indices; each random effect is assumed  $N(0, \sigma_r^2)$  where  $r = c, d, f, g, h, q$ , respectively; and  $\varepsilon_{ijklm}$  = the random error term associated with the seedlings ( $i, j, k, l, m$ ) and it is assumed that  $\varepsilon_{ijklm} \sim N(0, \sigma_\varepsilon^2)$ . All random effects are assumed mutually independent. All the interactions with the covariate were explored, considering that in some cases treatment (mainly temperature in our particular case) might influence both the response variable (final seedling height or dry weight) and the covariate itself.

The random part of the model for each response variable was then reduced by successively testing for the significance of each variance component. The process started with  $\sigma_q^2$  and ended with  $\sigma_s^2$ . If a given random effect was not significant at  $\alpha=0.25$ , it was excluded from the model based on a chi-squared test of the difference between minus twice the log-likelihood of the reduced model (without the random effect whose variance component is being tested) and of the full model (Verbeke and Molenberghs, 1997; Saenz-Romero *et al.*, 2001). After dropping a term, a new analysis was conducted with the successively reduced models. Thus, the final model was:

$$Y_{ijklm} = \mu + T_i + s_{ik} + u_{ikl} + p_j + z_{ijkl} + \beta X_{ijklm} + \varepsilon_{ijklm} \quad (2)$$

donde  $Y_{ijklm}$  = altura de la plántula o peso seco aéreo de la  $m$ -ésima plántula ( $m = 1, 2$  o  $3$ ) del  $l$ -ésimo bloque ( $l = 1, 2,$  o  $3$ ) de la  $k$ -ésima cámara de crecimiento ( $k = 1, 2$  o  $3$ ) de la población  $j$  ( $j = 1, \dots, 14$ ) sometidos a la  $i$ -ésima temperatura ( $i = 1$  o  $2$ ),  $\mu$  = media general;  $T_i$  = el efecto fijo de la  $i$ -ésima temperatura;  $s_{ik}$  = el efecto aleatorio de la  $k$ -ésima cámara de crecimiento anidada en la  $i$ -ésima temperatura; se supone que  $s_{ik} \sim N(0, \sigma_s^2)$ ;  $u_{ikl}$  = el efecto aleatorio del  $l$ -ésimo bloque anidado en la  $k$ -ésima cámara de crecimiento y la  $i$ -ésima temperatura, se supone que  $u_{ikl} \sim N(0, \sigma_u^2)$ ;  $p_j$  = el efecto aleatorio de la  $j$ -ésima población, se supone que  $p_j \sim N(0, \sigma_p^2)$ ;  $v_{ij}$  = el efecto aleatorio de la población  $j$  específica para la temperatura  $i$ , se supone que  $v_{ij} \sim N(0, \sigma_v^2)$ ;  $w_{ijk}$  = el efecto aleatorio del grupo de plántulas de la población  $j$ , que ha crecido en la cámara de crecimiento  $k$  en la temperatura  $i$ ; se supone que  $w_{ijk} \sim N(0, \sigma_w^2)$ ;  $z_{ijkl}$  = el efecto aleatorio del grupo de plantas de la población  $j$  asignado al bloque  $l$  de la cámara de crecimiento  $k$  y la temperatura  $i$ ; se supone que  $z_{ijkl} \sim N(0, \sigma_z^2)$ ;  $X_{ijklm}$  = covariable, el efecto fijo de la altura de la plántula al inicio del experimento (a los 8 meses);  $\beta$  = coeficiente promedio de la regresión de  $Y$  sobre la covariable  $X$  sobre todas las condiciones después de la corrección para todos los efectos fijos y aleatorios, salvo el error residual;  $g_i$  = la desviación fija de la pendiente de la regresión de  $Y$  sobre  $X$  específica para el tratamiento de  $i$ -ésima temperatura de  $b$ ;  $c_{ik}$ ,  $d_{ikl}$ ,  $f_j$ ,  $g_{ij}$ ,  $h_{ijk}$  y  $q_{ijkl}$  son las desviaciones al azar de la pendiente de la regresión de  $Y$  sobre  $X$  específica para las unidades definidas por sus índices; cada efecto aleatorio se supone que es  $N(0, \sigma_r^2)$  donde  $r = c, d, f, g, h, q$ , respectivamente, y  $\varepsilon_{ijklm}$  = término de error aleatorio asociado con las plántulas ( $i, j, k, l, m$ ) y se supone que  $\varepsilon_{ijklm} \sim N(0, \sigma_\varepsilon^2)$ . Se supone que todos los efectos aleatorios son independientes unos de otros. Se exploraron todas las interacciones con la covariable considerando que en algunos casos el tratamiento (principalmente el de la temperatura en este caso particular) puede influir en la variable de respuesta (altura final de las plántulas o peso seco) y en la propia covariable.

La parte aleatoria del modelo para cada variable de respuesta se redujo por las pruebas sucesivas realizadas para detectar la importancia de cada componente de varianza. El proceso se inició con  $\sigma_q^2$  y terminó con  $\sigma_s^2$ . Si un efecto determinado al azar no fue significativo con  $\alpha=0.25$ , fue excluido del modelo basado en una prueba de hi-cuadrada de la diferencia entre menos dos veces el logaritmo de verosimilitud del modelo reducido (sin el efecto aleatorio cuyos componentes de varianza se están probando) y el del modelo completo (Verbeke y Molenberghs, 1997; Sáenz-Romero *et al.*, 2001). Después de eliminar un término se realizó un nuevo análisis con los modelos reducidos sucesivamente. Así, el modelo final fue:

$$Y_{ijklm} = \mu + T_i + s_{ik} + u_{ikl} + p_j + z_{ijkl} + \beta X_{ijklm} + \varepsilon_{ijklm} \quad (2)$$



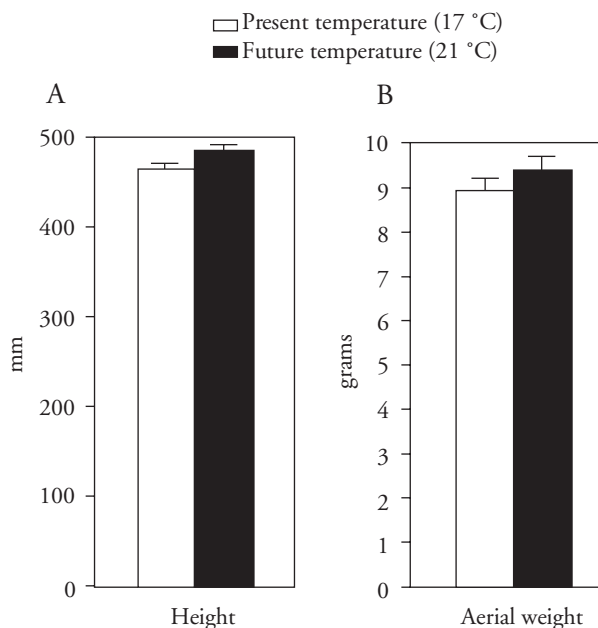
To test for significant altitudinal patterns of genetic variation, overall population means and population means per growth chamber were regressed on provenance altitude using REG procedure of SAS (SAS Institute Inc., 1999).

The LSD test ( $\alpha=0.20$ ) was conducted to estimate the altitudinal interval that must separate populations before being reasonably certain of genetic differentiation (Rehfeldt, 1991; Sáenz-Romero and Tapia-Olivares, 2008).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Differences between temperatures

The means of final height and dry weight of aerial part of the seedling growing under simulated climate change temperatures (21 °C) were on average 4.6 % higher than those of seedlings growing under present temperatures (17 °C) (Figure 2). However, these differences were not significant for either seedling trait ( $p>0.35$ ; Table 1). This result is after controlling for the effect of initial seedling height, which was highly significant ( $p\leq 0.001$ ) for both the final seedling



**Figure 2.** Average growth per temperature treatment (inside growth chambers) for: (A) seedling height, and (B) aerial dry weight. Vertical bars denote 95 % confidence intervals.

**Figura 2.** El crecimiento medio por tratamiento de temperatura (dentro de cámaras de crecimiento) para: (A) altura de las plántulas, y (B) peso seco aéreo. Las barras verticales indican 95 % de intervalos de confianza.

Para probar la significancia de los patrones altitudinales de la variación genética, las medias generales de población y las de población por cámara de crecimiento fueron sometidas a regresión contra la altitud de procedencia, utilizando el procedimiento REG de SAS (SAS Institute Inc., 1999).

La prueba de DMS ( $\alpha=0.20$ ) se llevó a cabo para estimar el intervalo altitudinal que debe separar a las poblaciones antes de tener una certeza razonable de diferenciación genética (Rehfeldt, 1991; Sáenz-Romero y Tapia-Olivares, 2008).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Diferencias entre las temperaturas

Las medias de la altura final y el peso seco de la parte aérea de las plántulas que crecen en temperaturas simuladas del cambio climático (21 °C) fueron en promedio 4.6 % más elevadas que las de las plántulas que crecen bajo las temperaturas actuales (17 °C) (Figura 2). Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas en relación a las características de las plántulas ( $p>0.35$ ; Cuadro 1). Este resultado se detecta después de controlar el efecto de la altura inicial de las plántulas, que fue altamente significativa ( $p\leq 0.001$ ), tanto para la altura final de las plántulas como para el peso seco de la parte aérea (Cuadro 1). La variación dentro de los tratamientos fue grande, lo que impidió determinar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de temperatura. Estos resultados no son inusuales, y se ha propuesto que quizás se requiera de más de una temporada de crecimiento en las cámaras de crecimiento para detectar diferencias significativas (Sonesson et al., 2001), y se han recomendado hasta tres temporadas de crecimiento (Sonesson y Eriksson, 2000). De manera inesperada, diferencias entre las cámaras dentro de los tratamientos de temperatura fueron estadísticamente significativas ( $p\leq 0.018$ ). Pequeñas variaciones en la humedad del aire debido a las diferencias en la eficiencia del sistema de ventilación de las cámaras de crecimiento (en tratamientos de temperatura) probablemente indujeron esta variación entre las cámaras en el crecimiento. Pero estas diferencias no fueron suficientes para inducir diferencias significativas entre las cámaras en relación al peso seco aéreo ( $p=0.655$ ; Cuadro 1).

Se verificaron los posibles efectos de borde dentro de las cámaras de crecimiento, llevando a cabo un análisis de varianza para comparar el crecimiento de

height and the dry weight of the aerial section (Table 1). Variation within treatments was large, which prevented to find out any statistically significant difference among the temperature treatments. Such results are not unusual and it has been proposed that more than one growing season inside the growth chambers might be required to detect significant differences (Sonesson *et al.*, 2001), and up to three growing seasons have been recommended (Sonesson and Eriksson, 2000). While unexpected, differences among chambers within temperature treatments were statistically significant ( $p \leq 0.018$ ). Small variation in air moisture due to differences in the efficiency of the ventilation system of the growth chambers (within temperature treatments) probably induced this variation in growth among chambers, although such differences were not enough to induce significant differences among chambers for aerial dry weight ( $p=0.655$ ; Table 1).

We checked for possible edge effects inside the growth chambers, conducting an analysis of variance that compared the seedling growth among row positions. However, no significant variation could be found for any of the traits ( $p > 0.36$ , analysis not shown). In future experiments, additional efforts will have to be devoted to better standardize growth chamber conditions or, alternatively, the number of chambers within temperature treatments will have to be increased to reduce this source of error.

las plántulas entre los lugares que ocupaban en las hileras. Sin embargo, no se encontró variación significativa en ninguna de las características ( $p > 0.36$ , no se muestra el análisis). En experimentos futuros, habrá que dedicar mayores esfuerzos para lograr una mayor estandarización de las condiciones de crecimiento de cámara, o bien el número de cámaras en tratamientos de temperatura tendrá que aumentar para reducir esta fuente de error.

Aunque hay alguna evidencia de que el tamaño relativamente pequeño del contenedor no impide el crecimiento de las plántulas si se proporcionan suficientes nutrientes por medio de la fertilización (McConnaughay *et al.*, 1993), la falta de diferencias significativas en el peso seco de la raíces y la relación brote/raíz podría ser considerada como indicación de que el tamaño del contenedor limita el crecimiento de la raíz. Si ese fuera el caso, podría ser aconsejable probar contenedores más grandes y también mayores niveles de iluminación, para estimular el crecimiento de las plántulas, sobre todo si se llevan a cabo experimentos de mayor duración dentro de las cámaras de crecimiento. Los experimentos más prolongados tendrán también la ventaja de detectar posibles diferencias entre las poblaciones para la dinámica de elongación de brotes a lo largo de la temporada de crecimiento. Una importante limitación del presente estudio fue que sólo duró cuatro meses dentro de la cámara de crecimiento, mientras que la temporada

**Table 1. Analysis of variance of seedling height and aerial dry weight of 14 provenances of one-year-old *Pinus patula* grown in growth chambers.**

**Cuadro 1. Análisis de varianza de la altura de las plántulas y el peso seco aéreo de 14 procedencias de *Pinus patula*, de un año de edad, cultivadas en cámaras de crecimiento.**

Source of variation	Height, mm			Aerial dry weight, g		
	Ndf <sup>†</sup> , Ddf <sup>‡</sup>	F	P	Ndf <sup>†</sup> , Ddf <sup>‡</sup>	F	P
Temperature	1,4	1.1	0.359	1,4	0.2	0.7144
Covariate <sup>§</sup>	1,702	6107.0	0.001	1,702	660.7	0.0001
Random effects	% <sup>b</sup>	Chi <sup>2</sup>	P	% <sup>b</sup>	Chi <sup>2</sup>	P
Population	4.26	11.4	0.001	5.04	13.6	0.002
Chamber (Temp.)	4.89	5.6	0.018	0.99	0.2	0.655
Block (Cham.,Temp.)	0.50	0.2	0.655	5.94	10.9	0.001
Pop.* Block (Cham.,Temp.)	4.72	1.5	0.221	9.32	6.0	0.014
Error	85.73			78.72		

<sup>†</sup>Ndf: numerator degree of freedom; <sup>‡</sup>Ddf: denominator degree of freedom; <sup>§</sup>Covariate: initial seedling height; <sup>b</sup>%; percent of contribution to total variance ♦ <sup>†</sup>Ndf: grados de libertad del numerador; <sup>‡</sup>Ddf: grado de libertad del denominador; <sup>§</sup>Covariate: altura inicial de plántulas; <sup>b</sup> %: porcentaje de contribución a la variación total.

Although there are some evidence that relatively small pot size does not impede seedling growth if sufficient nutrients are provided by fertilization (McConnaughay *et al.*, 1993), the lack of significant differences for root dry weight and shoot/root ratio, might be considered as indication that the container size limited root growth. If that were the case, it might be advisable to test larger pot sizes and also higher illumination rates, to stimulate seedlings' growth, particularly if longer experiments are conducted inside growth chambers. Longer experiments will have also the advantage of detecting possible differences among populations for shoot elongation dynamics along the growing season. One limitation of our study was that it lasted only four months inside the growth chamber, whereas the growing season of this multiple shoot-flushes species is larger (Gómez-Cárdenas *et al.* 1998).

A combination of both experiments of longer duration and use of larger containers, would undoubtedly require larger growth chambers. Perhaps a better approach would be to conduct the experiments using open air facilities, able to increase temperature and decrease precipitation, using a system (which should be developed) similar to the one used in the large-scale Free-Air CO<sub>2</sub> Enrichment (FACE) experiments (Ainsworth and Long, 2005). Also, further experimentation is required testing treatments of drought stress to simulate the expected decrement of precipitation due to climatic change. Frost damage will be also relevant aiming to design an assisted migration strategy, since plants moved altitudinally upwards or to northern latitudes will face the risk of frost damage the first years after planting. Thus, experimentation testing a combination of factors as elevated temperatures, freezing temperatures and different moisture availability, as was done for *P. glauca* (Coursolle *et al.*, 2002; Bigras *et al.*, 2004), will be relevant.

### Differences between populations

Height and aerial dry weight of seedlings varied significantly among populations (Table 1;  $p \leq 0.001$ ). The percent of total variance contributed by population effects was of 4.3 % for height and 5.0 % for aerial dry weight (Table 1).

Population means for seedling height and aerial dry weight exhibited a clinal pattern, with populations

de crecimiento de esta especie de múltiples brotes es más extensa (Gómez-Cárdenas *et al.* 1998).

Una combinación tanto de experimentos de mayor duración como del uso de envases más grandes, indudablemente requeriría de cámaras de crecimiento más grandes. Tal vez un mejor enfoque sería realizar los experimentos con instalaciones al aire libre, capaces de aumentar la temperatura y disminuir las precipitaciones, con un sistema (que debe ser desarrollado) similar al utilizado en los experimentos Free-Air CO<sub>2</sub> Enrichment (FACE) (Ainsworth y Long, 2005). Además, es necesario realizar más pruebas de tratamientos de sequía para simular la esperada disminución de las precipitaciones como resultado del cambio climático. El daño por heladas será también relevante con el objeto de diseñar una estrategia de migración asistida, ya que las plantas que se trasladen de manera altitudinal hacia arriba o hacia latitudes del norte se enfrentarán al riesgo de daños por heladas durante los primeros años después de la plantación. Por tanto, es importante la experimentación para probar una combinación de factores, como temperaturas elevadas, temperaturas de congelación y la disponibilidad de diferentes niveles de humedad, como se hizo con *P. glauca* (Coursolle *et al.*, 2002; Bigras *et al.*, 2004).

### Diferencias entre poblaciones

La altura y el peso seco aéreo de las plántulas variaron significativamente entre las poblaciones (Cuadro 1;  $p \leq 0.001$ ). El porcentaje de la varianza total aportado por los efectos de la población fue de 4.3 % para la altura y 5.0 % para el peso seco aéreo (Cuadro 1).

Las medias de población para la altura y peso seco aéreo de las plántulas mostraron un patrón clinal, en donde las plantas de poblaciones procedentes de altitudes más bajas, tuvieron en general mayor altura y peso seco. El patrón de altitud, aunque estadísticamente significativo, es relativamente débil, como puede verse en el análisis de regresión de las medias de población por cámara de crecimiento en comparación con la altitud de la población, para la altura de las plántulas ( $r^2 = 0.06$ ;  $p = 0.020$ , Figura 3) y el peso seco aéreo (modelo lineal:  $r^2 = 0.07$ ,  $p = 0.014$ , Figura 4). Las procedencias del límite altitudinal bajo revelaron un relativamente bajo promedio de peso seco aéreo, por lo que un modelo cuadrático tiene un

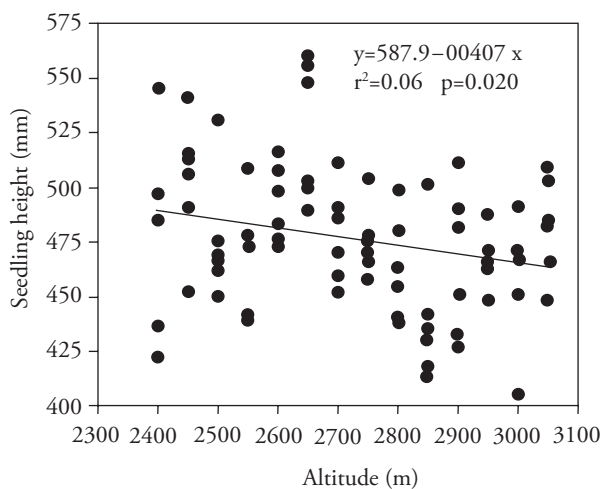
originating from lower altitudes having in general larger seedling height and dry weight. The altitudinal pattern, although statistically significant, is relatively weak, as it can be seen from the regression analysis of population means per growth chamber against population altitude, for seedling height ( $r^2=0.06$ ;  $p=0.020$ ; Figure 3) and for aerial dry weight (linear model:  $r^2=0.07$ ;  $p=0.014$ ; Figure 4). Provenances from the low altitudinal limit exhibited relatively low average aerial dry weight, so a quadratic model has a fit slightly better than the linear model (quadratic model:  $r^2=0.09$ ;  $p=0.018$ ; Figure 4).

This altitudinal pattern is globally consistent with results from field tests, with low altitude *P. patula* provenances showing higher growth (Dvorak *et al.*, 2000) and a larger number of shoot cycles than provenances from higher altitudes (Salazar-García *et al.* 1999). The relative weakness of the altitudinal pattern found in this study is similar to that found among *Pinus pseudostrobus* provenances, for which there was a significant (although weak) negative correlations between altitude of the provenance and seedling growth (Viveros-Viveros *et al.*, 2005). The weak relationship found for *P. patula* contrasts with the one for *P. oocarpa*, that has shown a stronger correlation between seedling growth and altitude or climatic variables (such as annual aridity index)

ajuste ligeramente mejor que el modelo lineal (modelo cuadrático:  $r^2 = 0.09$ ;  $p = 0.018$ ; Figura 4).

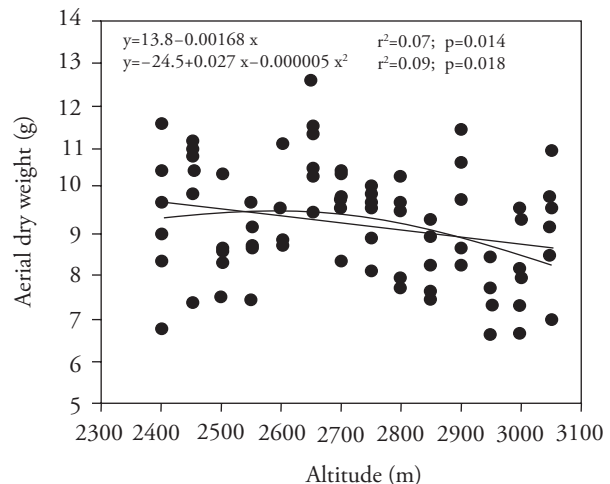
Este patrón altitudinal es globalmente coherente con los resultados de las pruebas de campo, con procedencias de *P. patula* de baja altitud que muestran un mayor crecimiento (Dvorak *et al.*, 2000) y un mayor número de ciclos de brotes que las procedencias de altitudes más elevadas (Salazar-García *et al.* 1999). La relativa debilidad del patrón altitudinal que se detecta en este estudio es similar a la encontrada entre procedencias de *Pinus pseudostrobus*, para las cuales hubo una significativa (aunque débil) correlación negativa entre la altitud de la procedencia y el crecimiento de las plántulas (Viveros-Viveros *et al.*, 2005). Esta débil relación en *P. patula* contrasta con la de *P. oocarpa*, que ha mostrado una correlación fuerte entre el crecimiento de las plántulas y las variables climáticas o de altitud (como el índice de aridez anual) de las procedencias (Sáenz-Romero *et al.*, 2006). *Pinus devoniana* (también conocida como *P. michoacana*), también ha puesto de manifiesto patrones altitudinales evidentes de diferenciación genética entre las poblaciones por los daños causados por heladas (Sáenz-Romero y Tapia-Olivares, 2008).

El intervalo altitudinal que debe separar dos poblaciones antes de que uno pueda estar razonablemente seguro de la diferenciación genética estimada



**Figure 3.** Average seedling height (mm) per population per growth chamber plotted against provenance elevation. Linear regression model is indicated.

**Figura 3.** Altura media de las plántulas (mm) por población por cámara de crecimiento graficada contra la elevación de procedencia. Se indica el modelo de regresión lineal.



**Figure 4.** Average aerial dry weight (g) of seedlings per population per growth chamber plotted against provenance elevation. Linear and quadratic regression models are indicated.

**Figura 4.** Promedio de peso seco aéreo (g) de plántulas por población por cámara de crecimiento graficada contra la elevación de procedencia. Se indican los modelos de regresión lineales y cuadráticos.

of the provenances (Sáenz-Romero *et al.*, 2006). *Pinus devoniana* (also known as *P. michoacana*) also has revealed clear altitudinal patterns of genetic differentiation among populations for frost damage (Sáenz-Romero and Tapia-Olivares, 2008).

The altitudinal interval that must separate two populations before one can be reasonably certain of genetic differentiation was estimated as 289 m of altitudinal difference, based on the least significant difference for seedling height (LSD=11.8 mm), translated to an altitudinal interval using the slope of the regression ( $\beta_1 = -0.04$ ; Figure 3) of average seedling height per growth chamber against provenance altitude. That would lead to divide the altitudinal range at which *P. patula* distributes in the region (from 2400 m to 3050 m of altitude) in three altitudinal zones. However, considering that the altitudinal pattern seems to be weak, we decided to wait for results from field tests at larger ages before moving on to construct guidelines for seedling movement.

### CONCLUSIONS

Pattern of genetic variation among populations along the altitudinal gradient is significant, although weak, where populations originating from lower altitudes exhibit larger growth in seedling height and on aerial dry weight as compared to populations from higher altitudes.

### ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support was provided to CSR by the joint Forestry Research Fund of the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT) and the Mexican National Forestry Commission (CONAFOR, grant 2005-C02-14783), and funding for a sabbatical year by Natural Resources Canada (NRCAN), CONACYT (fellowship 75831), and Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Seed collection was possible thanks to Antonio Plancarte, Julio Ruiz, Samuel Ramírez, Mauro Aquino, Mayolo Ruiz, Eduardo Aquino and others from the forestry office of the Native Indian Community of Ixtlán de Juárez, Oaxaca and seed extraction by Rodrigo Niniz at UMSNH. Greenhouse, shade house and growth chambers experiments maintenance and dry weight samples processing at Quebec were possible thanks to Daniel Plourde, Eric Dussault, Audrey Lachance, Esther Pouliot, Patricia Sylvestre, Marie Deslauriers, Phillippe Labrie, Sebastian Clement,

en 289 m de diferencia de altitud, sobre la base de la mínima diferencia significativa para la altura de las plántulas (DMS=11.8 mm), traducido a un intervalo altitudinal utilizando la pendiente de la regresión ( $\beta_1 = -0.04$ ; Figura 3) de la altura media de las plántulas por cámara de crecimiento en comparación con la altitud de las procedencias. Esto llevaría a dividir el rango altitudinal en que *P. patula* se distribuye en la región (de 2400 m a 3050 m de altitud) en tres zonas de altitud. Sin embargo, teniendo en cuenta que el patrón altitudinal parece ser débil, se optó por esperar los resultados de las pruebas de campo de edades mayores antes de pasar a establecer lineamientos para el movimiento de las plántulas.

### CONCLUSIONES

El patrón de variación genética entre las poblaciones a lo largo del gradiente altitudinal es significativo, aunque débil, donde las poblaciones procedentes de altitudes más bajas muestran un mayor crecimiento en altura y en el peso seco aéreo de las plántulas, en comparación con poblaciones de altitudes mayores.

—Fin de la versión en español—

-----\*-----

Patrick Laplante and others from NRCAN. We thank statistical advice from Michèle Bernier-Cardou, NRCAN. Unpublished *P. patula* information were provided by Aurelio Fierros, Gerencia de Plantaciones Forestales Comerciales, CONAFOR.

### LITERATURE CITED

- Aitken, S. N., S. Yeaman, J. A. Holliday, T. Wang, and S. Curtis-McLane. 2008. Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. *Evolutionary Applications* 1:95-111.
- Ainsworth, E. A., and S. P. Long. 2005. What have we learned from 15 years of free air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO<sub>2</sub>. *New Phytologist* 165: 351-372.
- Bigras, F. J., C. Coursolle, and H. A. Margolis. 2004. Survival and growth of *Picea glauca* seedlings as a function of freezing temperatures and exposure times during budbreak and shoot elongation. *Scandinavian J. For. Res.* 19(3):206-216.
- Birks, J. S., and R. D. Barnes. 1990. Provenance variation in *Pinus caribea*, *P. oocarpa* and *P. patula* ssp. *tecunumanii*. *Tropical Forestry Papers* 21. Oxford Forestry Institute. Oxford. 40 p.



- Christensen, J. H., B. Hewiston, A. Busuioac, A. Chen, X. Gao, I. Held, R. Jones, R. K. Kolli, W. T. Kwon, R. Laprise, V. Magaña-Rueda, L. Means, C. G. Menéndez, J. Räisänen, A. Rinke, A. Sarr, and P. Whetton. 2007. Regional Climate Projections. In: Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds). *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York. pp: 847-940.
- Coursolle, C., F. J. Bigras, and H. A. Margolis. 2002. Effects of root freezing on the physiology and growth of *Picea glauca*, *Picea mariana* and *Pinus banksiana* seedlings under different soil moisture regimes. *Scandinavian J. For. Res.* 17(3): 206-217.
- Dvorak, W. S. 1997. The improvement and breeding of *Pinus patula*. Proc. Southern Forest Tree Improvement Conference. Orlando, Florida. pp: 53-68.
- Dvorak, W. S. 2003. *Pinus patula* Schiede & Schltdl. & Cham. In: Vozzo, J.A. (ed). *Tropical Tree Seed Manual*. USDA Forest Service, pp: 632-635.
- Dvorak, W. S., G. R. Hodge, J.E. Kietzka, F. Malan, L. F. Osorio, and T. K. Stangen. 2000. *Pinus patula*. In: Conservation and testing of tropical and subtropical forest tree species by the CAMCORE Cooperative. CAMCORE Cooperative, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina. pp: 149-173.
- Farjon, A., and B. T. Styles. 1997. *Pinus* (Pinaceae). *Flora Neotrópica*. Monograph 75. New York Botanical Garden, N.Y. 291 p.
- Gómez-Cárdenas M., J. J. Vargas-Hernández, J. Jasso-Mata, A. Velásquez-Martínez, and Rodríguez-Franco, C. 1998. Annual growth pattern of the terminal shoot in young trees of *Pinus patula*. *Agrociencia* 32:357-364.
- Keel, B. G. 2007. Assisted Migration as a Conservation Strategy for Rapid Climatic Change: Investigating Extended Photoperiod and Mycobiont Distribution for *Habenaria repens* Nuttall (Orchidaceae) as a Case Study. Ph.D. dissertation. Antioch University, New England. 160 p.
- Littell, R. C., G. A. Milliken, W. W. Stroup, and R. D. Wolfinger. 1996. *SAS System for Mixed Models*. SAS Institute, Cary, North Carolina. 633 p.
- Luna-Rodríguez, M., J. López-Upton, and L. G. Iglesias-Andreu. 2005. Morphometric and molecular (RAPD) variability in a plantation of *Pinus patula* in Veracruz, México. *Agrociencia* 39:231-235.
- McConnaughay, K. D. M., G. M. Berntson, and F. A. Bazzaz. 1993. Limitations to CO<sub>2</sub>-induced growth enhancement in pot studies. *Oecologia* 94:550-557.
- Perry, J. P., 1991. *The Pines of Mexico and Central America*. Timber Press, Portland, Oregon. 231 p.
- Rehfeldt, G. E. 1991. A model of genetic variation for *Pinus ponderosa* in the Inland Northwest (USA): applications in gene resource management. *Can. J. For. Res.* 21: 1491-1500.
- Rehfeldt, G. E., N. L. Crookston, M. V. Warwell, and J. S. Evans. 2006. Empirical analyses of plant-climate relationship for the western United States. *Int. J. Plant Sci.* 167(6):1123-1150.
- Saenz-Romero, C., E.V. Nordheim, R.P. Guries, and P. M. Crump. 2001. A case study of a provenance/progeny test using trend analysis with correlated errors and SAS PROC MIXED. *Silvae Genetica* 50(3-4):127-135.
- Sáenz-Romero, C., R. Guzmán-Reyna, and G.E. Rehfeldt. 2006. Altitudinal genetic variation among *Pinus oocarpa* populations in Michoacán, México; implications for seed zoning, conservation of forest genetic resources, tree breeding and global warming. *For. Ecol. Manage.* 229:340-350.
- Sáenz-Romero, C., and B. L. Tapia-Olivares. 2008. Genetic variation in frost damage and seed zone delineation within an altitudinal transect of *Pinus devoniana* (*P. michoacana*) in México. *Silvae Genetica* 57(3):165-170.
- Saenz-Romero, C., G. E. Rehfeldt, N. L. Crookston, P. Duval, R. St-Amant, J. Beaulieu, and B. A. Richardson. 2010. Spline models of contemporary, 2030, 2060 and 2090 climates for México and their use in understanding climate-change impacts on the vegetation. *Climatic Change* 102(3-4):596-623.
- Salazar-García, J. G., J. J. Vargas-Hernández, J. D. Jasso-Mata, C. Ramírez-Herrera, y J. López-Upton. 1999. Variación en el patrón de crecimiento en altura de cuatro especies de *Pinus* en edades tempranas. *Madera y Bosques* 5(2):19-34.
- SAS Institute Inc. 1999. *SAS/STAT Computer Software*. Release 8. SAS Institute Inc., North Carolina, 3809 p.
- Sonesson, J., and G. Eriksson. 2000. Genotypic stability and genetic parameters for growth and biomass traits in a water x temperature factorial experiment with *Pinus sylvestris* L. seedlings. *For. Sci.* 46(4):487-495.
- Sonesson, J., G. Jansson, and G. Eriksson. 2001. Retrospective genetic tests of *Pinus sylvestris* L. in growth chambers with two irrigation regimes and two temperatures. *Scandinavian J. For. Res.* 16:21-29.
- St. Clair, J. D., and G. T. Howe. 2007. Genetic maladaptation of coastal Douglas-fir seedlings to future climates. *Global Change Biol.* 13:1441-1454.
- van Zonneveld, M., A. Jarvis, W. Dvorak, G. Lema and C. Leibing. 2009. Climate change impact predictions on *Pinus patula* and *Pinus tecunumanii* populations in Mexico and Central America. *For. Ecol. Manage.* 257:1566-1576.
- Velázquez-Martínez, A., G. Angeles-Pérez, T. Llanderal-Ocampo, A.R. Román-Jiménez, y V. Reyes-Hernández. 2004. *Monografía de Pinus patula*. Comisión Nacional Forestal, México. 124 p.
- Verbeke, G., and G. Molenberghs (eds). 1997. *Linear Mixed Models in Practice*. Springer, New York. 300 p.
- Viveros-Viveros, H., C. Sáenz-Romero, J. López-Upton, and J.J. Vargas-Hernández. 2005. Altitudinal genetic variation in plant growth of *Pinus pseudostrobus* Lindl. in field testing. *Agrociencia* 39(5):575-587.