



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD MORELIA  
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS  
ECOLOGÍA

**Estudio de los caracteres funcionales de los encinos *Quercus magnoliifolia*  
Neé y *Quercus resinosa* Liebm. en un gradiente altitudinal en México.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**ERASTO HERNÁNDEZ CALDERÓN**

**TUTOR DE TESIS: Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa. Escuela Nacional de Estudios Superiores.**

**COMITÉ TUTOR: Dr. Juan Servando Núñez Farfán. Instituto de Ecología.**

**Dra. María Imelda López Villaseñor. Instituto de Investigaciones Biomédicas.**

**MORELIA, MICHOACÁN MARZO DE 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de (Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas), del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 27 de enero del 2014, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno **HERNÁNDEZ CALDERÓN ERASTO** con número de cuenta **507020222**, con la tesis titulada: "**Estudio de los caracteres funcionales de los encinos *Quercus magnoliifolia* Neé y *Quercus resinosa* Liebm en un gradiente altitudinal en México**", bajo la dirección del Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa.

Presidente:	Dra. Alicia Gamboa de Buen
Vocal:	Dr. Horacio Armando Paz Hernández
Secretario:	Dr. Juan Servando Núñez Farfán
Suplente:	Dr. Antonio González Rodríguez
Suplente:	Dr. Erick de la Barrera Montppellier

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de febrero del 2014.

*M. del Coro Arizmendi*  
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

## **AGRADECIMIENTOS.**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la valiosa oportunidad de continuar mi formación profesional.

Al CONACYT por la beca numero 43987 y al proyecto “Análisis de la base genético molecular de caracteres adaptativos clave de los encinos mexicanos (género *Quercus*) ante escenarios de cambio climático global para su manejo y conservación apoyado por SEMARNAT-CONACYT 2006-23728.

Al Dr. Ken Oyama Nakagawa, creo que en ninguna otra ocasión tu paciencia fue puesta al límite como conmigo, gracias por compartir tus conocimientos Ken.

En esta Universidad hay personas valiosas y a la vez invaluable, me refiero al comité tutor conformado por el Dr. Juan Núñez Farfán y la Dra. Imelda López Villaseñor y al comité de sinodales Dr. Antonio González, Dr. Erick de la Barrera, Dr. Horacio Paz, Dra. Alicia Gamboa y Dr. Juan Núñez quienes han apoyado desinteresadamente este trabajo y me han permitido crecer en el campo académico, ahora llevo conmigo un pedacito de sus ideas.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL.**

El mayor peligro para un gobierno corrupto es un pueblo culto, nuestra casa de estudios es una maravillosamente peligrosa despertadora de conciencias, grandes fueron los viajeros que cruzaron por aquí, gracias UNAM, Por mi Raza Hablará el Espíritu.

Nuevamente al Dr. Antonio González fuente creativa del proyecto del estudio de caracteres adaptativos en encinos.

Al Dr. Rodrigo Méndez Alonzo apoyo constante en la escritura de artículos científicos.

A los asesores que precedieron mi formación académica, en la licenciatura el Dr. Javier Ponce Saavedra y en la Maestría el Dr. Eduardo Valencia Cantero sin duda son el pilar del crecimiento profesional.

A mi amigo y hermano Scout Dr. Luis Fernando Varela quien ha velado el crecimiento en el desempeño profesional y personal.

A vero y Felipe gracias por los lonches que fueron parte importante del soporte alimenticio de esta investigación.

Como científico intentamos ser lo más racionales posibles, pero las situaciones de la vida muchas veces nos indican que hay algo más allá de nuestras capacidades personales por eso yo quiero agradecer a Dios.

A la vida, tan linda y fascinante, de todos los colores, sabores y sin sabores, motor único de la biología.

A mi música, esa extensión del cuerpo y de los sentidos que me permite hablar lo que la palabra calla, oasis de calma en el ajetreo de la vida.

A mis padres Erasto Hernández y Elísea Calderón quienes me han brindado siempre el camino de la libertad para tomar mis propias decisiones.

A Mis hermanas Norma y Luz que me han brindado su apoyo de múltiples maneras.

Al Dr. Jesús Sánchez y la señora Gloria Martínez que sin deberla ni temerla me ha apoyado como unos verdaderos padres.

Y finalmente a mi esposa Gloria Sánchez Primo Martínez, cierto estoy que si no te tuviera a mi lado, Gloris, este momento quizás nunca hubiera llegado, gracias a tu cariño, paciencia y apoyo en todo el sentido de la palabra hoy es posible este momento, estoy en deuda contigo y eternamente agradecido.

## **DEDICATORIA.**

Espero no omitir a alguna persona en esta dedicatoria, si lo hago pido disculpas anticipadas y comprendan mi descuido, ustedes ya saben que así soy de distraído.

A mis padres Erasto Hernández Aldana, Elísea Calderón Valencia, mis hermanas Luz y Norma.

A mis sobrinos Monse y Juanito ha llenado de luz y alegría esta familia. A mí cuñado Juan.

A toda mi familia paterna y materna estoy verdaderamente orgulloso de llevar su sangre.

A la memoria de mis abuelos Enrique y Aurora, Nicolás y Justa, mis tíos Pedro, Paz y Leonor y mi hermana Ma. De los Ángeles.

A la memoria del Dr. Jesús Sánchez Primo Jacobo.

A mi nueva familia la señora Gloria Campos y Jesús Sánchez Primo Martínez, Alejandrita, Mari Fer, tía Lolis, junto con mis nuevos tíos y sobrinos que me han abierto las puertas en todo momento.

A los integrantes del grupo Amigos y Hermanos, Leo, Migue, Clau, Trini, Victor, Anita, Ari, Paty, Chinto, Jesse, Willy y muchos más.

A la vieja guardia del Clan San Jorge, Ulises, Luis Fernando, Héctor, Armando, Salvador (charal), Salvador (mandi), Víctor (vicos), Víctor (refri), Hugo, Arturo (Tatanka), Roberto, Marte, Manuel, Servando, Pedro, Cesar (ruco), Cesar (Maquío). A los nuevos integrantes del Clan, y en general a los antiguos y nuevos miembros del G1M con quienes compartimos el gusto por la naturaleza, añoro las noches de campamento, la luz y el calor de la fogata.

A todos los integrantes de la sección 03 de la Facultad de Biología y compañeros de la Maestría en Biología Experimental.

A la Tuna Nicolaita de la UMSNH, los estudiantes de esta Tuna la mejor, gracias por permitirme formar parte de las noches de ronda, gracias Leo, Rafa, Ponca y demás integrantes.

A los compañeros del laboratorio de Ecología Genética, Hermilo, Enrique, Selene, Luisa, Ana, Juan, Victor Rocha, Doña Lolita, Nidia, Lore, Paco Beto, Will, Cesar, Clau, Vane, Mariana, Tere, Pau, Yuri y los nuevos integrantes Rafa, Carmen Julia, Gabi, Esther, Napo, Lety, Barbara y si se me pasa alguien ya pedí disculpas.

A los que han sido mis alumnos y me han permitido más que enseñar, aprender al lado de ellos.

Y a ti, las palabras sobran porque lo que se siente en el alma es imposible expresarlo con palabras te dedico todos mis esfuerzos Gloris.



Comienzo de una nueva.....



## ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	1
II.	ABSTRACT.....	3
III.	INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
IV.	ANTECEDENTES.....	9
V.	Capítulo 1. Altitudinal changes in tree leaf and steam functional diversity in a semitropical mountain.....	27
VI.	Capítulo 2. Contrasting leaf phenology in two white oaks, <i>Quercus magnoliifolia</i> and <i>Quercus resinosa</i> , along an altitudinal gradient in Mexico.....	50
VII.	Capítulo 3. Ecología molecular de caracteres adaptativos fenológicos de árboles de zonas templadas (revisión).....	57
VIII.	DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.....	105
IX.	LITERATURA CITADA.....	118

## Lista de figuras.

Figura 1.a) Vista general del volcán de Tequila b) Fotografía de la cara norte del volcán de Tequila .....	21
Figura 2. Imágenes de la vegetación a lo largo del transecto altitudinal en el volcán de Tequila, Jalisco .....	23
Figura 3. Desarrollo foliar de acuerdo a la escala de Derory <i>et al.</i> (2006) en <i>Q. magnoliifolia</i> .....	24
Figura 4. a) y b) árbol de <i>Q. magnoliifolia</i> en su etapa caducifolia y con hojas respectivamente; c y d) árbol de <i>Q. resinosa</i> en su etapa caducifolia y con hojas respectivamente .....	26
Fig. 1. Relationships between tree Maximum height (m), basal area (Ln[Basal area (cm <sup>2</sup> )], and the Number of basal stems per transect versus altitude in the Tequila Volcano, Mexico.....	33
Fig. 2. Relationships between leaf and stem community- weighted mean functional traits with altitude along a 2000 m gradient in the Tequila Volcano, Mexico .....	34
Fig. 3. Relationship between the first component of a principal component analysis (PC1) summarizing the leaf area, leaf mass per area and leaf dry mass content community weighted mean values (PC1 Leaf) and the PC1 summarizing bark and wood density and the Huber mean trait values (PC1 Stem) along an altitudinal gradient in Tequila Volcano.....	35
Figure S1. Study sites in Tequila Volcano, Mexico. ....	46
Figure S2. Species accumulation curves for ten horizontal transects located each 200 meters above sea level along a 2000 m altitudinal gradient at Tequila Volcano, Mexico.....	47
Figure S3. Intercommunity beta diversity estimated by dissimilarity analyses in ten horizontal transects located every 200 m of altitude .....	48
Figure S4. Relationships between tree height and diameter at breast height (DBH).....	49
Fig. 1. Leaf development for <i>Quercus magnoliifolia</i> (solid circles) and <i>Q. resinosa</i> (open circles) along an altitudinal gradient for three years (2008–2010).....	53
Fig. 2. Relationships between leaf phenology and total leaf development with mean temperatures from January to June for (a–d) <i>Quercus magnoliifolia</i> and (e–h) <i>Q. resinosa</i> .....	54
Figura 1. Clasificación funcional de secuencias expresadas marcadas estiquetada (EST) de acuerdo al centro de información para secuencias de proteínas de Munich (MIPS).....	102

## Lista de cuadros

Table 1. Functional traits studied in ten horizontal transects located every 200 meters of altitude along a 2000 m altitudinal gradient in Tequila Volcano, Mexico.....	30
Table 2. $\alpha$ - diversity indices for tree species in ten horizontal transects located every 200 of altitude along a 2000 m altitudinal gradient at Tequila Volcano, Mexico.....	31
Table 3. $R^2$ of Pearson relationships between structural, stem, and leaf functional traits vs. mean annual temperature (MAT) and mean annual rainfall (MAR).....	32
Appendix S1. Climate and vegetation along a 2000 m altitudinal gradient in the Tequila Volcano, Jalisco, Mexico. ....	40
Appendix S2. Identified species and families along a 2000 m altitudinal gradient in the Tequila Volcano, Jalisco, Mexico.....	41
Appendix S3. Structural values of plant communities sampled for each altitude level in the Tequila Volcano, Jalisco, Mexico.....	43
Appendix S4. Total number of shared species between 10 study sites along an altitudinal gradient of 2000 m in the Tequila Volcano, Jalisco, Mexico.....	44
Appendix S5. Bray Curtis dissimilarity index for 10 study sites along an altitudinal gradient of 2000 m in the Tequila Volcano, Jalisco, Mexico.....	45
Table 1. Annual rainfall (mm), mean, maximum, and minimum temperature from January to June ( $T_{\text{mean}}$ , $T_{\text{max}}$ , and $T_{\text{min}}$ , respectively; °C), and soil water potential (ws; MPa) for the five study sites in the altitudinal gradient.....	52
Tabla 1. Información genómica de los principales géneros de árboles de zonas templadas comparadas con la planta modelo <i>Arabidopsis</i> .....	100
Tabla 2. Genes relacionados a la fenología utilizados para validar experimentos de expresión por medio de RT-PCR cuantitativo.....	101
S1. Lista de los nombres de los genes utilizados en experimentos de PCR en tiempo real.....	103

## I. RESUMEN

El presente trabajo se encuentra dividido en 3 capítulos. En el primer capítulo estudiamos la diversidad  $\alpha$  y  $\beta$  de especies de árboles y la variación de caracteres funcionales de hoja y de tallo a lo largo de un gradiente altitudinal. El estudio de esas características resulta relevante en el contexto del cambio climático, ya que los caracteres funcionales son adaptativos. Para conocer la diversidad funcional en el gradiente seleccionamos 10 poblaciones en un transecto desde los 800 hasta los 2800 m de altitud. Los índices de diversidad utilizados fueron la riqueza, el índice de Shannon-Wiener y la equitatividad de Pielou. Para la diversidad  $\beta$  utilizamos el índice cuantitativo de Morisita. Los caracteres funcionales fueron la altura máxima de los árboles, el área basal, el número de tallos, la densidad del xilema, densidad de la corteza, valor de Huber, área foliar, contenido de masa seca foliar y la masa foliar por unidad de área.

Encontramos que la diversidad alfa fue independiente de la altitud mientras que el recambio de especies es casi completo en cada transecto. La altitud estuvo altamente correlacionada con caracteres funcionales de hoja y de tallo. La altura máxima, el área basal total y los promedios ponderados de la comunidad para la masa por unidad de área, contenido de masa seca y valor de Huber de los árboles estuvieron positivamente correlacionados con la altitud mientras una correlación negativa fue encontrada para el número basal de tallos.

En el segundo capítulo estudiamos la fecha de la apertura de la yema (BB) el despliegue de la hoja (LU) y la expansión de las hojas (LE) y su relación con la temperatura, la precipitación y el potencial hídrico del suelo en dos especies de encino

blanco, *Quercus magnoliifolia* y *Q. resinosa* durante tres años en el volcán de tequila. La fenología de *Q. magnoliifolia* fue monitoreada a tres altitudes 1450, 1667 y 1787 mientras que *Q. resinosa* fue estudiada a 1787, 2055 y 2110 m. El inicio de la apertura de la yema y el despliegue y ocurre más pronto en altas altitudes en *Q. magnoliifolia*, por el contrario en *Q. resinosa* la apertura de las yemas y el despliegue de las hojas ocurre más tarde en altas altitudes con temperatura más baja, en ninguna de las dos especies la fenología estuvo correlacionada con la precipitación o con los potenciales hídricos del suelo. La duración total del desarrollo foliar no estuvo significativamente correlacionada con la precipitación en *Q. magnoliifolia*, sin embargo una correlación negativa significativa con la precipitación fue encontrada en *Q. resinosa*. La fenología de ambas especies de encino muestra respuestas contrastantes a la temperatura y precipitación.

En el tercer capítulo realizamos una revisión de los aspectos genéticos y moleculares de la fenología foliar de especies de árboles crecidas en zonas templadas. Encontramos que en la formación de yemas están implicados genes de rescate celular/ defensa y respuestas a estrés. Mientras que los genes en diferentes fases de desarrollo foliar están relacionados al metabolismo, ciclo celular, factores de transcripción, energía y síntesis de proteínas. Un gran porcentaje de genes tanto en latencia como en tejidos activos se encuentran sin clasificar, lo que abre la posibilidad de profundizar para asignar las funciones a este gran conjunto de genes. Dada la naturaleza del gradiente, el gen LEA, implicado en respuestas a estrés constituye un candidato para analizar la variación natural y el estudio de la genética adaptativa de *Quercus* en gradientes altitudinales y geográficos amplios.

## ABSTRACT

This work is divided into 3 chapters. In the first chapter we study the  $\alpha$  and  $\beta$  diversity of tree species and the functional trait variation on leaf and stem along an altitudinal gradient. Research on those characteristics is relevant to the climate change context due to functional traits are adaptive. To understand functional diversity in the gradient we selected ten populations from 800 m to 2800 m. Diversity indices used were richness, the Shannon-Wiener, and the Pielou's evenness. For  $\beta$  diversity we use quantitative Morisita index. Functional characters were maximum tree height, basal area, number of stems, xylem density, bark density, Huber value, leaf area, leaf dry mass content and leaf mass per unit area.

We found alpha diversity to be independent of altitude while the species turnover is nearly complete in each transect. The altitude was highly correlated with functional characters of leaf and stem. The maximum tree height, the basal area and the community-weighted means for the mass per unit area, dry mass content and Huber value of trees were positively correlated with altitude while stems basal numbers were found to have a negative correlation with altitude.

In the second chapter we study the bud burst (BB), leaf unfolding (LU) and leaf spreading (LE) dates and its relationship with temperature, precipitation and soil water potential in two species of white oaks, *Quercus magnoliifolia* and *Q. resinosa*. This research was done during three years in the Tequila volcano. The phenology of *Q. magnoliifolia* was monitored at three altitudes 1450m, 1667m and 1787m while *Q. resinosa*

was studied at 1787m, 2055m and 2110 m. The onset of bud break and leaf unfolding occurs earlier at higher altitudes in *Q. magnoliifolia*. In contrast, onset of bud break and leaf unfolding in *Q. resinosa* occurs later at high altitudes with lower temperatures. The phenology in none of the two species was correlated with rainfall or soil water potentials. The total duration of leaf development was not significantly correlated with precipitation in *Q. magnoliifolia*. However, a significant negative correlation with rainfall was found in *Q. resinosa*. Furthermore, the leaf phenology in both species of oak exhibited contrasting responses to temperature and precipitation.

In the third chapter we review the genetic and molecular leaf phenology aspects of tree species grown in temperate zones. We found that cell rescue, cell defense and stress responses genes are involved in the bud set. In addition, genes in different stages of leaf development are related to the metabolism, cell cycle, transcription factors, energy and protein synthesis. A large percentage of genes in both latency and active tissues are unclassified. This opens the possibility for further functions assignment to this large set of genes. Given the nature of the gradient, the LEA gene involved in stress responses is a candidate to analyze natural variation and adaptive genetic study of *Quercus* in broad altitudinal and geographic gradients.

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las montañas son lugares ideales para la descripción y estudio causal de las respuestas ambientales de comunidades de plantas debido a que distancias cortas lineales causan grandes cambios ambientales (Baruch 1984). En ellas se pueden estudiar los cambios en la composición y riqueza de especies. Permiten cambios en las presiones de selección que actúan sobre caracteres relacionados a la historia de vida de las plantas ofreciendo una oportunidad para entender la variación de caracteres funcionales (Bresson *et al.* 2011) y son útiles para estudiar el efecto de la temperatura sobre la fenología eliminando el efecto de fotoperiodo (Vitasse *et al.* 2009).

En relación a la diversidad, un patrón común encontrado es que la riqueza de especies disminuya con el incremento en la elevación (Rahbek 1995) otro patrón es que la riqueza de especies muestra una forma de joroba con un pico de riqueza en elevaciones medias (Becker *et al.* 2007). A pesar de estos grandes patrones, el estudio de los cambios de la composición y riqueza de las especies en montañas subtropicales en México se encuentra pobremente documentado.

Los cambios de la biodiversidad a través de los gradientes se relaciona con cambios en la diversidad funcional de plantas (Díaz *et al.* 2007). Estos caracteres permiten definir la estrategia de explotación de los recursos por las plantas (Reich *et al.* 2003, Westoby *et al.* 2002). Caracteres funcionales, tales como, el área foliar específica, la masa foliar por unidad de área, el contenido de nutrientes foliares (C, N y P), el área foliar, la proporción masa seca/masa fresca de las hojas presentan variación en función del clima (Westoby *et*



*al.* 2002; Wright *et al.* 2004) y pueden ser indicadores útiles para modelar y predecir los efectos del cambio climático global en la vegetación (Westoby *et al.* 2002).

Los caracteres funcionales de la hoja se integran con la estructura y función del tallo en los espectros económicos (Grime *et al.* 1997; Chave *et al.* 2009; Freschet *et al.* 2010). Tales características juegan un papel crucial en determinar el éxito o falla de las especies en un ambiente dado y se traduce en determinar si estos caracteres determinan la abundancia o rareza de especies que co-ocurren en una comunidad (Cornwell y Ackerly 2010).

Otro de los caracteres de la historia de vida de las plantas es la fenología foliar. Las hojas son fundamentales para el funcionamiento de los ecosistemas terrestres porque son la vía de entrada de energía a los sistemas biológicos (Wright *et al.* 2004.). La aparición de las hojas en árboles caducifolios determina procesos como el flujo de carbono, el balance de energía, la eclosión de insectos folívoros, el tiempo de apareamiento de las aves y la elección de los sitios de anidación (Wesolowski y Rowinski 2006).

La fenología foliar en bosques templados está fuertemente correlacionada con la temperatura y fotoperiodo (Wielgolaski 1999; Rotzer y Chmielewski; 2001; Menzel 2002; Doi y Katano 2008; Vitasse *et al.* 2009), a diferencia de los árboles de zonas templadas, la fenología de árboles de regiones tropicales no está relacionada con el clima (Borchert *et al.* 2005) más bien está determinada por la variación en el estatus hídrico del árbol y la caída de las hojas viejas. Esto abre una ventana de estudio para la fenología de árboles de origen templados como el género *Quercus* que crecen en zonas tropicales y subtropicales.

Se asume que la variación en la fenología foliar en árboles de zonas templadas y frías es una característica adaptativa principalmente a la temperatura (Vitasse *et al.* 2009).

Debido a que los eventos fenológicos responden a la temperatura, este carácter se encuentra entre las primeras huellas del cambio climático documentadas (Morin *et al.* 2010). De hecho, se han registrado avances de varias semanas en la emergencia de hojas y floración de árboles de zonas templadas en relación al aumento de temperatura producto del cambio climático (Bertin 2008). Resulta relevante en este contexto entender cuáles son las variables ambientales que dirigen la fenología de los árboles de climas templados en México para entender sus posibles respuestas ante el cambio climático y una manera de abordar este problema es a través del estudio de las respuestas fenológicas, genéticas y funcionales de los árboles crecidos en gradientes altitudinales, debido a que estos gradientes simulan los cambios de temperatura pronosticadas por efecto del cambio climático.

Estudios de la expresión de genes implicados en la formación de yemas foliares y emergencia de las hojas se han realizado en *Populus* (Schrader *et al.* 2004; Rohde *et al.* 2007), *Quercus* (Derory *et al.* 2006) y *Castanea* (Santamaría *et al.* 2011). Todos ellos revelan genes candidatos importantes para el control de diferentes aspectos del desarrollo foliar.

A partir de la identificación de esos genes se ha explorado la variación nucleotídica en *Q. petraea* abriendo una nueva era de genómica funcional. Se ha encontrado variación en polimorfismos de un solo nucleótido a lo largo de dos gradientes altitudinales geográficos (Alberto *et al.* 2010; Derory *et al.* 2010) También se ha analizado la variación natural del gen de una dehidrina a lo largo de un gradiente altitudinal (Vorman *et al.* 2010) encontrándose bajos niveles de diferenciación entre poblaciones de diferente altitud. Sin embargo En *Q. crispula* se encontró una alta diversidad nucleotídica mayor que para coníferas y tan alta como la encontrada con marcadores moleculares neutros para encinos

Europeos (Quang *et al.* 2011). Los resultados contradictorios indican que son necesarios estudios en un mayor número de genes funcionales relacionados a la fenología, utilizando toda su longitud del gen incluyendo su secuencia promotora y en gradientes geográficos y altitudinales más amplios para estudiar las respuestas adaptativas a ambientes cambiantes.

## **II. ANTECEDENTES.**

### **Diversidad en relación a la altitud.**

Una de los aspectos más interesantes que se puede plantear en un gradiente altitudinal es conocer cómo cambia la composición, estructura y diversidad de las especies con el incremento de la altitud y entender si esta variación es similar en otros gradientes. Otra de las interrogantes es comprender si la distribución de especies individuales en los gradientes altitudinales tropicales y/o templados se ajustan a las hipótesis individualísticas encontradas en bosques templados o se ajustan a discontinuidades vegetales como se ha encontrado en algunas montañas tropicales (Beals 1969). El concepto de vegetación como un continuo, con una composición cambiante de especies a lo largo de gradientes surge en antítesis a la teoría de unidad-comunidad que establece que las comunidades de plantas son unidades naturales de poblaciones de especies coevolucionadas que forman unidades homogéneas, discretas y reconocibles (Austin y Smith 1989).

Un rasgo característico de las montañas altas es su zonificación vertical en cinturones elevacionales con distintos climas. Esta secuencia de cinturones y sus diferencias e interacciones a lo largo de gradiente contribuyen enormemente a la biodiversidad (UNESCO 2006). En México, las montañas albergan una gran diversidad de grupos taxonómicos filogenéticamente distantes, desde los microorganismos del suelo (bacterias, protozoarios y hongos), animales de diferentes grupos taxonómicos y plantas (Angiospermas y Gimnospermas), sin embargo son quizás los árboles el grupo más conspicuo que podemos encontrar. Por lo tanto, son los árboles elementos fundamentales para una adecuada caracterización de la composición y la estructura de muchas de las

comunidades vegetales, especialmente en bosques templados y tropicales (Miranda y Hernández-X, 1963; Rzedowski 1978)

Como un primer antecedente de la composición de la comunidad y la diversidad en bosques neotropicales en gradientes ambientales y geográficos se sabe que existe un incremento casi lineal en la riqueza de especies neotropicales de zonas bajas, si se relaciona esos cambios con la precipitación alcanza una asíntota (saturación de la comunidad), con respecto al recambio de especies en bosques tropicales, las especies de diferentes sitios son muy variables pero las familias representadas y sus diversidades son altamente predecibles (Gentry 1988). En bosques tropicales el número de especies leñosas tiende a incrementarse con la precipitación, la estatura del bosque, la fertilidad del suelo, la tasa de intercambio del dosel y el tiempo de disturbios catastróficos y disminuye con la estacionalidad, latitud, altitud y diámetro a la altura del pecho (Givinish 1999). Los patrones de riqueza de especies en el Himalaya Nepales, el cual es el gradiente altitudinal más grande del mundo, muestran un fuerte incremento con la altitud hasta los 1,500 m. Entre los 1500-2500 hay poco cambio de especies, pero por arriba de esta altitud hay una disminución específica muy clara (Grytnes y Vetaas 2002).

Por lo tanto se pueden generalizar dos patrones recurrentes, el primero es la disminución de las especies con el incremento de altitud en bosques tropicales. Se asume que esta disminución de la riqueza está influenciada por la disminución de la temperatura y la consecuente disminución de la productividad (Rahbek 1995). El otro patrón reconocido es un incremento máximo de la diversidad en altitudes medias y su posterior disminución a altas altitudes que forma una “joroba” de riqueza de especies (Becker *et al.* 2007). Las posibles explicaciones a este último patrón son múltiples y se encuentra relacionadas con

las condiciones climáticas moderadas a media elevación (Kessler 2001), las interacciones en las metapoblaciones (Stevens 1989), los efectos de las fuentes de orígenes de los taxa (Grytnes 2003) y los procesos históricos y evolutivos que favorecen la diversidad de organismos en elevaciones medias.

Otro componente importante en un gradiente altitudinal es el fuerte recambio de especies o diversidad beta debida a la gran heterogeneidad ambiental elevacional, el recambio de especies resulta relevante para México debido a que es el componente más importante para explicar la extraordinaria diversidad de especies de nuestro país (Rodríguez *et al.* 2003). Desde el punto de vista de la conservación biológica, la diversidad beta es un componente que debe ser tomado en cuenta en el establecimiento de estrategias eficientes para la protección de áreas naturales protegidas así como de especies particulares (Scott *et al.* 1999).

### **Diversidad funcional**

La diversidad funcional es un componente que concierne al rango de cosas que los organismos hacen en las comunidades y ecosistemas (Petchey y Gastón 2006). En sentido amplio, la diversidad funcional puede ser definida como la distribución de los valores de los caracteres en una comunidad (Díaz y Cabido, 2001; Tilman 2001). Interpretar la diversidad funcional de la vegetación es importante para desentrañar las relaciones entre cambios ambientales, composición de la comunidad y los procesos ecosistémicos (Lavorel *et al.* 2008). Pocos estudios han analizado como cambia la diversidad funcional a lo largo de gradientes altitudinales (Swesson y Enquist, 2007). Bresson *et al.* (2011) documentan fuertes incrementos en la fotosíntesis con luz saturada, conductancia estomática, nitrógeno

foliar y masa foliar por área con el aumento de la altitud, mientras que el tamaño de la hoja disminuye. La densidad estomática muestra un débil incremento en encinos y no se ha encontrado tendencias en hayas (Kouwenberg *et al.* 2007). A lo largo de un gradiente de 100-3400 metros in Costa Rica, Klugle y Kessler (2011) reportaron un pico en la diversidad de caracteres funcionales en helechos epífitos a medias altitudes debidos presumiblemente a condiciones ambientales estresantes a bajas altitudes (sequía) y altas altitudes (congelación).

### **Fenología de árboles.**

Las plantas exhiben cambios fenológicos que se ajustan a patrones climáticos y que se correlacionan con condiciones ambientales adecuadas que favorecen su crecimiento y reproducción (Visser y Both 2005). Consecuentemente las plantas han evolucionado respuestas fenológicas como un mecanismo eficiente y elaborado para sobrevivir a las condiciones desfavorables experimentadas en naturaleza, adaptándose a su clima local (Horvat *et al.* 2003).

En algunas plantas de bosques templados se alterna el crecimiento activo durante la estación cálida y el cese de crecimiento durante la estación fría, este fenómeno se le conoce como latencia (Kowsloski y Pallardy 1997). El periodo de latencia es una estrategia para evitar condiciones desfavorables. Las yemas foliares, yemas laterales y semillas proveen a las plantas de un sistema para reanudar el crecimiento y reproducirse si las condiciones ambientales son adversas para los tejidos. Los tiempos de la inducción y liberación de la latencia en árboles están fuertemente correlacionados con la temperatura y el fotoperiodo (Wielgolaski 1999; Rotzer y Chmielewski 2002; Menzel 2002; Doi and Katano 2008).

Para analizar el efecto de la temperatura sobre la fenología de árboles en áreas naturales resulta útil su estudio a lo largo de gradientes altitudinales porque se elimina el efecto del fotoperiodo debido al rango latitudinal corto (Vitasse *et al.* 2009). Tomando en cuenta que la temperatura es el factor principal que controla la fenología en especies de árboles boreales y templados (Sarvas, 1972; Morin *et al.* 2010) la emergencia de las hojas es un indicador útil del impacto del calentamiento global sobre la biósfera y es una de los caracteres más fáciles de observar en la naturaleza (Badeck *et al.* 2004). En efecto, se ha documentado que el cambio climático ha alterado la salida de hojas y la floración, con una mediana de avance de 4-5 días por grado centígrado. Los eventos de otoño, como la coloración de las hojas y la caída de las hojas, usualmente se han retrasado, aunque con mayor variabilidad que la fenología de primavera. Los cambios en los eventos fenológicos que suceden en verano han sido mixtos (Bertin, 2008). La mayoría de los estudios de al menos varias décadas de duración muestran la iniciación de cambios fenológicos rápidos entre 1970 y 1980 paralelos a los patrones de cambio de temperatura (Bertin, 2008) sin embargo estos cambios han variado geográficamente.

Para el género *Quercus* existe una notable cantidad de estudios acerca de la fenología realizados principalmente en Europa en dos especies modelo: *Q. robur* y *Q. petraea*. En *Q. robur* se ha encontrado que la apertura de la yema puede variar hasta por 3 semanas en un mismo sitio, sin embargo la diferencia entre los primeros organismos en los que empiezan a salir las hojas y los últimos es casi constante (Crawley y Akhteruzzaman 1988). La emergencia de las hojas en árboles no es perfectamente sincrónica. Considerable variación clinal relacionada a la altitud y latitud con respecto a la apertura de la yema fue evidente en *Q. petraea* (Ducousso *et al.* 1996) de manera similar una alta variación en la emergencia



de las hojas ha sido observada con diferentes procedencias de *Q. petraea* y *Q. robur* (Jensen y Hansen 2008). La variación geográfica en el tiempo de apertura de la yema puede ser atribuida razonablemente a tendencias climáticas (Lechowicks 1984). Las causas de las diferencias fenológicas entre especies de una región en particular resultan ser menos claras (Lechowicks 1984). Aunque las fechas de apertura de la yema en varias especies variaron significativamente entre años en un bosque templado, el orden de la apertura de la yema siempre fue la misma, a su vez, para cada especie se encontraron individuos que consistentemente desarrollan hojas de manera temprana o tardía (Wesolowski y Rowiński 2006). De manera similar en el encino decido *Q. ithaburensis* se encontró variación fenológica entre individuos, sin embargo cada individuo mantiene un patrón fenológico similar a pesar de las diferencias fenológicas entre poblaciones y estaciones (Ne'eman 1993). Para *Q. petraea* se encontraron diferencias fenológicas entre procedencias de un gradiente altitudinal las cuales estuvieron relacionadas a la temperatura anual y al sitio de procedencia, la tendencia fue que la emergencia de las hojas fue más rápida a bajas altitudes (Vitasse *et al.* 2009). Una alta plasticidad fenotípica ha sido estimada para *Quercus petraea*, la norma de reacción indica que en promedio hay un cambio de -5.7 días de avance por un grado centígrado de incremento en la temperatura (Vitasse *et al.* 2010). La dinámica del despliegue de la hoja en *Q. pubescens* muestra un rápido patrón sigmoideo (Davi *et al.* 2011)

El estudio de la fenología en gradientes altitudinales provee de lugares con condiciones de temperatura contrastantes que pueden simular los cambios de temperatura esperados con el cambio climático. A partir de la evidencia en gradientes altitudinales se ha encontrado que el despliegue de la hojas muestra un avance con la disminución de la altitud

en especies de clima templado (Vitasse *et al.* 2009) también se ha demostrado que el encino *Q. petraea* tiene una fuerte sensibilidad a la temperatura. La mayoría de los estudios fenológicos de árboles de climas templados se han desarrollado en medias y altas altitudes de Norteamérica y Europa (Chuine y Cour, 1999; Kramer, 1995; Ducousso *et al.* 1996; van Dongen *et al.* 1997; Vitasse *et al.* 2009a; Vitasse *et al.* 2009 b; Wesolowski and Rowiński, 2006).

La otra cara de la moneda en relación a la fenología es la de árboles de zonas tropicales. Los estudios en ecosistemas tropicales indican que la fenología esta no está sincronizada por la temperatura, sequía o variación estacional de la lluvia (Borchert, 2000; Borchert *et al.* 2005). La fenología de árboles tropicales no se puede pronosticar a partir de datos climáticos debido a que la apertura de las yemas y la salida de las hojas está determinada por variables no climáticas tales como la variación estacional del estatus hídrico del árbol, la longitud del día y la caída de las hojas viejas (Borchert, 1994a, b, 2004; Rivera *et al.* 2002; Borchert *et al.* 2005). Poco se sabe de las respuestas fenológicas en árboles de origen templado crecidos en zonas tropicales y subtropicales (Borchert *et al.* 2005) y de la posible utilidad de los estudios fenológicos para asegurar los efectos del cambio climático.

### **Genética de la fenología de árboles de zonas templadas.**

El tiempo de la brotación de las yemas en *Quercus* es un rasgo cuantitativo con un bajo a un fuerte control genético medido por valores de heredabilidad ( $h^2$ ) estimada entre 0.15-0.87 (Jenssen 1993; Scotti-Saintagne *et al.* 2004). En *Q. robur* 32 QTL controlan la apertura de la yema, los cuales representan al menos 12 genes o regiones cromosómicas

que controlan ese carácter (Scotti-Saintagne *et al.* 2004). También se han detectado algunos loci responsables de la apertura temprana y tardía en cruzas híbridas de *Quercus* (Gailing *et al.* 2005). Asociaciones congruentes entre marcadores/fenotipos y posiciones estimadas así como efectos de QTL en diferentes genotipos se consideran como un indicador para la transferibilidad de marcadores QTL entre especies (Toojinda *et al.* 1998). Por ejemplo Algunos QTLs se encuentran en las mismas regiones entre *C. sativa* y *Q. robur* (Casasoli *et al.* 2006). Los recursos genómicos para el género han incrementado enormemente en los últimos 10 años particularmente para dos especies modelo: *Q. robur* y *Q. petraea*. La disponibilidad de EST para estas dos especies permitió generar un mapa de posiciones (bin map) que pueden facilitar la disección de QTLs que afectan caracteres complejos de importancia ecológica en este género (Durand *et al.* 2010). Estos recursos permiten por un lado develar genes candidatos relevantes para caracterizar los sistemas moleculares que subyacen la fenología. Estos recursos también permiten comprender las adaptaciones de las plantas al ambiente y al cambio climático.

En *Q. petraea* se han realizado análisis transcriptómicos que combinan diferentes técnicas, como bibliotecas de supresión sustracción (SSH), macroarreglos y RT-PCR cuantitativo. Cientos de transcritos diferencialmente expresados fueron encontrados en 6 estados de desarrollo fenológico en esta especie. Las principales funciones asociadas a esos transcritos fueron rescate celular/defensa, metabolismo, síntesis de proteínas y transcritos relacionados al ciclo celular y factores de transcripción (Derory *et al.* 2006).

Las funciones para los productos de los genes regulados en la fenología de *Q. petraea* se encuentran en relación a los grupos funcionales encontrados, por ejemplo las proteínas de rescate/defensa celular como LEA (late embryogenesis abundant) las cuales

son una familia grande de proteínas de plantas que se encuentran almacenadas en las semillas. Su presencia en tejidos vegetativos está restringida a situaciones de estrés osmótico (Colmenero-Flores *et al.*, 1999). En plantas superiores las proteínas LEA se expresan en diferentes estadios de la embriogénesis tardía, en los embriones de las semillas y bajo condiciones de estrés y desecación (Shing *et al.*, 2006). En relación a la galactinol sintasa se conoce que muchas plantas superiores acumulan oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFOs) durante la maduración de las semillas. Estos carbohidratos están formados de unidades de galactosa unidas a la sacarosa vía enlaces glucosídicos  $\alpha(1\rightarrow6)$ . Se ha propuesto que los RFOs actúan como agentes protectores durante la desecación y almacén de semillas en la estación seca (Peterbauer *et al.*, 2001). Las plantas han evolucionado cierto grado de resistencia a las plagas y enfermedades a través de la producción de compuestos de defensa, los cuales pueden ser de naturaleza no proteínica como los antibióticos, alcaloides, terpenos glucógenos, cianogénicos o pueden ser proteicos como las quitinasas,  $\beta$ -glucanasas, lectinas, arcelinas, vicilinas, sisteminas y inhibidores de enzimas (Franco *et al.*, 2002) Como la  $\alpha$ -amilasa/subtilisina.

Referente a los genes que participan en el ciclo celular y los que son factores de transcripción está demostrado que la degradación de proteínas juega un papel clave en la regulación de las transiciones del ciclo celular. La entrada a la fase S, la separación de las cromátidas hermanas y la salida de la mitosis son todas dependientes de la degradación de las proteínas por el proteosoma (Hoyt, 1997; King *et al.*, 1996). La proteína cinasa asociada a la fase S ha sido identificada como una de las proteínas de la caja-F requeridas para la ubiquitinación y la consecuente degradación de p27 tanto en vivo como *in vitro* (Pagano *et al.*, 1995). La cuantificación de los transcritos de esta proteína y sus funciones reportadas

sugieren que la división y la diferenciación celular ocurren durante la expansión foliar y que esta proteína juega un papel importante en el desarrollo de las nuevas hojas. Por otro lado la proteína SF21 juega una función en las interacciones polen-pistilo durante el crecimiento del tubo polínico (Kräuter-Caham, 1997). Al igual que la proteína cinasa asociada a la fase S, la proteína SF21 probablemente juega una función importante durante la división celular.

Dentro de los genes relacionados al metabolismo se validó la expresión de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa. La gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa cataliza la oxidación de un aldehído (el gliceraldehído3-fosfato) y sintetiza un acil fosfato, el 1, 3 bifosfoglicerato. Se ha demostrado que un incremento en la actividad enzimática de la vía glucolítica sucede con la liberación de la latencia (Wang *et al.*, 1991). En esa misma especie también se conocen los perfiles de transcripción durante la eco y la endolatenia (Ueno *et al.* 2013). Los genes identificados en el sistema molecular de la latencia de yemas están relacionados a las respuestas a ácido abscísico (ABA), respuesta a estrés por frío y respuestas a estrés oxidativo (Ueno *et al.* 2013).

A partir del análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes relacionados a la apertura de yemas (Derory *et al.* 2006) se estudió la huella de la selección natural a lo largo de dos gradientes altitudinales (Alberto *et al.* 2010). Se encontraron SNP en 15 genes y se observaron variaciones clinales en seis SNPs. Se obtuvo evidencia de selección convergente y variación clinal para unos pocos genes (Alberto *et al.* 2010). La variación en 9 genes candidatos para la apertura de la yema en esa misma especie también ha sido explorada a lo largo de gradientes geográficos y se ha encontrado una alta diversidad nucleotídica, la cual también ha sido observada en *Q. crispula* (Quang

*et al.* 2008) sin embargo la diferenciación poblacional no fue más grande que la encontrada a partir de microsatélites y los polimorfismos de un solo nucleótido no se desviaron de la expectativa neutral, lo cual contrasta con asociaciones significativas que han sido observadas entre genes funcionales y la apertura de la yema en poblaciones segregantes (Derory *et al.* 2010).

## **Hipótesis.**

Existe un patrón de variación en caracteres morfológicos, fenológicos y fisiológicos a lo largo de un gradiente altitudinal que indica una posible adaptación local de las poblaciones de *Quercus magnoliifolia* y *Q. resinosa* a las diferentes condiciones climáticas. Esta variación presenta dos componentes, uno ambiental y otro genético; éste último componente podrá ser utilizado como un indicador para elaborar modelos predictivos de la respuesta de los encinos ante escenarios de cambio climático.

## **Objetivo general.**

Analizar la variación de caracteres funcionales y fenológicos de las especies *Quercus magnoliifolia* Neé y *Quercus resinosa* Liebm a lo largo de un gradiente altitudinal y su relación con variables ambientales para sugerir probables respuestas de la vegetación al cambio climático.

## **Objetivos específicos.**

1. Determinar la estructura y diversidad  $\alpha$  y  $\beta$  en un gradiente altitudinal.
2. Caracterizar los atributos funcionales de árboles a lo largo de un gradiente altitudinal.
3. Estudiar los patrones fenológicos de las yemas apicales de *Quercus magnoliifolia* y *Quercus resinosa* en el gradiente altitudinal.
4. Establecer correlaciones entre la variación de caracteres funcionales y la variación de caracteres ambientales.
5. Cuantificar la expresión de genes asociados a la fenología foliar.
6. Integrar la información y sugerir caracteres potencialmente adaptativos ante escenarios de cambio climático global.

## Sitio de estudio.

Se eligió como gradiente altitudinal el volcán de Tequila, Jalisco (figura 1) localizado en la provincia fisiográfica de la faja volcánica transMexicana (Ferrusquía-Villafranca, 1993) ( $20^{\circ} 50' N$ ;  $103^{\circ} 51' W$ ) y que cuenta con una altura máxima de 2890 metros de altitud el cual está constituido de rocas ígneas del cuaternario y terciario (INEGI, 2013), los tipos de suelos encontrados a lo largo del gradiente son feozem y luvisol.



Figura 1.a) Vista general del volcán de Tequila con los sitios estudiados (imagen tomada de Google Earth) b) Fotografía de la cara norte del volcán de Tequila ([www.skyscrapelife.com](http://www.skyscrapelife.com)).



Para los estudios de diversidad  $\alpha$ ,  $\beta$  y funcional se eligió un gradiente de 800 a 2800 metros, se escogieron 10 sitios con una diferencia de altitud de 200 m (figura 1a). La vegetación y el clima cambian a lo largo del gradiente (figura 2). Climáticamente el gradiente se divide en dos tipos principales, climas calientes subhúmedos con lluvias en verano se encuentran de los 800 a los 1800 y climas templados subhúmedos con lluvias en verano se encuentran de los 2000 a los 2800 metros, sin embargo se presentan variaciones en cuanto a la humedad en ambos climas ya que encontramos sitios con baja, media y alta humedad dependiendo del estrato altitudinal (figura 2). El tipo de vegetación también cambia a lo largo del gradiente, prácticamente tenemos un distinto tipo de vegetación en cada piso altitudinal (figura 2). En la parte baja del gradiente a 800 m la vegetación dominante es el bosque tropical seco, a los 1000 metros la vegetación ha sido modificada por cultivares de *Agave tequilana* W. var. Azul y se pueden observar manchones de selva baja caducifolia. A los 1200 encontramos selva mediana subcaducifolia. A los 1400 se encuentra el ecotono entre la vegetación seca y el bosque de *Quercus*. A los 1600 la vegetación es un bosque monoespecífico de *Q. magnoliifolia*. De los 1800 a los 2200 es un bosque de Pino-encino y a los 2400 es bosque mesófilo de montaña. De los 2600 hasta la cima del volcán es un bosque de encino con dos especies dominantes, *Q. laurina* y *Q. rugosa*

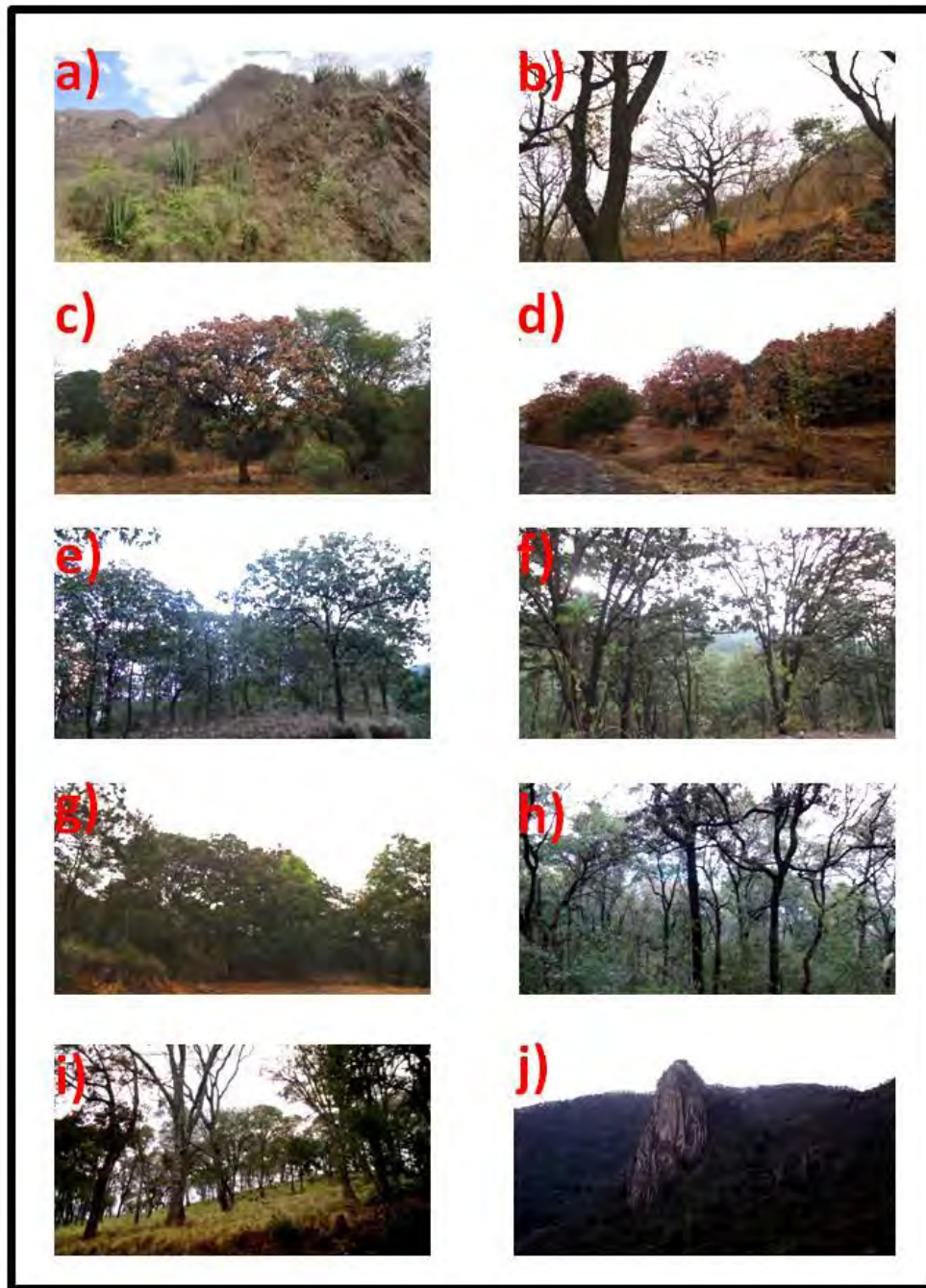


Figura 2. Imágenes de la vegetación a lo largo del transecto altitudinal en el volcán de Tequila, Jalisco. a) 800 m, bosque tropical seco, A(w0); b) 1200 m, bosque tropical subcaducifolio, A(w0); c) 1400 Bosque tropical seco mezclado con bosque de Quercus, A(w0); d) 1600 Bosque de *Q. magnoliifolia* puro, A(w1); e) 1800 m, Bosque de pino-encino A(w1); 2000 m, bosque de pino-encino C(w1); 2200 m, bosque de pino-encino,

C(w1); 2400 m, Bosque mesófilo de montaña, C(w1); 2600 m, Bosque de encino C(w2);  
2800 m, Bosque de encino C(w2).

## Fenología

Con respecto a la fenología foliar se eligieron dos especies como modelo de estudio *Q. magnoliifolia* y *Q. resinosa*, se presenta a continuación una descripción breve de ambas. Para estudiar este carácter se utilizó la escala de Derory *et al* (2006), el proceso de desarrollo foliar en *Q. magnoliifolia* se encuentra representado en la figura 3.



Figura 3. Desarrollo foliar de acuerdo a la escala de Derory *et al* (2006) en *Q. magnoliifolia*  
I) yema quiescente II) yema hinchada III) apertura de la yema IV) las hojas comienzan a  
crecer V) despliegue de las hojas VI) los internodos crecen. Un proceso de desarrollo  
similar sucede en *Q. resinosa*.

## **Descripción de las especies estudiadas**

### ***Q. magnoliifolia* Neé, An.Ci.Nat.268.1802**

*Q. magnoliifolia* Neé se distribuye en 11 estados de la república Mexicana y llega hasta Centroamérica. Tiene una amplia distribución altitudinal (170-2900 m), es una especie que alcanza bajas altitudes. Los árboles en Jalisco alcanzan una altura de 5-10 metros y un diámetro del tallo de 30 a 60 cm (figura 4a y 4b). La corteza es café clara a oscura y agrietada. La hoja es obovada de 7.5 a 23 cm de largo por 3.5 a 13 cm de ancho; margen con 12 a 17 dientes a cada lado; haz verde lustroso y casi glabro; envés verde pálido tomentoso. Su fruto es anual, solitario; bellota ovoide de 17 a 21 mm de largo por 11 a 12 mm de diámetro. Sus usos son leña, carbón, fabricación de postes, horcones y extracción de celulosa para papel (González-Villareal, 1986).

### ***Q. resinosa* Liebm., Overs.Dansk.Vidensk.Selsk.182.1854.**

*Q. resinosa* Liebm es una especie que se distribuye en 11 estados de la república Mexicana, altitudinalmente se encuentra entre 14450 a 2500 metros. Los árboles miden 6-10 m de altura, frecuentemente tienen un tallo corto de 30 a 70 centímetros de diámetro (figura 4c y 4d). Es común la asociación con *Q. magnoliifolia*. Usualmente ocupa hábitats más secos que *Q. magnoliifolia*. Su corteza es gris con escamas gruesas. La hoja es obovada de 15 a 36 cm de largo por 5 a 26 cm de ancho; margen con 8 a 18 dientes en cada lado; haz verde lustroso y rugoso, envés verde-pálido o amarillento y tomentoso. Fruto anual, solitario y en grupos de 2 ó 3; bellota ovoide de 15 a 35 mm de largo por 15 a 30 mm de diámetro. Sus usos son: leña, carbón fabricación de postes, horcones y cabos para herramienta (González-Villareal, 1986).

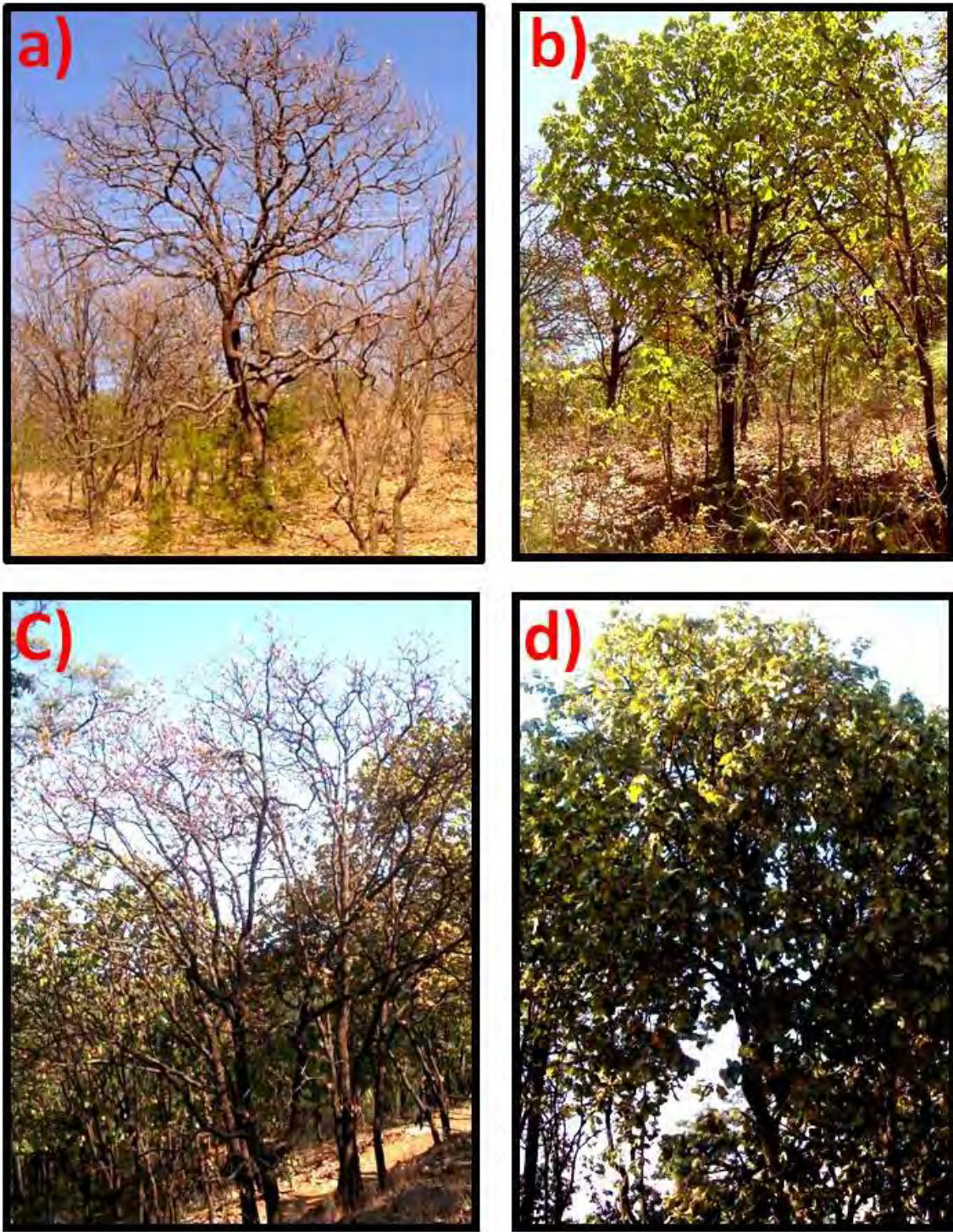


Figura 4. a) y b) árbol de *Q. magnoliifolia* en su etapa caducifolia y con hojas respectivamente; c y d) árbol de *Q. resinosa* en su etapa caducifolia y con hojas respectivamente.

V.

**Erasto Hernández Calderón, Rodrigo Méndez-Alonzo, Juan Martínez-Cruz, Antonio González-Rodríguez, and Ken Oyama Nakagawa.**

**Altitudinal changes in tree leaf and stem functional diversity in a semitropical mountain.**

**Journal of Vegetation Science. First published online: 15 FEB 2014 DOI: 10.1111/jvs.12158**



# Altitudinal changes in tree leaf and stem functional diversity in a semi-tropical mountain

Erasto Hernández-Calderón\*, Rodrigo Méndez-Alonzo\*, Juan Martínez-Cruz, Antonio González-Rodríguez & Ken Oyama

## Keywords

Altitude; Community-weighted mean; Community assembly; Functional traits; Mexico; Huber value; Tree allometry; Tree height

## Nomenclature

APG III

## Abbreviations

BA = total basal area; BCd = Bray–Curtis dissimilarity; CWM = community-weighted mean trait value;  $H_{max}$  = maximum tree height; HV = Huber value; LA = leaf area; LDMC = leaf dry mass content; LMA = leaf mass per unit area; MAT = mean annual temperature; MAP = mean annual precipitation; NBS = number of basal stems;  $\rho_{bark}$  = bark density;  $\rho_{wood}$  = xylem density

Received 5 June 2013

Accepted 17 December 2013

Co-ordinating Editor: Stephen Roxburgh

---

## Hernández-Calderón, E.

(eras3000@yahoo.mx),

**Martínez-Cruz, J.** (jmc@cieco.unam.mx) &

**González-Rodríguez, A.**

(agrodrig@cieco.unam.mx): Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701 Col. Ex-Hacienda de San José de La Huerta, Morelia Michoacán, 58190, México

**Méndez-Alonzo, R.**

(rmendezalonzo@gmail.com): Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of California, 621 Charles Young Dr. S., Los Angeles, CA, 90095, USA

**Oyama, K.** (corresponding author,

kenoyama@cieco.unam.mx): Escuela Nacional de Estudios Superiores Campus Morelia and Centro de Investigaciones en Ecosistemas, UNAM, Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701 Col. Ex-Hacienda de San José de La Huerta, Morelia Michoacán, 58190, México

\*Equal contribution by the authors.

## Abstract

**Question:** Along an altitudinal gradient of 2000 m in a semi-tropical mountain, we explored the relation between tree specific diversity and community functional composition by studying variations in tree allometry, stem and leaf functional traits, and their relationship with temperature and precipitation.

**Location:** Tequila Volcano, Jalisco, Mexico (20°48' N, 103°51' W).

**Methods:** We surveyed tree specific diversity, five forest structural parameters and six functional traits in ten horizontal transects (50–75 m in length) located every 200 m along a 2000-m gradient (from 800 to 2800 m a.s.l.). We calculated alpha and beta diversity, and quantified the community-weighted means for wood and bark density, Huber value (sapwood to leaf area ratio), leaf area, leaf dry mass content and leaf mass per unit area. The patterns of association were explored using Pearson correlations, and summarized using PCA.

**Results:** Alpha diversity was independent of altitude, and species turnover was almost complete between consecutive transects. Altitude (and its associated abiotic factors, temperature and precipitation) were highly correlated with functional traits. Maximum tree height, total basal area and the community-weighted mean values for leaf mass per unit area, leaf dry mass content, and the Huber values were positively correlated with altitude, and the opposite was found for the number of basal stems. Stem and leaf trait values were correlated along the altitudinal gradient.

**Conclusions:** Altitude imposes environmental filters at the community scale that determine a high species replacement. Stem and leaf traits were correlated along the gradient; trees at higher altitudes were taller with a single stem, higher density of wood and bark, and leaves with higher leaf mass per area and dry mass content than in the low-altitude sites. These results suggest the consistency of a fast–slow acquisitive trade-off across environments, tending to promote slow acquisition and high longevity at higher altitudes.

## Introduction

The variation in plant functional traits within and across environments has been a primary topic in ecology (Grime et al. 1997; Díaz et al. 2004). To identify whether there is co-variation of traits that are associated with or governed by climate is a critical issue, and it is also useful to predict the consequences of the current climatic changes due to anthropogenic modification. In turn, functional traits are also useful to detect patterns of association and assembly rules within and across communities (Cornwell et al. 2006; Cornwell & Ackerly 2009), particularly as the number and characteristics of the species that are able to survive and compete in any given environment are subjected to selective pressures due to abiotic environmental filters (Cavender-Bares et al. 2009; Cornwell & Ackerly 2009). Surveying vegetation on the basis of functional traits offers a means to understand the global variation in structure and function of vegetation (Díaz et al. 2007).

One of the most useful natural settings to detect changes in diversity, structure and functional composition of vegetation is offered by altitudinal gradients (Rahbek 2005; Körner 2007). There are several advantages of using mountain ranges, particularly tropical mountains, to understand the variation in functional traits in vegetation surveys. First, altitude presents similar environmental constraints to latitude because an increase of 100 m in altitude is correlated with a reduction of average temperature by 0.55 °C, and this shift in turn modifies important biological processes such as phenology (Fitzjarrald et al. 2001; Körner 2007). Second, tropical plants have relatively smaller ranges of thermal tolerance in comparison with their higher latitude counterparts. This lower thermal tolerance, in turn, shapes the low overlap between temperature niches that are observed in tropical mountain species. The limited ability of tropical species to acclimate to a wide range of temperatures may result in stronger environmental filters in tropical than in temperate altitudinal gradients (Janzen 1967; Ghalambor et al. 2006). Third, surveying mountains offers a more rapid way to understand variations across a larger variety of climates than do surveys in other types of land form (Rahbek 2005; Körner 2007). Finally, there are an increasing number of studies that allow comparison between the patterns of variation in functional traits and biodiversity globally, therefore increasing the comparative and predictive value of this type of experimental design (Rahbek 2005; Körner 2007).

Although research on the biodiversity and functional composition of vegetation in mountain ranges has been fruitful, there are still important gaps in our knowledge. Semi-tropical mountains are important repositories of biodiversity that are threatened by the interactive effect of climate change and habitat modification (Myers et al. 2000;

Brooks et al. 2006; Conde et al. 2011), but only a few studies have explored the variation in biodiversity and functional composition along altitudinal gradients of precipitation and temperature. Functional traits, such as leaf mass per area (LMA) and leaf dry mass content (LDMC), are critical traits to understand leaf economics, reflecting the amount of material invested per photosynthetic areal unit, being important indicators of plant exploitation schemes (Wilson et al. 1999; Westoby et al. 2002). However, the results found for the variation in functional traits along altitudinal gradients is controversial. For example, in oak and beech species growing in a temperate forest in France between 400 and 1600 m a.s.l., there is an increase in LMA, LDMC, carbon (C) assimilation and nutrient content with altitude, which are associated with an increase in C assimilation and stomatal conductance (Bresson et al. 2011; Thomas 2011). In contrast, results for other types of vegetation suggest that increasing altitude reduces C assimilation, plant height and seed output, and increases LMA (De Bello et al. 2012; Hulshof et al. 2013). High-altitude trees even achieve record foliar longevities, probably as a selective pressure to maintain extremely low acquisition rates in low resource and extreme climate environments (Ewers & Schmid 1981; Bresson et al. 2011). Regarding wood functional traits, there is little evidence to provide a predictive framework of response to altitude, although we can expect that the variation in these traits will reflect the variation in water status because the traits that confer resistance to water scarcity are correlated with those that confer resistance to freezing (Davis et al. 1999; Cavender-Bares 2005). Studies along altitudinal gradients may also provide insights into the mechanisms that allow trait co-variation in plants. However, previous studies have found opposing results in the relationships between functional traits. For example, in tropical wet forests no correlation was detected between leaf and stem traits (Baraloto et al. 2010), but significant correlations between these traits were found in alpine environments (Freschet et al. 2010) and in tropical dry forests (Méndez-Alonzo et al. 2012a). Finding significant patterns of co-variation between functional traits along altitudinal gradients could provide further evidence of mechanisms that promote divergence in resource exploitation across biomes (Díaz et al. 2004; Sterck et al. 2011).

This study contributes to the understanding of the composition of vegetation along semi-tropical mountain ranges and, at the same time, to the exploration of the patterns of co-variation in functional, structural and diversity metrics associated with altitude and their physical components (i.e. temperature and precipitation). We tested the following predictions at the Tequila Volcano, a mountain covering an altitudinal range of 2000 m located in the occidental region of the Trans-Mexican Volcanic Belt.



Specific diversity should decrease with increasing altitude, most likely with a hump shape at intermediate altitudes, which is currently the most commonly reported pattern worldwide (Rahbek 2005). Maximum tree height, tree density and basal area should increase with altitude as a consequence of increased soil water availability at the highest altitudes in the site (ca. 3000 m). We propose this hypothesis due to the lack of altitudinal limits to tree establishment in our study area, which retains trees even at the maximum elevation of nearly 3000 m, and due to the drier climate in the lower parts of our study site. This is in contrast to the results reported in most studies conducted at higher latitudes (Petit et al. 2011; De Bello et al. 2012). Altitude will modify the community average values for leaf and stem functional traits. In particular, as a consequence of the fast–slow acquisitive trade-off, which should increase leaf and stem longevity, we expected to find increases in LMA and LDMC, and given the patterns of co-variation between plant organs, we expect an associated increase in wood and bark density (Reich et al. 1997; Díaz et al. 2004). We also measured two traits that might reflect the plant water exploitation strategy, namely the Huber value (HV), or the ratio between sapwood and leaf area (Tyree & Ewers 1991), and the number of basal stems (NBS), a trait that increases in response to water shortage (Schenk et al. 2008). We expected that HV would increase with altitude in response to increased water availability in higher areas, and NBS would show a negative relationship with altitude, as a strategy to cope with water constraints at lower elevations. Finally, we tested whether the patterns of co-variation between stem and leaf traits are preserved along the altitudinal gradient of Tequila Volcano.

## Methods

### Study site and sampling design

This study was conducted at the Tequila Volcano, Jalisco, Mexico (20°50' N, 103°50' W), during August 2011. This volcano is located in the western region of the Trans-Mexican Volcanic Belt in central-western Mexico, and is characterized by a topographic range of up to 2000 m, from approximately 700 m a.s.l. at its lower depression to 2890 m at its peak. The soils in the volcano are luvisols and pheozem. The average annual rainfall in Tequila is 849 mm·yr<sup>-1</sup>, and rainfall is concentrated between June and October (Appendix S6; National Service of Meteorology Mexico 2013, Handbook of municipal geographic information: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?e=14>). The vegetation in the foothills and lower parts of the Tequila Volcano is mainly tropical dry forest that has been almost completely transformed into agricultural land, mainly dedicated to the production

of *Agave tequilana* var. *weber*. The climates found along the volcano range from warm, low humidity sites in the lower parts, to temperate and high humidity sites in the higher parts of the volcano (Appendix S1; INEGI 2013).

The relationships between species and functional diversity were studied in ten transects located systematically every 200 m of elevation from 800 m to 2800 m. Transect location was previously selected from a GIS database, to ensure the dominance of natural vegetation and on the basis of its accessibility. All transects were orientated in an east–west direction, starting from the selected point from the GIS (with an error of ca. 20 m due to GPS readings). The transect corresponding to 1000 m a.s.l. was not established because there were no conspicuous natural vegetation stands at that altitude. Due to accessibility and to avoid environmental variation due to slope orientation, all transects were located on the northern face of the Tequila Volcano (Fig. S1). Each transect was designed to include at least 50 trees, and on average, the transect lengths varied between 50 and 75 m, with a width of 2 m. Transects were laid out with an approximate error of 10 m altitude. A pilot study confirmed a lack of spatial autocorrelation in tree density along transects, therefore we selected the first 25 trees to measure total height and diameter DBH (at 1.3-m height). We collected one sun branch at heights between 3 and 5 m from the first three individuals found per each species per transect to quantify the functional variables reported in Table 1.

### Measurement of alpha and beta diversity

Three indices of alpha diversity were calculated for each altitudinal level, after establishing the precision of the species sampling by generating species accumulation curves (number of species vs individuals identified) for each altitudinal transect:

- (1)  $S$  = Richness of species: the number of species presents at each altitudinal level,

**Table 1.** Functional traits studied in ten horizontal transects located every 200 m of altitude along a 2000-m altitudinal gradient in Tequila Volcano, Mexico.

Trait	Abbreviation	Unit
Maximum Tree Height	$H_{max}$	m
Basal Area	BA	cm <sup>2</sup>
Number of Basal Stems	NBS	–
Xylem Density	$\rho_{wood}$	g·cm <sup>-3</sup>
Bark Density	$\rho_{bark}$	g·cm <sup>-3</sup>
Huber Value	HV	–
Leaf Area	LA	cm <sup>2</sup>
Leaf Dry Mass Content	LDMC	%
Leaf Mass per Unit Area	LMA	g·cm <sup>-2</sup>

(2)  $H'$  = Shannon–Wiener diversity index, calculated as:

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \log p_i$$

(3)  $J$  = Pielou's evenness index, calculated as:

$$J = \frac{H'}{H'_{\max}}$$

where  $H'$  is Shannon diversity index and  $S$  is number of species (Krebs 1999).

To calculate the dissimilarity in community composition (beta diversity), the Bray–Curtis dissimilarity coefficient ( $BCd$ ) was estimated for each pair of samples as follows:

$$BCd = \frac{\sum_{i=1}^n |X_{ij} - X_{ik}|}{\sum_{i=1}^n (X_{ij} + X_{ik})}$$

where  $X_{ij}$  and  $X_{ik}$  are the number of individuals in species  $i$  in each sample ( $j, k$ ). After calculation of  $BCd$ , a clustering procedure was applied to all the altitudinal samples, using the unweighted pair group method with arithmetic averaging (UPGMA). Cluster analysis was performed using the PC Multi-Variate Statistical Package (MVSP; Kovach 1998) and a dendrogram was produced to graphically display the dissimilarity in plant composition between the altitudinal levels (Krebs 1999). This analysis was performed at the species and family taxonomic levels.

#### Forest structure and tree density within the transects

The following forest structural parameters were calculated for each transect: total basal area (BA,  $\text{cm}^2 \cdot \text{ha}^{-1}$ ), tree density (TD, trees  $\text{ha}^{-1}$ ), tree maximum height ( $H_{\max}$ , m), number of basal stems (NBS), and importance value of the dominant species (for each species in each transects: importance value (%) = abundance (i.e. number of individuals of species  $i$  per transect) + dominance (i.e. number of individuals of species  $i$  / total number of individuals)). The tree height was measured with an electronic clinometer (Haglöf, Sweden) and a laser rangefinder (Prostaff Laser 440, Nikon, China), and DBH (at 1.3 m) was measured using diameter tapes. The basal area (BA) for each steam was calculated as:

$$BA_{i=n} = \pi \times (dbh_n/2)^2$$

The BA of multi-stemmed trees was calculated as a sum of all areas. To estimate the maximum height that trees can achieve along the altitudinal gradient, a non-linear function that has been useful to estimate maximum height in a wide range of communities (Thomas 1996; Thomas & Bazzaz 1999; Cavender-Bares et al. 2004; Méndez-Alonzo

et al. 2012b) was fitted to at least 25 individuals per transect:

$$H = H_{\max} (1 - e^{-aD}),$$

where  $H$  is tree height,  $D$  is DBH,  $H_{\max}$  is asymptotic height and  $a$  is an allometric slope constant (Méndez-Alonzo et al. 2012b). The allometric estimates were calculated using the Maquardt–Levenberg least square algorithms using the Sigma Plot 10.0 curve fitter (Marquardt 1963).

#### Stem functional traits

For the first three individuals of each species found per transect, the following stem traits were measured: wood and bark density ( $\rho_{\text{wood}}$  and  $\rho_{\text{bark}}$ , respectively) using  $1 \text{ cm}^3$  stem segments with the pith removed. The bark and wood volumes were calculated using Archimedes method, immersing the samples in a vial filled with water inside an analytical balance, and the individual bark and wood segments were oven-dried for at least 72 h at  $90^\circ \text{C}$  before dry weight measurements (Cornelissen et al. 2003). The sapwood sectional diameter ( $d$ ) was measured to 0.1 mm precision using digital calipers, and sapwood sectional area ( $S$ ) was calculated as  $S = (\pi \times d^2) / 2$  (Table 1).

#### Leaf functional traits

From the same set of branches used to calculate the stem functional traits, the following leaf traits were measured: leaf area (LA), leaf dry mass content (LDMC) and leaf mass per unit area (LMA). To calculate LA, the leaves were scanned within 1 or 2 days of collection (Epson Perfection 4490; Epson Corp. Nagano, JP, US), and LA was quantified using WinFolia Pro 2009 (Regent Instruments, Quebec, CA, US). The fresh weight of leaves was measured and then the leaves were oven-dried at  $70^\circ \text{C}$  for at least 72 h. The LMA ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) was calculated as leaf dry mass / LA. The LDMC (%) was calculated as  $1 - [(\text{fresh mass} - \text{dry mass}) / \text{fresh mass}] \times 100$  (Wilson et al. 1999).

Using the ratio between  $S$  and LA, the Huber value (HV) was calculated. This value is a measure of the relative hydraulic capability of a stem segment per unit of leaf area supported (Tyree & Ewers 1991), where a higher value represents a higher investment in stem per leaf unit.

#### Data analysis

Functional traits were studied at the community level by estimating the community-weighted mean values per trait (CWM; Garnier et al. 2004; Diaz et al. 2007; Hulshof et al. 2013; Lohbeck et al. 2013). This metric indicates the potential average value that a functional trait can have for any plant within individual transects, and is estimated as:

$$CMW = \sum_{i=1}^S w_i \times x_i$$

where  $S$  is the total number of species,  $w_i$  is total basal area of the  $i$ th species and  $x_i$  is the trait value of the  $i$ th species (Lohbeck et al. 2013).

The relationships between species richness, alpha diversity indices, and the community-weighted values of each functional trait with altitude were explored using Pearson correlations. To test if the stem and leaf traits were coordinated along our altitudinal gradient, we summarize, via PCA, the information of HV,  $\rho_{\text{wood}}$ , and  $\rho_{\text{bark}}$  into one principal component and the LA, LMA and LDMC into another principal component, and these were further correlated using Pearson correlations. The mean annual temperature (MAT) and mean annual precipitation (MAP) were measured *in situ* for several altitudes (Hernández-Calderón et al. 2013), and the climatic variables for 800 and 1200 m were obtained from the meteorological stations Presa Santa Rosa and Tequila (National Service of Meteorology Mexico 2013, [http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=42&Itemid=75](http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=42&Itemid=75)). MAT and MAP values were extrapolated for the altitudes where no data were available (2200 to 2800 m), using the following formulae:

MAT = 30.057 – 0.0062 (altitude), ( $R^2 = 0.97$ ,  $P < 0.001$ )  
 MAP = 1000.377 – 0.119 (altitude), ( $R^2 = 0.51$ ,  $P < 0.05$ )

The discrepancy between observed and predicted values ranged from 1 to 5% for MAT and between 0.7 to 14.0% for MAP. Finally, MAP and MAT values were correlated with our set of structural and functional traits. We corrected the significance of our associations using Bonferroni corrections for a set of 22 pair-wise correlations ( $\alpha = 0.0023$ ).

## Results

### Alpha and beta diversity along the altitudinal gradient

Overall, we identified 52 species from 502 trees (Appendix S2). From this data set, 13 species belonged to the genus *Quercus*, and were the dominant element in the landscape from 1400 m to 2800 m a.s.l. (Appendix S3). The tree species richness per transect along the altitudinal gradient ranged from three to 13 species (Table 2). The evenness index in most transects had medium to high values (0.56–0.91), with the lowest evenness found at 1600 m (0.29; Table 2). To estimate the precision of our sampling, we generated species accumulation curves (Fig. S2). In most cases, an asymptote was reached after identifying 20–30 individuals, with the exception of the 1200 m altitude level, which was an outlier regarding asymptotic species richness (Fig. S2). None of our

metrics of alpha diversity were correlated with altitude, MAP or MAT (Table 2).

We detected nearly complete species replacement along the altitudinal gradient, and this was also found for families in the lower part of the Tequila Volcano (Fig. S3, Appendix S5). The turnover of species from sites at 800 m and 1200 m with other altitudinal communities is complete ( $BCd = 1$ ; shared species = 0), where tropical species dominate the landscape between 800–1200 m, while oaks and other temperate-originated species dominate the landscape from 1400–2800 m (Fig. S3, Appendix S3). The more similar sites in terms of shared species were 1800–2000 m ( $BCd = 0.525$ , shared species = 3; Appendix S4, S5) and 2400–2600 m sites ( $BCd = 0.48$ , shared species = 4). For the rest of the transects, the range of dissimilarity indices ( $BCd$  with values other than 1) varied between 0.72 to 0.98, and the shared species ranged between zero and four (Appendix S4, S5). In contrast, for families, the cluster analysis showed low dissimilarity, particularly between transects 1600–2800 m, due to the dominance of Fagaceae in the highest portion of the volcano (Fig. S3, Appendix S4 and S5).

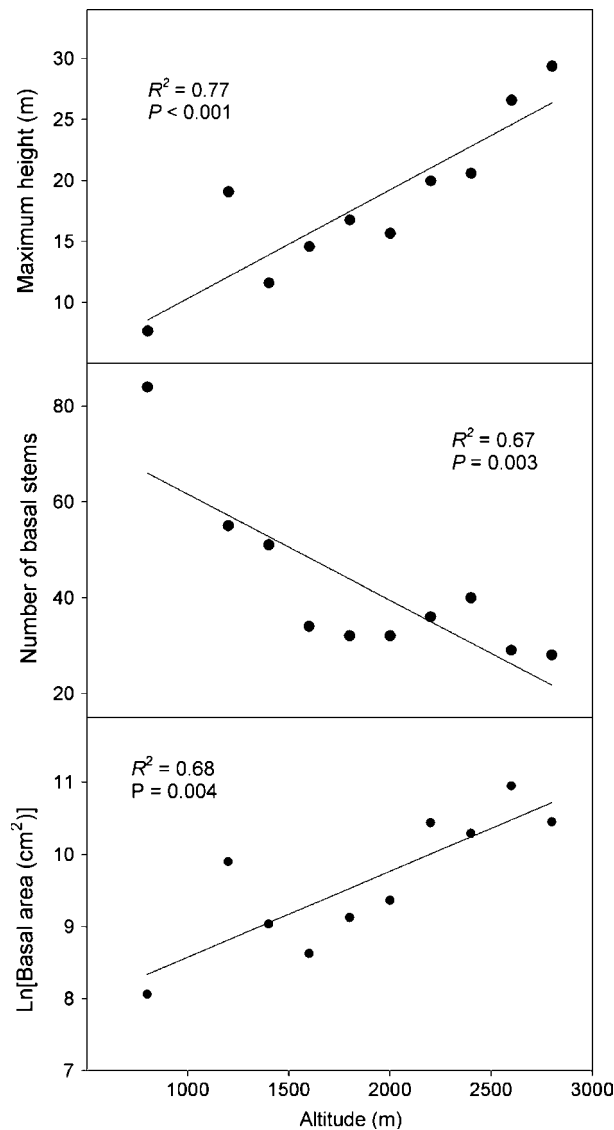
### Forest structure and its relationship with altitude

Two forest structural parameters, namely  $H_{\text{max}}$  and BA, were positively correlated with altitude, and one, NBS, was negatively correlated with altitude (Fig. 1, Fig. S4). Due to the co-variation between altitude and environmental metrics, we also detected significant positive correlations of  $H_{\text{max}}$  and BA with MAT and MAP (Table 3).

Along the altitudinal gradient there were conspicuous variations in vegetation cover and composition. The forest types along the northern slope of Tequila Volcano ranged from a seasonally tropical dry forest at 800 m to a tropical sub-deciduous forest at 1200 m. At 1400 m, a marked ecotone between tropical dry forest and oak forest was found,

**Table 2.** Alpha diversity indices for tree species in ten horizontal transects located every 200 m of altitude along a 2000-m altitudinal gradient at Tequila Volcano, Mexico.

Altitude (m)	Richness	Diversity ( $H'$ )	Evenness ( $J'$ )
800	10	1.64	0.71
1200	13	1.87	0.73
1400	12	2.17	0.87
1600	3	0.32	0.29
1800	5	1.38	0.86
2000	5	0.91	0.56
2200	8	1.89	0.91
2400	9	1.86	0.85
2600	7	1.53	0.79
2800	3	0.87	0.79



**Fig. 1.** Relationships between tree maximum height (*m*), basal area ( $\ln$  [Basal area ( $\text{cm}^2$ )] and number of basal stems per transect vs altitude in the Tequila Volcano, Mexico.

followed at 1600 m by an almost pure *Q. magnoliifolia* forest. From 1800 to 2200 m, the vegetation changed to an oak–pine dominated forest, at 2400 m the vegetation was dominated by cloud forest elements and, finally, between 2600 to 2800 m, the vegetation was a *Quercus* forest (Appendix S1, S2).

**Variation in functional traits along the altitudinal gradient**

Altitude was strongly associated with changes in functional composition at the community level. From our set of six CWM functional trait values, four showed significant

**Table 3.**  $R^2$  of Pearson relationships between structural, stem and leaf functional traits vs MAT and MAR.

Trait	MAT	MAR
Structural traits		
$H_{max}$	−0.85*	−0.75*
Basal area	−0.79*	−0.65 <sup>n.s.</sup>
NBS	0.81*	0.60 <sup>n.s.</sup>
Tree density	0.50 <sup>n.s.</sup>	0.45 <sup>n.s.</sup>
Dominant species	0.09 <sup>n.s.</sup>	0.30 <sup>n.s.</sup>
Stem Traits		
$\rho_{wood}$	−0.39 <sup>n.s.</sup>	−0.04 <sup>n.s.</sup>
$\rho_{bark}$	−0.75 <sup>n.s.</sup>	−0.40 <sup>n.s.</sup>
HV	−0.82*	−0.58 <sup>n.s.</sup>
Leaf traits		
LA	0.23 <sup>n.s.</sup>	−0.049 <sup>n.s.</sup>
LMA	−0.88**	−0.71 <sup>n.s.</sup>
LDMC	−0.79*	−0.60 <sup>n.s.</sup>

MAT, mean annual temperature; MAR, mean annual rainfall. \*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.001$ ,  $P < 0.0023$ , n.s. =  $P > 0.0023$ . Significance values were corrected with Bonferroni corrections. Abbreviations follow Table 1.

positive correlations with altitude, namely, HV, LMA, LDMC and  $\rho_{bark}$  (Fig. 2). LA and  $\rho_{wood}$  were unrelated to altitude (Fig. 2).

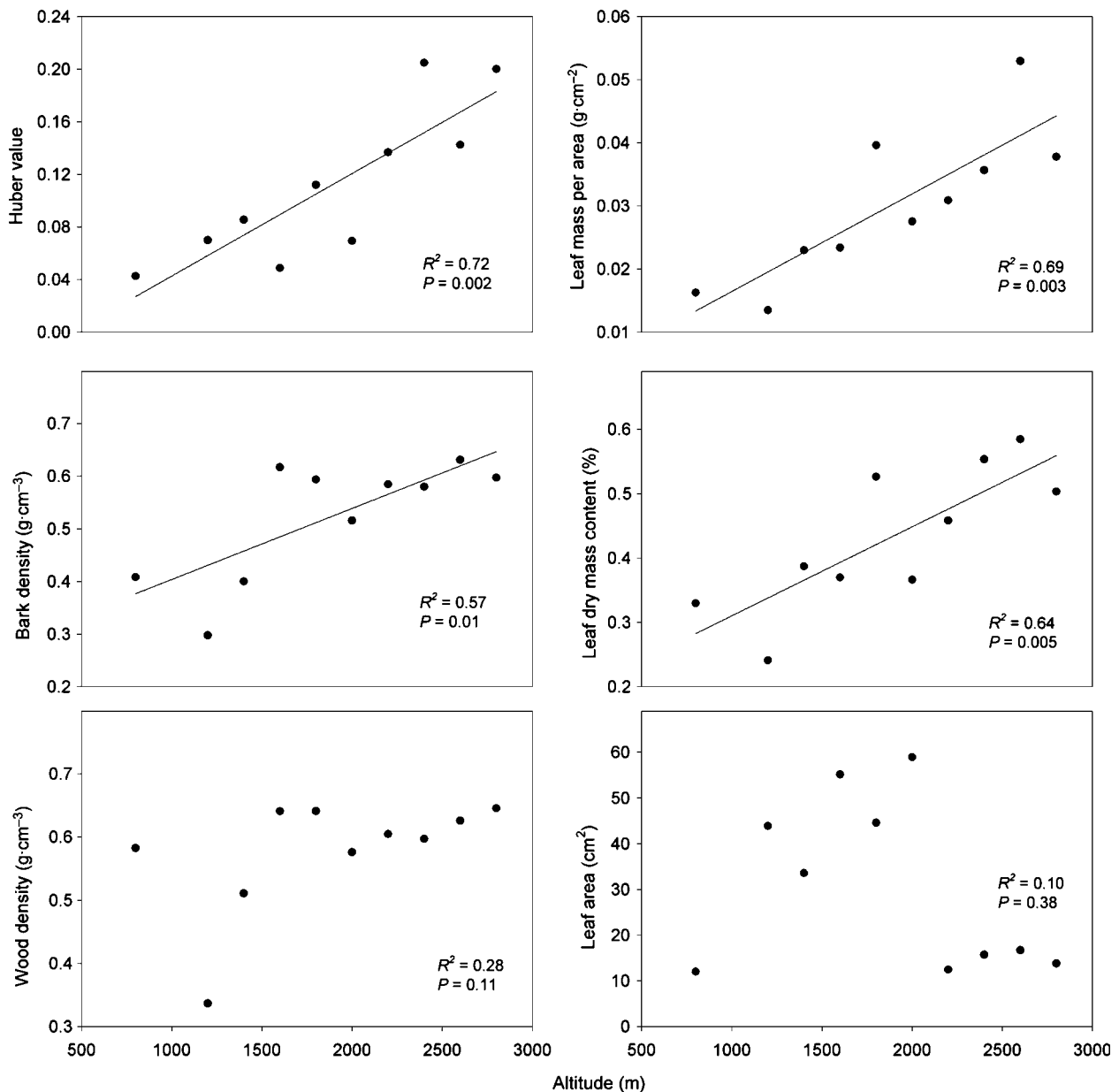
We summarized the CWM leaf and stem trait values via PCA. The leaf first component ( $\lambda = 2.19$ ) explained 72.99% of the variance contained in LA, LMA and LDMC, and the stem first component ( $\lambda = 2.21$ ) explained 73.75% of the variance contained in  $\rho_{wood}$ ,  $\rho_{bark}$  and HV. Both principal axes were significantly correlated, with higher-altitude sites having overall higher values of these traits (Fig. 3).

**Discussion**

Exploring the functional composition of plant communities along the Tequila Volcano allowed us to detect significant patterns of association of functional traits with altitude. A complex altitudinal gradient influences tree performance by modifying air temperature and rainfall patterns, and also has the potential to restrict the distribution and diversity of species (Körner 2007). In the following section, we will consider why the results found at Tequila Volcano could be representative of a wider range of subtropical mountain ranges, and we will conclude our discussion with some prospective implications of this work for conservation ecology.

**A lack of altitudinal patterns in alpha and beta diversity at the Tequila Volcano**

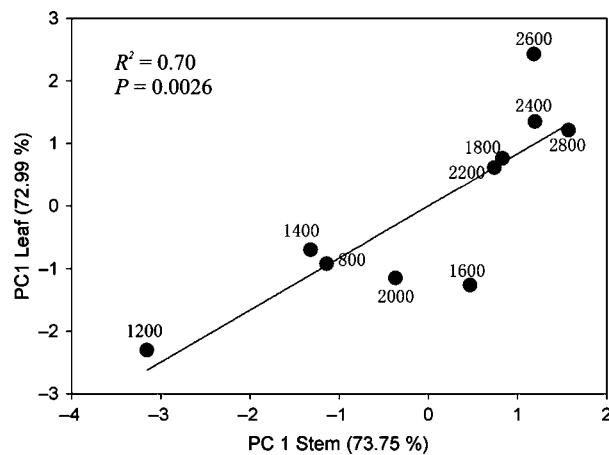
Although there is empirical and theoretical evidence for altitudinal gradients in species richness, usually indicating



**Fig. 2.** Relationships between leaf and stem community-weighted mean functional traits with altitude along a 2000-m gradient in the Tequila Volcano, Mexico.

patterns of high diversity at lower elevations and low diversity at higher elevations with a marked increase at intermediate elevations (Rahbek 2005; Körner 2007; McCain & Grytnes 2010), our results showed that at the Tequila Volcano there was no altitude-dependent gradient in tree species richness (Rahbek 2005). This pattern was due to the almost complete dominance of two species, *Q. magnoliifolia* and *Q. resinosa*, between 1600 and 2000 m as well as to the increase in biodiversity in the cloud forest, at 2200–2400 m a.s.l. The lack of a gradient in tree diversity and richness has also been observed in other Mexican

semi-tropical mountains from the Trans-Mexican Volcanic Belt, whereas in other mountains there is a clear reduction in species richness and diversity of other life forms, such as shrubs and herbs (Vázquez & Givnish 1998). We also observed that the highest diversity (as measured by the alpha diversity indices) was found at 1400 m, where the convergence between tropical and temperate elements was highest. The diversity found in this transect resembles the widely reported ‘hump’ in species diversity, a pattern that has also been reported for several different taxa around the world. The hump in species richness may be a



**Fig. 3.** Relationship between the first component of a PCA (PC1), summarizing the leaf area, leaf mass per area and leaf dry mass content community-weighted mean values (PC1 Leaf) and PC1 summarizing bark and wood density and the Huber mean trait values (PC1 Stem) along an altitudinal gradient in Tequila Volcano.

consequence of the overlap of species of tropical and temperate affinities and origins, or a sampling artifact due to the reduction of natural habitat at lower altitudes (Janzen 1967; Rahbek 1995, 2005; Williams-Linera 1997; Grytnes & Vetass 2002; Nogués-Bravo et al. 2008). In addition to these effects, in the case of Tequila Volcano, the observed species replacement across the landscape was nearly complete within each altitudinal level, thus suggesting that there are environmental filters (probably water availability and ambient temperature) that drive the variation in diversity and the lack of associations between altitude and species diversity.

In addition to a strong species replacement, our results indicate that there is almost no replacement of dominant families above 1600 m a.s.l. For taxonomic families, the almost complete dominance of Fagaceae, in particular *Quercus*, from 1600 to 2800 m suggests that there is a non-random phylogenetic structure (Vamosi et al. 2008; Cavender-Bares et al. 2009) in the Tequila Volcano vegetation, where *Quercus* has been able to colonize the widest range of altitudes in our study site. *Quercus* has been shown to be subjected to morphological trade-offs that limit the relative ability of species to cope with both drought and freezing, such as limiting the growth rate at colder temperatures (Koehler et al. 2012). Also, *Quercus* species in the Tequila Volcano have marked differences in leaf phenology that allow this genus to take advantage of the wet season and survive in the dry season (Koehler et al. 2012; Hernández-Calderón et al. 2013). Therefore, it is critical to measure phylogenetic diversity along this type of altitudinal gradient, which when coupled with functional diversity studies, would provide new insight into the factors

that shape the community assembly in subtropical mountains.

### Structural and functional diversity are constrained by altitude at the Tequila Volcano: the role of abiotic factors and physiological consequences

Our quantification of functional diversity at the Tequila Volcano is concordant with other studies that have found non-random patterns of trait variation in response to altitude. In contrast to studies conducted at temperate or cold sites, we found that our data set on structural and functional variation seemed to be more influenced by the increase in water availability, which is dependent on altitude. In particular, while most studies have found a reduction in basal area and tree height with increasing altitude (Vázquez & Givnish 1998; Bresson et al. 2011; Petit et al. 2011; Thomas 2011; De Bello et al. 2012), we found the opposite, as trees increase in maximum height from 6 m in the lowest transect to 25 m in the highest. This pattern was roughly equally reflected in a reduction in the number of basal stems, indicating that the plants are highly ramified at the base in the lowest transect. This result is concordant with previous hypotheses about the hydraulic limitation of tree height (Ryan & Yoder 1997; Ryan et al. 2006) and the increase in redundancy in branch design at more hydraulically stressed sites (Schenk et al. 2008; Martínez-Cabrera et al. 2009), and is also concordant with previous reports from latitudinal gradients where any increase in hydraulic availability and temperature favours increases in tree height (Méndez-Alonzo et al. 2008; Moles et al. 2009). Although this factor was not explicitly measured in previous studies, our results agree with classic vegetation descriptions that consider semi-tropical mountains and mountains in mediterranean climates as 'desert islands', where the increase in water availability in the soil determines the replacement of chaparral and other semi-arid vegetation with mesic vegetation at the peaks (Whittaker & Niering 1965, 1975).

Altitude and functional diversity were strongly associated at the Tequila Volcano, and altitude also determined a non-random distribution of species. For example, there were monotonic increases in LMA and LDMC with altitude that are probably related to increased foliar longevities (Körner & Diemer 1987; Bresson et al. 2011; Thomas 2011). At Tequila Volcano, there were significant patterns of association between leaf and stem traits, where the higher elevations are dominated by evergreen species with high LMA, LDMC, smaller LA and higher  $\rho_{\text{wood}}$ ,  $\rho_{\text{bark}}$  and HV. These species might be more photosynthetically efficient at low temperatures, probably by improving the C acquisition and water use efficiency in periods of frequent freezing (Huxman et al. 2008). In contrast, in the lower

part of the volcano, the dominance of dry season deciduous species with low LMA (even in the genus *Quercus*) could be explained by the selective advantage of fast acquisitive species that deploy low cost leaves during the rainy season and then rapidly shed them at the onset of the dry season (Sterck et al. 2011; Méndez-Alonzo et al. 2012a). As most dry tropical species rely on water stored in the xylem to flush new organs (i.e. leaves and flowers; Chapotin et al. 2006), any freezing event would prove catastrophic, killing most dormant meristems. In contrast, high altitude evergreens do not rely on stored xylem water to promote new growth and have more bark insulation, allowing them to survive freezing events. However, further physiological research should provide evidence of the lower thermal tolerance of dry deciduous species in comparison with evergreen species. Most surprising is the finding that HV increases monotonically with altitude, thus higher altitude species may have to invest in more stem per unit leaf area. Finally, increasing altitude, and the associated reduction of air temperatures, favours the production of denser bark due to the insulating properties of this complex and under-explored tissue (Lawes et al. 2011, 2013). Our results suggest that longevity should increase monotonically with altitude, but to our knowledge no comparisons of foliar longevities along semitropical mountains have been performed so far. These results reinforce the notion that there are intrinsic patterns of association between different organs in plants that determine resource acquisition strategies, and at least in Tequila and probably in other mountain 'desert islands', altitude is a critical environmental filter that determines the assembly of communities and functional trait co-variation (De Bello et al. 2012; Hulshof et al. 2013).

## Conclusions

Our exploration of variations in the functional and specific diversity along an altitudinal gradient provided new insights into the changes that semi-tropical vegetation will face in the scenario of future climatic modifications. In particular, we quantitatively demonstrated that, for trees, there is a monotonic increase in leaf construction costs, likely to enhance photosynthesis at the nearly freezing temperatures of the highest altitude sites, which record snow during cold years (Hernández-Calderón, *pers. obs.*). This increase in leaf construction costs could also be associated with an increased water budget, such as larger leaf area per sapwood section, reduced redundancy in the hydraulic design, and increased competition for light, as reflected by the increase in maximum height and the reduction in number of basal stems at increasing altitudes (Bresson et al. 2011; Petit et al. 2011; Thomas 2011). Although

our study was unable to detect patterns of association between species diversity and altitude, we believe that this was probably a consequence of the almost complete dominance of the 1600–2000 m altitudinal level by two species of *Quercus*. The causes of this dominance should provide an interesting area for future research, in particular focusing on ecophysiology of the dominant species, *Q. magnoliifolia* and *Q. resinosa*.

The prediction of changes in the regional climate in our study zone indicates an average increase of 2–3 °C for 2050 (Conde et al. 2011). This prediction should also take into account that Mexico is a water-limited country (Suweis et al. 2013), a situation that will clearly promote changes in vegetation, most likely increasing the number of basal stems and reducing the tree height, in functional terms, and putting at risk the viability of certain species at the highest and wettest altitudes. In addition, we qualitatively observed that the richest and most complex vegetation, in functional terms, is present in the lowest altitudinal strata, but unfortunately these strata have been more severely affected by anthropogenic modification, in this case due to land-use change destined to the production of the renowned spirit, tequila. This shift is a recurrent pattern almost globally (Nogués-Bravo et al. 2008). Future land planning at Tequila Volcano should consider protection of the reduced number of sites that still contain natural vegetation at the lowest altitudinal levels.

## Acknowledgements

EHC acknowledges financial support from CONACYT (grant no. 43987) and the Graduate program in Biological Sciences of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). RMA gratefully acknowledges financial support from a UC-MEXUS-CONACYT post-doctoral scholarship. We thank J. J. Junco Fuentes (map elaboration) and E. Vega-Peña (statistical design), and the comments provided by F. W. Ewers, L. Sack and his lab group, M. L. Navas and one anonymous reviewer. This project was supported by CONACYT (grant no. 2006-23728) to K. Oyama.

## References

- Baraloto, C., Paine, C.E.T., Poorter, L., Beauchene, J., Bonal, D., Domenach, A.-M., Héroult, B., Patinö, S., Roggy, J.-C. & Chave, J. 2010. Decoupled leaf and stem economics in rain-forest trees. *Ecology Letters* 13: 1338–134.
- Bresson, C.C., Vitasse, Y., Kremer, A. & Delzon, S. 2011. To what extent is altitudinal variation of functional traits driven by genetic adaptation in European oak and beech? *Tree Physiology* 31: 1164–1174.

- Brooks, T.M., Mittermeier, R.A., da Fonseca, G.A.B., Gerlach, J., Hoffmann, M., Lamoreux, J.F., Mittermeier, C.G., Pilgrim, J.D. & Rodrigues, A.S.L. 2006. Global biodiversity conservation priorities. *Science* 313: 58–61.
- Cavender-Bares, J. 2005. Impacts of freezing on long distance transport in woody plants. In: Holbrook, N.M. & Zwieniecki, M.E. (eds.) *Vascular Transport in Plants*, pp. 401–424. Elsevier, Burlington, MA, US.
- Cavender-Bares, J., Kitajima, K. & Bazzaz, F.A. 2004. Multiple trait associations in relation to habitat differentiation among 17 oak species in North Central Florida. *Ecological Monographs* 74: 635–662.
- Cavender-Bares, J., Kozak, K.H., Fine, P.V.A. & Kembel, S.W. 2009. The merging of community ecology and phylogenetic biology. *Ecology Letters* 12: 693–715.
- Chapotin, S.M., Razanameharizaka, J.H. & Holbrook, N.M. 2006. Baobab trees (*Adansonia*) in Madagascar use stored water to flush new leaves but not to support stomatal opening before the rainy season. *New Phytologist* 169: 549–559.
- Conde, C., Estrada, F., Martínez, B., Sánchez, O. & Gay, C. 2011. Regional climate change scenarios for México. *Atmósfera* 24: 125–140.
- Cornelissen, J.H.C., Lavorel, S., Garnier, E., Diaz, S., Buchmann, N., Gurvich, D.E., Reich, P.B., ter Steege, H., Morgan, H.D., van der Heijden, M.G.A., Pausas, J.G. (...) & Poorter, H. 2003. A handbook of protocols for standardized and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* 51: 335–380.
- Comwell, W.K. & Ackerly, D.D. 2009. Community assembly and shifts in plant trait distributions across an environmental gradient in coastal California. *Ecological Monographs* 79: 109–126.
- Comwell, W.K., Schwilk, D.W. & Ackerly, D.D. 2006. A trait-based test for habitat filtering: convex hull volume. *Ecology* 87: 1465–1471.
- Davis, S.D., Sperry, J.S. & Hacke, U.G. 1999. The relationship between xylem conduit diameter and cavitation caused by freezing. *American Journal of Botany* 86: 1367–1372.
- De Bello, F., Lavorel, S., Lavergne, S., Albert, C.H., Boullangeat, I., Mazel, F. & Thuiller, W. 2012. Hierarchical effects of environmental filters on the functional structure of plant communities: a case study in the French Alps. *Ecography* 35: 1–10.
- Diaz, S., Lavorel, S., de Bello, F., Quétier, F., Grigulis, K. & Robson, M. 2007. Incorporating plant functional diversity effects in ecosystem service assessments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 20684–20689.
- Díaz, S., Hodgson, J.G., Thompson, K., Cabido, M., Cornelissen, J.H.C., Jalili, A., Monserratt-Martí, G., Grime, J.P., Zarrinkamar, F., Asri, Y., Band, S.R., (...) & Zark, M.R. 2004. The plant traits that drive ecosystems: evidence from three continents. *Journal of Vegetation Science* 15: 295–304.
- Ewer, F.W. & Schmid, R. 1981. Longevity of needle fascicles of *Pinus longaeva* (Bristlecone pine) and other North American pines. *Oecologia* 51: 107–117.
- Fitzjarrald, D.R., Acevedo, O.C. & Moore, K.E. 2001. Climatic consequences of leaf presence in the eastern United States. *Journal of Climate* 14: 598–614.
- Freschet, G.T., Cornelissen, J.H.C., van Logtestijn, R.S.P. & Aerts, R. 2010. Evidence of the ‘plant economics spectrum’ in a subarctic flora. *Journal of Ecology* 98: 362–373.
- Garnier, E., Cortez, J., Billes, G., Navas, M.L., Roumet, C., Debussche, M., Laurent, G., Blanchard, A., Aubry, D., Bellmann, A., Neill, C. (...) & Toussaint, J.P. 2004. Plant functional markers capture ecosystem properties during secondary succession. *Ecology* 85: 2630–2637.
- Ghalambor, C.K., Huey, R.B., Martin, P.R., Tewksbury, J.J. & Wang, G. 2006. Are mountain passes higher in the tropics? Janzen’s hypothesis revisited. *Integrative and Comparative Biology* 46: 5–17.
- Grime, J.P., Thompson, K., Hunt, R., Hodgson, J.G., Cornelissen, J.H.C., Rorrison, I.H., Hendry, G.A.F., Ashenden, T.W., Askew, A.P., Band, S.R., Booth, R.E., (...) & Whitehouse, J. 1997. Integrated screening validates primary axis of specialization in plants. *Oikos* 79: 259–281.
- Grytnes, J.A. & Vetass, O.R. 2002. Species richness and altitude: a comparison between null models and interpolated plant species richness along the Himalayan altitudinal gradient, Nepal. *The American Naturalist* 159: 294–304.
- Hernández-Calderón, E., González-Rodríguez, A., Méndez-Alonzo, R., Vega-Peña, E. & Oyama, K. 2013. Contrasting leaf phenology in two white oaks, *Quercus magnoliifolia* and *Quercus resinosa*, along an altitudinal gradient in Mexico. *Canadian Journal of Forest Research* 43: 208–213.
- Hulshof, C.M., Violle, C., Spasojevic, M., McGill, B., Damschen, E., Harrison, S. & Enquist, B.J. 2013. Intra-specific and inter-specific variation in specific leaf area reveal the importance of abiotic and biotic drivers of species diversity across elevation and altitude. *Journal of Vegetation Science* 24: 921–931.
- Huxman, T.E., Venable, D.L., Barron-Gafford, G., Gerst, K., Angert, A.L. & Tyler, A. 2008. Photosynthetic resource-use efficiency and demographic variability in desert annual plants. *Ecology* 89: 1554–1563.
- Janzen, D.H. 1967. Why mountain passes are higher in the tropics. *The American Naturalist* 101: 233–249.
- Koehler, K., Center, A. & Cavender-Bares, J. 2012. Evidence for a freezing tolerance–growth rate trade-off in the live oaks (*Quercus* series *Virentes*) across the tropical–temperate divide. *New Phytologist* 193: 730–744.
- Körner, C. 2007. The use of ‘altitude’ in ecological research. *Trends in Ecology & Evolution* 22: 569–574.
- Körner, C. & Diemer, M. 1987. *In situ* photosynthetic responses to light, temperature and carbon dioxide in herbaceous plants from low and high altitude. *Functional Ecology* 1: 179–194.



- Kovach, W.L. 1998. *MVSP – A Multivariate Statistical Package for Windows*, ver 3.0. Kovach Computing Services, Pentraeth, UK.
- Krebs, Ch.J. 1999. *Ecological Methodology*. Benjamin Cummings, Menlo Park, CA, US.
- Lawes, M.J., Richards, A., Dathe, J. & Midgley, J.J. 2011. Bark thickness determines fire resistance of selected tree species from fire-prone tropical savanna in north Australia. *Plant Ecology* 212: 2057–2069.
- Lawes, M.J., Midgley, J.J. & Clarke, P.J. 2013. Costs and benefits of relative bark thickness in relation to fire damage: a savanna/forest contrast. *Journal of Ecology* 101: 517–524.
- Lohbeck, M., Poorter, L., Lebrija-Trejos, E., Martínez-Ramos, M., Meave, J.A., Paz, H., Pérez-García, E.A., Romero-Pérez, I.E., Tauro, A. & Bongers, F. 2013. Successional changes in functional composition contrast for dry and wet tropical forest. *Ecology* 94: 1211–1216.
- Marquardt, D.W. 1963. An algorithm for least squares estimation of parameters. *Journal of the Society of Industrial and Applied Mathematics* 11: 431–441.
- Martínez-Cabrera, H.I., Jones, C.S., Espino, S. & Schenk, H.J. 2009. Wood anatomy and wood density in shrubs: responses to varying aridity along transcontinental transects. *American Journal of Botany* 96: 1388–1398.
- McCain, C.M. & Grytnes, J. 2010. Elevational gradients in species richness. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, John Wiley & Sons, Chichester.
- Méndez-Alonzo, R., López-Portillo, J. & Rivera-Monroy, V.H. 2008. Latitudinal variation in leaf and tree traits of the mangrove *Avicennia germinans* (Avicenniaceae) in the central region of the Gulf of Mexico. *Biotropica* 40: 449–456.
- Méndez-Alonzo, R., Paz, H., Rosell, J.A. & Olson, M.E. 2012a. Coordinated evolution of leaf and stem economics in tropical dry forest trees. *Ecology* 93: 2397–2406.
- Méndez-Alonzo, R., Hernández-Trejo, H. & López-Portillo, J. 2012b. Salinity constrains size inequality and allometry in two contrasting mangrove habitats in the Gulf of Mexico. *Journal of Tropical Ecology* 28: 171–179.
- Moles, A.T., Warton, D.I., Warman, L., Swenson, N.G., Laffan, S.W., Zanne, A.E., Pitman, A., Hemmings, F.A. & Leishman, M.R. 2009. Global patterns in plant height. *Journal of Ecology* 97: 923–932.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B. & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- National Service of Meteorological Mexico. 2013. Handbook of municipal geographic information. Available at: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexi-cocifras/default.aspx?e=14>.
- Nogués-Bravo, D., Araújo, M.B., Romdal, T. & Rahbek, C. 2008. Scale effects and human impact on the elevation species richness gradients. *Nature* 453: 216–220.
- Petit, G., Anfodillo, T., Carraro, V., Grani, F. & Carrer, M. 2011. Hydraulic constraints limit height growth in trees at high altitude. *New Phytologist* 189: 241–252.
- Rahbek, C. 1995. The elevational gradient of species richness: a uniform pattern? *Ecography* 18: 200–205.
- Rahbek, C. 2005. The role of spatial scale and the perception of large-scale species-richness patterns. *Ecology Letters* 8: 224–239.
- Reich, P.B., Walters, M.B. & Ellsworth, D.S. 1997. From tropics to tundra: global convergence in plant functioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 13730–13734.
- Ryan, M.G. & Yoder, B.J. 1997. Hydraulic limits to tree height and tree growth. *BioScience* 47: 235–242.
- Ryan, M.G., Phillips, N. & Bond, B.J. 2006. The hydraulic limitation hypothesis revisited. *Plant, Cell and Environment* 29: 367–381.
- Schenk, H.J., Espino, S., Goedhart, C.M., Nordenstahl, M., Martínez-Cabrera, H.I. & Jones, C.S. 2008. Hydraulic integration and shrub growth form linked across continental aridity gradients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 11248–11253.
- Sterck, F.L., Markesteijn, L., Schieving, F. & Poorter, L. 2011. Functional traits determine trade-offs and niches in a tropical forest community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 20627–20632.
- Suweis, S., Rinaldo, A., Maritan, A. & D’Odorico, P. 2013. Water-controlled wealth of nations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 4230–4233.
- Thomas, S.C. 1996. Asymptotic height as predictor of growth and allometric characteristics in Malaysian rain forests. *American Journal of Botany* 83: 556–566.
- Thomas, S.C. 2011. Genetic vs. phenotypic responses of trees to altitude. *Tree Physiology* 31: 1161–1163.
- Thomas, S.C. & Bazzaz, F.A. 1999. Asymptotic height as a predictor of photosynthetic characteristics in Malaysian rain forest trees. *Ecology* 80: 1607–1622.
- Tyree, M.T. & Ewers, F.W. 1991. The hydraulic architecture of trees and other woody plants. *New Phytologist* 119: 345–360.
- Vamosi, S.M., Heard, S.B., Vamosi, J.C. & Webb, C.O. 2008. Emerging patterns in the comparative analysis of phylogenetic community structure. *Molecular Ecology* 18: 572–592.
- Vázquez, J.A. & Givnish, T.J. 1998. Altitudinal gradients in tropical forest composition, structure, and diversity in the Sierra de Manantlán. *Journal of Ecology* 86: 999–1020.
- Westoby, M., Falster, D.S., Moles, A.T., Vesk, P.A. & Wright, I.J. 2002. Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecology & Systematics* 33: 125–159.
- Whittaker, R.H. & Niering, W.A. 1965. Vegetation of the Santa Catalina Mountains, Arizona: a gradient analysis of the south slope. *Ecology* 46: 429–452.

- Whittaker, R.H. & Niering, W.A. 1975. Vegetation of the Santa Catalina Mountains, Arizona. V. Biomass, Production, and Diversity along the Elevation Gradient. *Ecology* 56: 771–790.
- Williams-Linera, G. 1997. Phenology of deciduous and broad-leaved-evergreen tree species in a Mexican tropical lower montane forest. *Global Ecology and Biogeography Letters* 6: 115–127.
- Wilson, P.J., Thompson, K. & Hodgson, J.G. 1999. Specific leaf area and leaf dry matter content as alternative predictors of plant strategies. *New Phytologist* 143: 155–162.

### Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article:

- Figure S1.** Study sites in Tequila Volcano, Mexico.
- Figure S2.** Species accumulation curves for ten horizontal transects located each 200 m a.s.l. along a 2000-m altitudinal gradient at Tequila Volcano, Mexico.
- Figure S3.** Inter-community beta diversity estimated by dissimilarity analyses in ten horizontal transects located

every 200 m of altitude along a 2000-m altitudinal gradient at Tequila Volcano, Mexico.

**Figure S4.** Relationships between tree height and DBH for ten horizontal transects located each 200 m a.s.l. along a 2000-m altitudinal gradient at Tequila Volcano, Mexico.

**Appendix S1.** Climate and vegetation along a 2000-m altitudinal gradient in the Tequila Volcano, Jalisco, Mexico.

**Appendix S2.** Identified species and families along a 2000-m altitudinal gradient in the Tequila Volcano, Jalisco, Mexico.

**Appendix S3.** Structural values of plant communities sampled for each altitude level in the Tequila Volcano, Jalisco, Mexico.

**Appendix S4.** Total number of shared species between ten study sites along an altitudinal gradient of 2000 m in the Tequila Volcano, Jalisco, Mexico.

**Appendix S5.** Bray–Curtis dissimilarity index for ten study sites along an altitudinal gradient of 2000 m in the Tequila Volcano, Jalisco, Mexico.

## Supporting information.

**Appendix S1.** Climate and vegetation along a 2000 m altitudinal gradient in the Tequila Volcano, Jalisco, Mexico. P = Study point.

Climate follows the classification by Köeppen modified by García (1988).

P	Altitude	Climate	Forest type
1	2800	Temperate, sub-humid with summer rains and high humidity C(w2)	Oak forest
2	2600	Temperate, sub-humid with summer rains and high humidity C(w2)	Oak forest
3	2400	Temperate and sub-humid with summer rains and medium humidityC(w1)	Cloud forest
4	2200	Temperate and sub-humid with summer rains and medium humidityC(w1)	Pine-oak forest
5	2000	Temperate and sub-humid with summer rains and medium humidityC(w1)	Pine-oak forest
6	1800	Warm, sub-humid with summer rains and medium humidityA(w1)	Oak forest
7	1600	Warm, sub-humid with summer rains and medium humidity A(w1)	Pure <i>Q. magnoliifolia</i> forest
8	1400	Warm, sub-humid with summer rains and low humidity A(w0)	Mixed tropical dry an <i>Quercus</i> forest
9	1200	Warm, sub-humid with summer rains and low humidity A(w0)	Tropical sudeciduous forest
10	800	Warm, sub-humid with summer rains and low humidity A(w0)	Tropical dry forest

**Appendix S2.** Identified species and families along a 2000 m altitudinal gradient in the Tequila Volcano, Jalisco, Mexico.

Species	Family	Altitude (m)	Leaf habitat
<i>Acacia cochliacantha</i>	Leguminosae	800	E
<i>Bauhinia subrotundifolia</i>	Leguminosae	800	D
<i>Croton flavescens</i>	Euphorbiaceae	800	D
<i>Haematoxylum brasiletto</i>	Leguminosae	800	D
<i>Heliocarpus terebinthinaceus</i>	Tiliaceae	800, 1200, 1400	D
<i>Lysiloma divaricata</i>	Leguminosae	800	D
<i>Malpighia sp.</i>	Malpighiaceae	800	D
<i>Randia sp.</i>	Rubiaceae	800	D
<i>Spondias purpurea</i>	Anacardiaceae	800, 1200	D
<i>Stenocereus sp.</i>	Cactaceae	800	
<i>Bursera grandifolia</i>	Burseraceae	1200	D
<i>Bursera graveolens</i>	Fagaceae	1200, 1400	D
<i>Acalypha multiflora</i>	Euphorbiaceae	1200	D
<i>Ceiba pentandra</i>	Bombacaceae	1200	D
<i>Comocladia engleriana</i>	Anacardiaceae	1200	D
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	Leguminosae	1200	E
<i>Ipomoea pauciflora</i>	Convolvulaceae	1200	D
<i>Lysiloma acapulcensis</i>	Leguminosae	1200	D
<i>Pithecellobium dulce</i>	Leguminosae	1200	D
<i>Platymiscium trifoliolatum</i>	Leguminosae	1200, 1400	D
<i>Pouzolzia occidentalis var. Palmeri</i>	Urticaceae	1200	E
<i>Sapranthus microcarpus</i>	Sapranthus	1200	D
<i>Swietenia humilis</i>	Meliaceae	1200, 1400	D
<i>Annona longiflora</i>	Annonaceae	1400	D
<i>Bursera bipinnata</i>	Burseraceae	1400	D
<i>Bursera fagaroides</i>	Burseraceae	1400	D
<i>Bursera multijuga</i>	Burseraceae	1400	D
<i>Psychotria hundellii</i>	Rubiaceae	1400	D
<i>Solanum umbellatum</i>	Solanaceae	1400	D
<i>Juniperus deppeana</i>	Cupressaceae	1400, 1600	E
<i>Quercus magnoliifolia</i>	Fagaceae	1400, 1600, 1800, 2000	D
<i>Eysenhardtia polystachya</i>	Leguminosae	1600	D
<i>Arbutus xalapensis</i>	Ericaceae	1800, 2200, 2400, 2600, 2800	E
<i>Quercus resinosa</i>	Fagaceae	1800, 2000	D or Semi-E
<i>Quercus castanea</i>	Fagaceae	1800, 2000, 2200, 2400	E
<i>Quercus gentryi</i>	Fagaceae	1800	D
<i>Alnus jorullensis</i>	Betulaceae	2200, 2400, 2600	E

<i>Arbutus glandulosa</i>	Ericaceae	2200	E
<i>Clethra rosei</i>	Clethraceae	2200	E
<i>Pinus douglasiana</i>	Pinaceae	2000, 2200	E
<i>Prunus serótina</i>	Rosaceae	2200	E or D
<i>Quercus viminea</i>	Fagaceae	2000	Semi-E
<i>Quercus obtusata</i>	Fagaceae	2200	E
<i>Quercus candicans</i>	Fagaceae	2200, 2400, 2600	E
<i>Garrya laurifolia</i>	Garryaceae	2400	E
<i>Monnina ciliolata</i>	Polygalaceae	2400	E
<i>Quercus subspathulata</i>	Fagaceae	2400, 2600	D
<i>Quercus laurina</i>	Fagaceae	2400, 2800	D
<i>Quercus crassifolia</i>	Fagaceae	2600	D
<i>Quercus fulva</i>	Fagaceae	2600	D
<i>Quercus insignis</i>	Fagaceae	2600	D or Semi-E
<i>Quercus rugosa</i>	Fagaceae	2800	D

---

***E = Evergreen, D = Deciduous***

**Appendix S3.** Structural values of plant communities sampled for each altitude level in the Tequila Volcano, Jalisco, Mexico. For basal area and branch number the total per study point is indicated and the average value per plant is indicated in parentheses. Dominant species is the percentage of Holdridge's importance value within each altitudinal level.

Altitude	Basal area cm <sup>2</sup>	Number of basal stems	Density (trees / 50 m <sup>2</sup> )	Height mean/max/min	Dominant species
800	3164.5 (98.9)	84 (2.6)	32	5.3 / 9.5 / 2.4	<i>Acacia cochliacantha</i> (45.8)
1200	19849.6 (620.3)	55 (1.7)	32	8.7 / 19.1 / 1.5	<i>Swietenia humilis</i> (39.9)
1400	8380.1 (289.0)	51 (1.8)	29	5.2 / 11.6 / 1.5	<i>Quercus magnoliifolia</i> (27.4)
1600	5563.3 (198.7)	34 (1.2)	28	5.6 / 14.6 / 2.5	<i>Quercus magnoliifolia</i> (91.1)
1800	9179.9 (327.9)	32 (1.1)	28	7 / 16.6 / 2.0	<i>Quercus resinosa</i> (50.1)
2000	11633.5 (415.5)	32 (1.1)	28	10 / 15.7 / 3.4	<i>Quercus resinosa</i> (50.8)
2200	34022.9 (1063.2)	36 (1.2)	32	12.8 / 20 / 3.0	<i>Quercus obtusata</i> (29.2)
2400	29433.7 (949.5)	40 (1.3)	31	10.2 / 20.6 / 1.8	<i>Quercus subpathulata</i> (24.8)
2600	56818.9 (2104.4)	29 (1.1)	27	16.6 / 26.6 / 2.6	<i>Quercus crassifolia</i> (45.1)
2800	34531.8 (1381.3)	28 (1.1)	25	18.2 / 29.4 / 6.3	<i>Quercus laurina</i> (52.2)

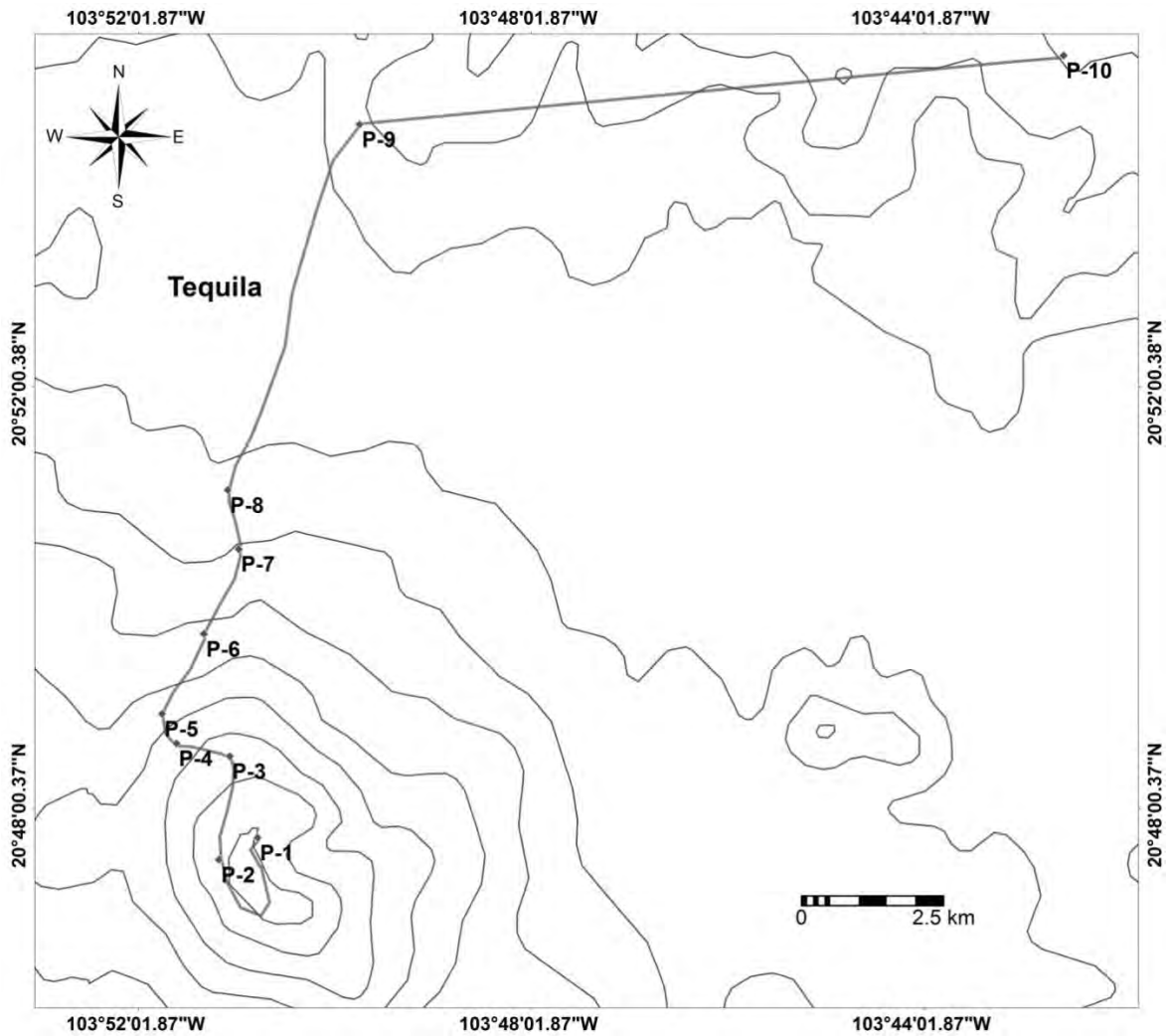
**Appendix S4.** Total number of shared species between 10 study sites along an altitudinal gradient of 2000 m in the Tequila Volcano, Jalisco, Mexico.

	800	1200	1400	1600	1800	2000	2200	2400	2600	2800
800	10									
1200	2	13								
1400	1	2	12							
1600	0	0	2	3						
1800	0	0	1	1	5					
2000	0	0	1	1	3	5				
2200	0	0	0	0	2	2	8			
2400	0	0	0	0	2	1	4	9		
2600	0	0	0	0	1	0	3	4	7	
2800	0	0	0	0	1	0	1	2	1	3

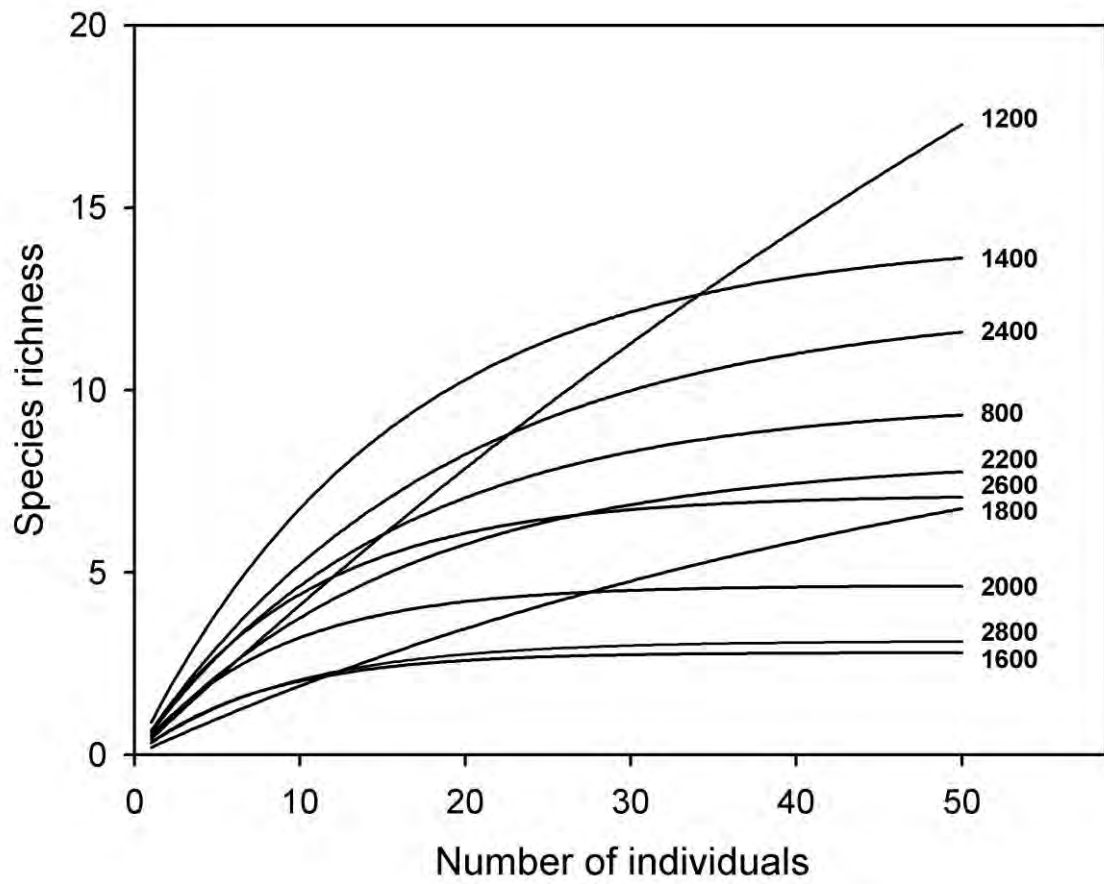
**Appendix S5.** Bray Curtis dissimilarity index for 10 study sites along an altitudinal gradient of 2000 m in the Tequila Volcano, Jalisco, Mexico.

	800	1200	1400	1600	1800	2000	2200	2400	2600	2800
800	0									
1200	0.96	0								
1400	0.98	0.92	0							
1600	1	1	0.822	0						
1800	1	1	0.88	0.822	0					
2000	1	1	0.941	0.941	0.525	0				
2200	1	1	1	1	0.86	0.921	0			
2400	1	1	1	1	0.92	0.98	0.72	0		
2600	1	1	1	1	0.98	1	0.8	0.48	0	
2800	1	1	1	1	0.98	1	0.941	0.921	0.941	0

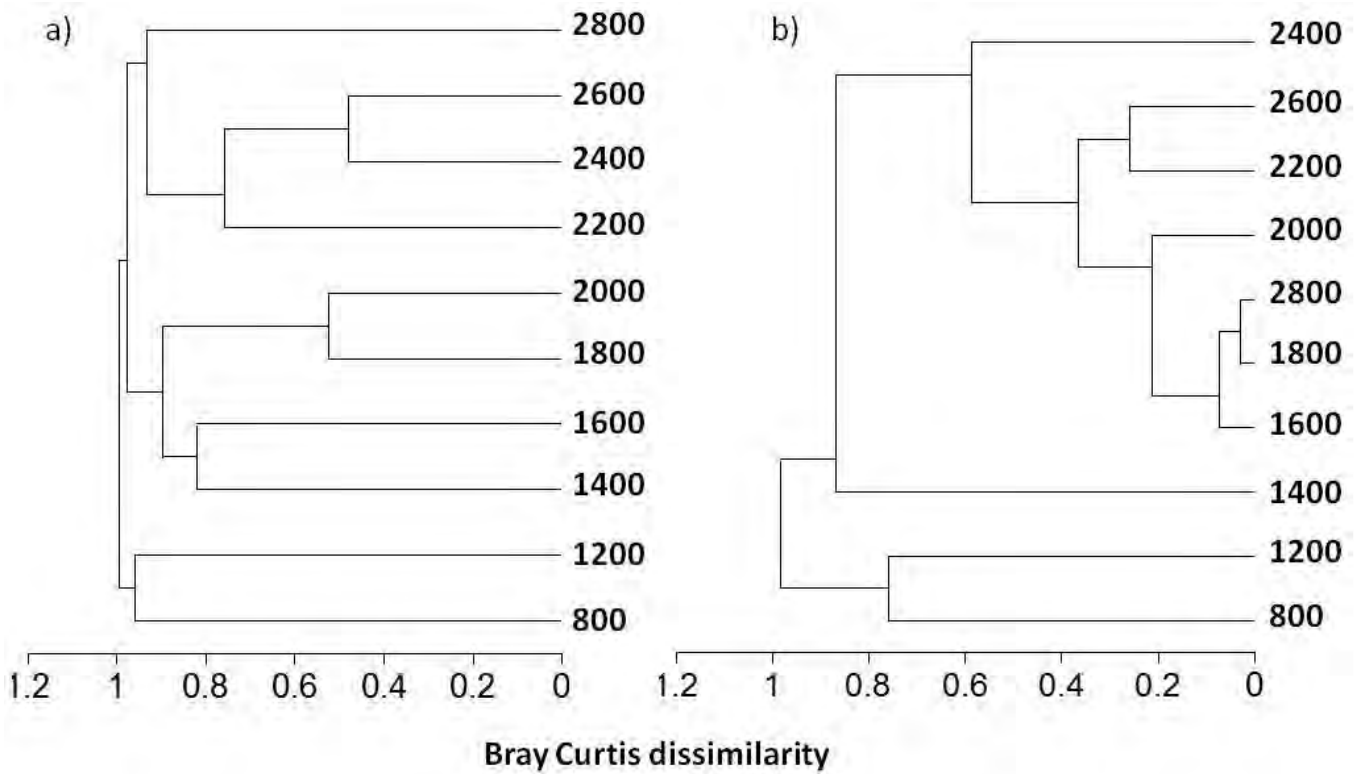




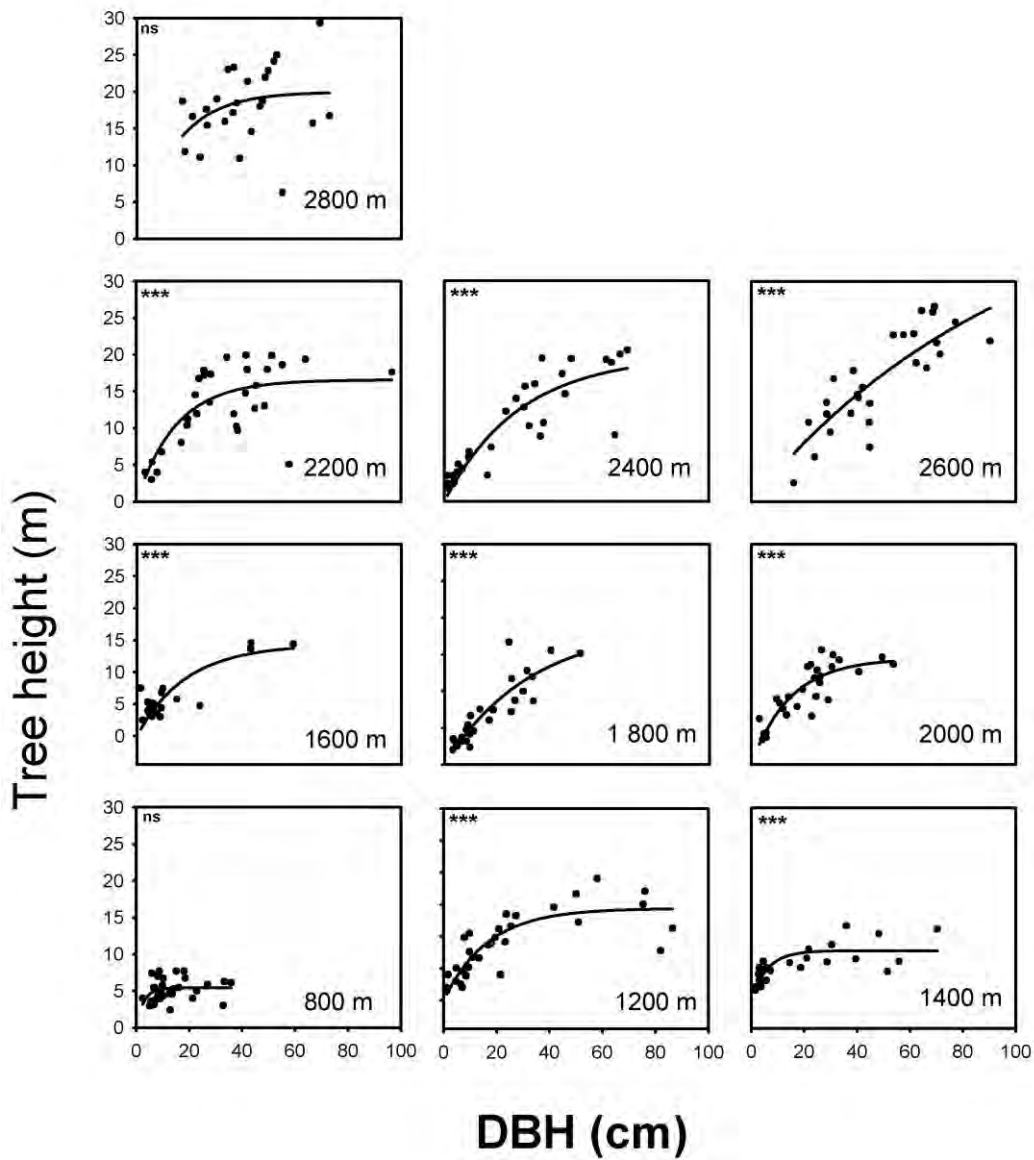
**Figure S1.** Study sites in Tequila Volcano, Mexico. The 1000 transect was not established as most native vegetation in this altitude has been transformed into *Agave tequilana* var. *weber* cultivars.



**Figure S2.** Species accumulation curves for ten horizontal transects located each 200 meters above sea level along a 2000 m altitudinal gradient at Tequila Volcano, Mexico.



**Figure S3.** Intercommunity beta diversity estimated by dissimilarity analyses in ten horizontal transects located every 200 m of altitude along a 2000 m altitudinal gradient at Tequila Volcano, Mexico. Clusters were obtained using the un-weighted pair group method with arithmetic averaging (UPGMA), with Bray Curtis distance, for two taxonomic levels



**Figure S4.** Relationships between tree height and diameter at breast height (DBH) for ten horizontal transects located each 200 meters above sea level along a 2000 m altitudinal gradient at Tequila Volcano, Mexico. \*\*\* =  $P < 0.0001$ , ns =  $P > 0.05$ .

VI.

**Erasto Hernández-Calderón, Antonio González-Rodríguez, Rodrigo Méndez-Alonzo, Ernesto Vega-Peña, and Ken Oyama.**

**Contrasting leaf phenology in two white oaks, *Quercus magnoliifolia* and *Quercus resinosa*, along an altitudinal gradient in Mexico**

**Canadian Journal of Forest Research 43: 208-213 (2013).  
[dx.doi.org/10.1139/cjfr-2012-0406](http://dx.doi.org/10.1139/cjfr-2012-0406).**

# Contrasting leaf phenology in two white oaks, *Quercus magnoliifolia* and *Quercus resinosa*, along an altitudinal gradient in Mexico

Erasto Hernández-Calderón, Antonio González-Rodríguez, Rodrigo Méndez-Alonzo, Ernesto Vega-Peña, and Ken Oyama

**Abstract:** In tropical latitudes, the analysis of leaf phenology in tree species of lineages with temperate origin can help better understanding the potential effects of climate change on these forests. Over three years (2008–2010), we recorded the timing of bud burst (BB), leaf unfolding (LU), and leaf spreading (LS) and their relation to temperature, precipitation, and soil water potential in two deciduous oak species (*Quercus magnoliifolia* Née and *Quercus resinosa* Liebm.) along an altitudinal gradient at the Tequila Volcano, central Mexico. *Quercus magnoliifolia* was monitored at three altitudes, 1450, 1667, and 1787 m, and *Q. resinosa* was monitored at 1787, 2055, and 2110 m. The onset of BB, LU, and LS occurred earlier at lower elevations with higher temperature in *Q. magnoliifolia*, but in *Q. resinosa* only the onset of BB occurred later at lower elevations with higher temperature. BB, LU, and LS were not correlated with rainfall and soil water potential in the two species. The total duration time of leaf development was not significantly correlated with rainfall in *Q. magnoliifolia*, but a significant negative correlation with rainfall was found in *Q. resinosa*. Results indicated that leaf phenology of the two examined oak species exhibited contrasting responses to temperature and precipitation.

**Résumé :** Sous les tropiques, l'étude de la phénologie des feuilles chez les espèces arborescentes qui font partie d'une lignée d'origine tempérée peut aider à mieux comprendre les effets des changements climatiques sur ces forêts. Pendant trois ans (2008–2010), nous avons noté les dates du débourrement (BB), du déploiement des feuilles (LU) et de l'expansion des feuilles (LS) en relation avec la température, la précipitation et le potentiel hydrique dans le sol chez deux espèces décidues de chêne (*Quercus magnoliifolia* Née et *Q. resinosa* Liebm.) le long d'un gradient altitudinal au volcan de Tequila, dans le centre du Mexique. Le suivi a été effectué à trois altitudes : 1450, 1667 et 1787 m dans le cas de *Q. magnoliifolia* ainsi que 1787, 2055 et 2110 m dans le cas de *Q. resinosa*. Le début de BB, LU et LS est survenu plus tôt aux plus basses altitudes où la température était plus élevée dans le cas de *Q. magnoliifolia*, mais chez *Q. resinosa* seul le début de BB est survenu plus tard aux plus basses altitudes où la température était plus élevée. BB, LU et LS n'étaient pas corrélés avec la précipitation ni avec le potentiel hydrique dans le sol chez les deux espèces. La durée totale du développement des feuilles n'était pas significativement corrélée avec la précipitation chez *Q. magnoliifolia* mais une corrélation négative significative avec la précipitation a été trouvée chez *Q. resinosa*. Les résultats indiquent que la phénologie des feuilles des deux espèces de chêne qui ont été étudiées montre que ces espèces réagissent différemment à la température et à la précipitation. [Traduit par la Rédaction]

## Introduction

Plants exhibit seasonal phenological changes fitted to climatic patterns and correlated with suitable environmental conditions that favor their successful growth and reproduction (Visser and Both 2005). Leaf phenology is one of the most sensitive and easily observable traits in nature that change in response to climate and thus is a promising indicator of the impacts of global warming (Badeck et al. 2004; Reusch and Wood 2007). Several potential risks exist for temperate forest trees under climate change. For example, an earlier bud burst could result in an increased risk of damage from late spring frost (Cannell and Smith 1986; Murray et al. 1989). As a result, modification of the seasonal phases could alter the growth and productivity of plants, finally affecting the species abundance and distribution (Chuine and Beaubien 2001). In fact, climate change has already altered the vegetative and reproductive phenology of many species, especially in temperate zones (Kramer 1995; Menzel et al. 2006).

The study of phenology of deciduous trees in temperate climates, most of which has been conducted in middle and high latitudes of North America and Europe (Kramer 1995; Wesołowski and Rowiński 2006; Vitasse et al. 2009a, 2009b), has shown that

temperature controls spring phenology of temperate tree species through a relationship between chilling temperature required to release bud dormancy and forcing temperatures promoting bud development (Cannell 1997; Menzel 2002; Borchert et al. 2005), resulting in clinal phenological patterns with latitude (Chmielewski and Rotzer 2001; Ahas et al. 2002) and altitude (Wesołowski and Rowiński 2006; Vitasse et al. 2009b). However, a different picture emerges from phenological studies in tropical deciduous trees at seasonally dry tropical forests. These studies indicate that periodic development of tropical trees is not synchronized with temperature, drought or large seasonal variation in rainfall (Borchert 1994a; Borchert et al. 2005). Phenology of tropical trees cannot be predicted from climatic data because bud burst and leafing are determined by nonclimatic variables such as seasonal variation in tree water status, day length, and shedding of old leaves (Borchert 1994a, 1994b, 2004; Rivera et al. 2002; Borchert et al. 2005). Whether leaf phenology of tree lineages of temperate origin in tropical areas behaves as that of tropical or temperate species is still an open question.

Mexican oaks are one example of a tree group of temperate origin but currently dominating tropical latitudes. Mexico has

Received 1 October 2012. Accepted 8 January 2013.

E. Hernández-Calderón, A. González-Rodríguez, R. Méndez-Alonzo, and E. Vega-Peña. Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex-Hacienda de San José de la Huerta, C.P. 58190, Morelia, Michoacán, México.

K. Oyama. Escuela Nacional de Estudios Superiores Morelia UNAM, Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex-Hacienda de San José de la Huerta, C.P. 58190, Morelia, Michoacán, México.

Corresponding author: Ken Oyama (e-mail: akoyama@oikos.unam.mx).



**Table 1.** Annual rainfall (mm), mean, maximum, and minimum temperature from January to June ( $T_{\text{mean}}$ ,  $T_{\text{max}}$ , and  $T_{\text{min}}$ , respectively; °C), and soil water potential ( $\psi_{\text{ws}}$ ; MPa) for the five study sites in the altitudinal gradient.

Altitude (m)	Coordinates	Environmental variables				
		Rainfall (mm)	$T_{\text{mean}}$ (°C)	$T_{\text{max}}$ (°C)	$T_{\text{min}}$ (°C)	$\psi_{\text{ws}}$ (MPa)
1450	20°51'9"N, 103°50'50.11"W	773±13ab	21.7±0.3a	34.8±0.8a	10.6±0.4a	-10.4±2.4a
1667	20°50'20"N, 103°51'13"W	868±9a	20.8±0.4ab	33.2±1ab	10.7±0.4a	-7.9±2.0a
1787	20°49'32.19"N, 103°51'6.57"W	875±13a	18.8±0.3bc	30.7±0.9b	9.9±0.4a	-6.8±2.4a
2055	20°48'51.77"N, 103°51'36.59"W	648±11b	18.2±0.2c	30.5±0.7b	10 ±0.3a	-3.6±1.6b
2110	20°48'31.41"N, 103°51'25.11"W	772±13ab	17.8±0.2c	31.7±0.7b	9.3±0.3a	-2.9±1.3b
Mean ± SE		787±28	19.5±0.5	32.2±0.7	10.2±0.5	-6.3±1.1

**Note:** Rainfall and temperature data are average values ± standard error (SE) from three years of meteorological measurements. Soil water potential data are averages ± SE of four dates of measurements in May of 2010. Different letters represent significant values after an ANOVA analysis with a post-hoc Tukey's test (with  $p < 0.05$ ).

more than 150 oak species (genus *Quercus*), including many endemics (Valencia 2004). Oaks are dominant species in many plant communities in this region, but few studies exist on their phenology and its relationship with climate (Williams-Linera 1997; Borchert et al. 2005). Some oak species at warm tropical locations in Mexico are known to flush in mid-March, resembling tropical trees that leaf during the late dry season, probably in response to increasing daylength (Williams-Linera 1997; Rivera et al. 2002; Borchert et al. 2005). However, detailed examination of phenological variation within particular species along altitudinal gradients has not been performed in any Mexican oak species. Such studies allow the isolation of the effect of variables that change with altitude (i.e., temperature, water availability) from others that remain constant (i.e., photoperiod).

The main objective of this study was to analyze leaf phenological variation of two deciduous oak species along an altitudinal gradient at tropical latitude. In particular, we aimed (i) to examine to what extent development of apical leaf buds is driven by temperature and precipitation and (ii) to determine if oak phenological responses across altitudinal gradients could provide a biological indicator of climatic warming at tropical latitudes.

## Materials and methods

### Study area and species

This study was conducted in the volcano of Tequila in Jalisco state (20°50'N, 103°51'W; maximum altitude of 2890 m), located in the western part of the Trans-Mexican Volcanic Belt in central Mexico. Two common species of deciduous white oaks (*Quercus magnoliifolia* Née and *Q. resinosa* Liebm.) were analyzed on a north-facing slope along an altitudinal transect in this volcano. Both start producing new leaves at the beginning of the spring, and old leaves are dropped out in the middle of the winter season. *Quercus magnoliifolia* was studied at altitudes of 1450, 1667, and 1787 m, and *Q. resinosa* was studied at altitudes of 1787, 2055, and 2110 m. The sites were chosen on the basis of their accessibility and abundance of trees of comparable size. In the volcano of Tequila, *Q. magnoliifolia* is distributed from 1360 to 2200 m but is a dominant tree between 1360 to 1800 m, and *Q. resinosa* increases its abundance above 1800 m.

### Meteorological measurements and estimation of soil water potential ( $\psi_{\text{ws}}$ )

Air temperature was measured using data loggers (HOBO Pro RH/Temp, Onset Computer Corporation, Bourne, Massachusetts) located at each site along the altitudinal gradient. At each site, a data logger was installed in the shade of a tree 1.5 m above ground level. The sensors were protected with plastic covers to prevent rain damage. Temperature data were recorded every hour from

August 2007 to July 2010. In 2008, data loggers at all altitudes suffered technical faults and daily temperatures from June to August were lost. The lost temperature data were gap-filled by interpolations from predicted model functions. The monthly mean temperature for each site was obtained by fitting linear regressions according to elevation using SigmaPlot for Windows (version 10.0; Systat Software, Inc. 2006). All regressions were highly significant ( $p < 0.001$ ).

Accumulated rainfall was recorded monthly by a rain gauge (All Weather Inc.) with an accuracy of 0.01 inches (25.4 mm). The system features a graduated cylinder with a scale in inches, located in a chamber to capture excess water, with a total capacity of 11 inches (269.5 mm), sufficient to record the accumulated rainfall for a month.

To obtain an estimate of water availability for each tree during the period of leaf development, we sampled soil cores under each individual tree. The organic portion of the soil (top 10 cm) was carefully removed, and a 10 × 10 cm hole was drilled with north orientation. The soil was collected and placed in 20 mL plastic bottles sealed with Parafilm (Pechinery Plastic Packaging Company, Chicago, Illinois). Soil samples were collected on four dates (only in 2010): 1 May, 8 May, 17 May, and 22 May. The soil water potential was calculated using a dew point potentiometer (model WP4-T, Decagon Devices, Inc., Pullman, Washington). This method uses the vapor pressure of a sample, which is estimated with a chilled mirror whose reflectance is measured by an optical device, to calculate the soil matric potential ( $\psi_{\text{ws}}$ , i.e., the strength of the adhesion of water molecules to the soil matrix).  $\psi_{\text{ws}}$  is a proxy of total water content, i.e., the amount of water contained in a weight or volume of soil (Fisher and Binkley 2000). The WP4-T calculates soil water potential with a precision of 0.1 MPa (Cambell et al. 2007).

The above-described climatic characterization conducted during three years (2008–2010) in the study sites indicated the existence of two marked seasons corresponding to wet and dry periods within a year, with significant differences in the average annual rainfall among sites along the altitudinal gradient (Table 1). Differences in the January–June mean temperature and the maximum temperature between low (1450 and 1667 m) and high elevations (1787 to 2110 m) were also found, although the minimum temperature did not differ along the altitudinal gradient (Table 1). Soil water potential did not differ among the four dates of measurement. The two sites at higher elevation had significantly higher soil water potential than the three sites at lower elevation (Table 1).

### Phenological observations

We chose 10 trees of *Q. magnoliifolia* at each altitude (1450, 1667, and 1787 m) and 10 trees of *Q. resinosa* at each altitude (1787, 2055, and 2110 m) (60 trees in total). The trees were 7–10 m in height and 15–20 cm in diameter at breast height. Because these oak species may hybridize, individuals were chosen on the basis of diagnostic morphological characters of each species (i.e., petiole length, pubescence, and lenticel abundance in the twigs) (for more details, see Albarrán-Lara et al. 2010).

We followed the development of 10 apical leaf buds per tree during three consecutive years (2008–2010). The buds were previously marked in 2007, and the observations were conducted on the same apical buds every year. Bud development was classified after Derory et al. (2006) into the following six different phenological stages (with their equivalence in the BBCH scale in parenthesis; Meier 2001): 0, bud quiescent (00 BBCH); 1, swelling bud (01 BBCH); 2, opening bud (07 BBCH); 3, budbreak (leaves start to grow) (09 BBCH); 4, leaf unfolding (one leaf at least is completely out of the bud) (11 BBCH); and 5, leaf spreading (internodes start to grow) (19 BBCH). The recordings of each stage were performed every day during the leafing period starting on 15 April in 2008 and 2009 and on 23 April in 2010. The observations were stopped once all of the buds reached stage 5.

The dates of bud burst (BB), leaf unfolding (LU), and leaf spreading (LS) for each tree were defined as the date at which 50% of the buds of a tree reached a particular stage (stages 3 to 5). For each site, the dates of BB, LU, and LS were considered as the average of the 10 trees per altitudinal population per species. The number of days between the opening of the buds and leaf spreading was considered as the time of leaf development for each tree.

### Statistical analysis

For each species, statistical differences in the onset of BB, LU, and LS among sites along the altitudinal gradient were determined using a generalized linear model with altitude (sites) as a fixed categorical factor and a Poisson error (Crawley 2007). For each model, homoscedasticity and normality of residuals were previously checked. The same procedure with a generalized linear model was used to test the differences between the two species in BB, LU, and LS at the altitude where both species are present (1787 m) (Crawley 2007). All the analyses were performed in R (R Development Core Team 2009).

The following set of relationships were explored using simple linear regressions for each species separately: BB, LU, LS, and total time of leaf development with (i) average temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) (January to June), (ii) rainfall, and (iii) soil water potential.

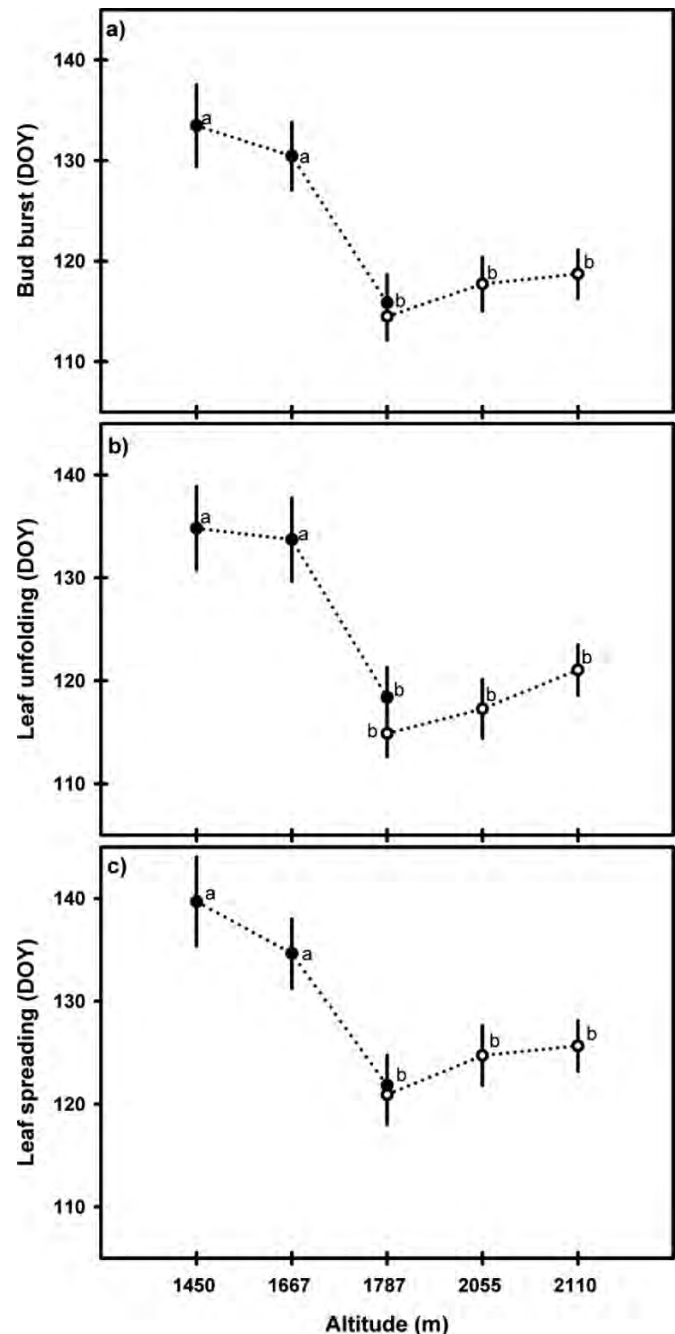
Because the comparison of the onset of BB, LU, and LS did not show significant differences in each population among the three years of study for all analyses, we pooled the three years of data of each of the three stages of leaf phenological development at each altitude.

## Results

### Phenology along the altitudinal gradient

The two oak species showed different phenological patterns along the altitudinal gradient. The population of *Q. magnoliifolia* at the highest altitude showed significantly earlier BB ( $\chi^2 = 22.21$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0.001$ ), LU ( $\chi^2 = 35.11$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0.001$ ), and LS ( $\chi^2 = 30.82$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0.001$ ) than populations of the same species distributed at lower elevations (Fig. 1). In contrast, individuals of *Q. resinosa* did not show significant variation in BB ( $\chi^2 = 2.073$ ,  $df = 2$ ,  $p > 0.05$ ), LU ( $\chi^2 = 3.673$ ,  $df = 2$ ,  $p > 0.05$ ), and LS ( $\chi^2 = 3.232$ ,  $df = 2$ ,  $p > 0.05$ ) among the different sites along the gradient (Fig. 1). The two species at the 1787 m site did not show significant differences in any of the three stages of phenological development (BB,  $\chi^2 = 0.9997$ ,  $df = 1$ ,  $p > 0.05$ ; LU,  $\chi^2 = 1.02$ ,  $df = 1$ ,  $p > 0.05$ ; LS,  $\chi^2 = 0.3212$ ,  $df = 1$ ,  $p > 0.05$ ) (Fig. 1).

**Fig. 1.** Leaf development (a, bud burst; b, leaf unfolding; and c, leaf spreading) for *Quercus magnoliifolia* (solid circles) and *Q. resinosa* (open circles) along an altitudinal gradient for three years (2008–2010). Each point represents the mean value of phenological observations on individual trees ( $n = 10$  trees) in the same altitudinal population for the three years. Means with the same letter did not differ significantly after a generalized linear model analysis. DOY, day of the year (1 January is day 1).

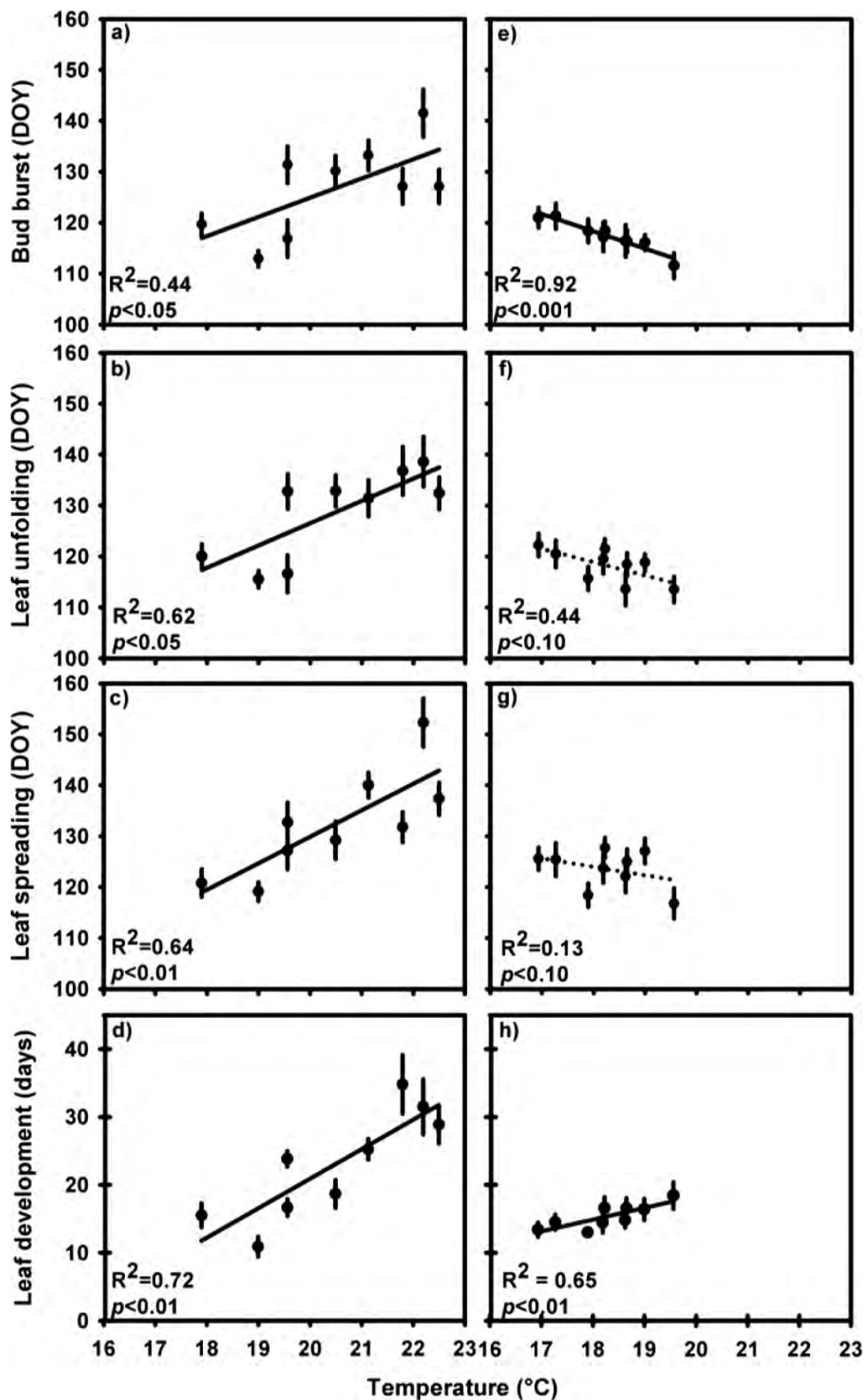


### Correlations of phenology with temperature

The dates of onset of BB, LU, and LS had positive correlations with temperature along the altitudinal gradient in *Q. magnoliifolia* (BB,  $R^2 = 0.445$ ,  $p < 0.05$ ; LU,  $R^2 = 0.616$ ,  $p < 0.05$ ; LS,  $R^2 = 0.642$ ,  $p < 0.01$ ) (Figs. 2a, 2b, and 2c, respectively). Higher temperature causes a delay of +3.8 days $\cdot^{\circ}\text{C}^{-1}$  in BB, +4.4 days $\cdot^{\circ}\text{C}^{-1}$  in LU, and +5.2 days $\cdot^{\circ}\text{C}^{-1}$  in LS in *Q. magnoliifolia*. For *Q. resinosa*, only BB was significantly and negatively correlated with temperature ( $R^2 = 0.916$ ,



**Fig. 2.** Relationships between leaf phenology (dates of bud burst, leaf unfolding, and leaf spreading) and total leaf development with mean temperatures from January to June for (a–d) *Quercus magnoliifolia* and (e–h) *Q. resinosa* along an altitudinal gradient for three years (2008–2010). DOY, day of the year (1 January is day 1).



Can. J. For. Res. Downloaded from www.nrcresearchpress.com by Los Angeles (UCLA) on 03/28/13  
For personal use only.

$p < 0.001$ ), with an advance of  $-3.41 \text{ days} \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$ . LU had a marginal significant correlation with temperature ( $R^2 = 0.441$ ,  $p < 0.10$ ), and LS had none ( $R^2 = 0.130$ ,  $p > 0.05$ ) (Figs. 2e, 2f, and 2g, respectively). Total time of leaf development showed a significant correlation with temperature in both *Q. magnoliifolia* ( $R^2 = 0.725$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 2d) and *Q. resinosa* ( $R^2 = 0.653$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 2h).

#### Relationship of leaf phenology with rainfall and soil water potential ( $\psi_{ws}$ )

BB, LU, and LS were not correlated with rainfall and soil water potential in the two species studied. Total leaf development was not significantly correlated with rainfall in *Q. magnoliifolia* ( $R^2 = 0.309$ ,  $p > 0.05$ ), but a significant negative correlation with rainfall ( $R^2 = 0.559$ ,  $p < 0.05$ ) was found in *Q. resinosa*, with a shortening in total leaf development with a ratio of 1.9 days per 100 mm of rain. Total leaf development showed a significant negative correlation with soil water potential in *Q. magnoliifolia* ( $R^2 = 0.996$ ,  $p < 0.05$ ) but not in *Q. resinosa* ( $R^2 = 0.350$ ,  $p < 0.10$ ).

#### Discussion

In this study, we analyzed the phenological patterns of two white oak species, *Q. magnoliifolia* and *Q. resinosa*, in an altitudinal gradient and their relationships with temperature and precipitation over three years. We found significant correlations between timing and duration of leaf development and temperature for *Q. magnoliifolia* and with precipitation for *Q. resinosa*, indicating different drivers for leaf development in these two partially co-occurring oak species. Studies on phenology of plants along altitudinal gradients have usually found a delay in phenology with increasing altitude. The Hopkins law predicts a delay of 3.3 days in the onset of spring phenology for every 100 m of altitude (Fitzjarrald et al. 2001), but reported values have ranged from 1 to 4 days per 100 m depending on the species (Dittmar and Elling 2006; Richardson et al. 2006; Vitasse et al. 2009a). In our study, the onset of bud burst in *Q. magnoliifolia* exhibited an opposite pattern, with an advance of 4.4 days per 100 m. Leaf unfolding and leaf spreading were also earlier with increasing altitude, with more marked rates (4.6 and 4.7 days per 100 m, respectively). This pattern is opposite to altitudinal clines found in other *Quercus* species (Vitasse et al. 2009b, 2009c), and to our knowledge, this is the first study in which phenology of a temperate tree species was advanced in relation to the increase in altitude under natural conditions. In *Q. resinosa*, the onset of bud burst and the patterns of leaf development were similar to those reported in other studies.

#### Variation in phenology driven by temperature

Altitude is a complex gradient that involves the intermixing of several environmental variables. In this study, we provide evidence that decomposing altitude into gradients of environmental variables such as temperature and water availability provides important insights into the causes of variation in leaf phenology in oak species. Leaf phenology had a different relationship with temperature in each of the two oak species. Lower temperatures were related to earlier onset dates of bud burst, leaf unfolding, and leaf spreading in *Q. magnoliifolia*. In contrast, lower temperatures delayed the onset of bud burst in *Q. resinosa*.

Air temperature is the main environmental factor that regulates the timing of bud burst in temperate trees (Cannell 1997). Most trees do not break the dormant buds in warm weather except after exposure to cool temperatures of  $10^\circ\text{C}$  or less (Hunter and Lechowicz 1992). Apparently, *Q. resinosa* behaves as a typical temperate tree of higher latitudes, but the phenology of *Q. magnoliifolia* follows a pattern opposite to the commonly observed earlier onset of bud burst and faster leaf growth rate with higher temperature in trees of temperate forests.

Williams-Linera (1997) found significant temporal synchronization between leaf phenology and temperature in several deciduous tree species of temperate affinity in a montane forest in

Mexico. However, this study was conducted in a single site, and therefore variation among intraspecific populations along an environmental gradient was not assessed. In other studies, common garden experiments have been used to evaluate the genetic basis of phenological variation related to altitude in several European trees (Vitasse et al. 2009a). *Fagus sylvatica* showed a negative correlation between altitude of origin and flushing time, whereas other species showed a positive correlation along the same climatic gradient. However, in natural conditions, *F. sylvatica* showed a positive correlation between altitude and flushing time, as did other six tree species evaluated (Vitasse et al. 2009b).

#### Relationship between phenology and water availability

*Quercus magnoliifolia* and *Q. resinosa* are two oak deciduous species established in temperate forests at tropical latitudes. In seasonally dry tropical areas, plants respond to variations in temperature and water availability through leaf deciduousness, which evolved as a mechanism to alleviate water deficits or to increase drought resistance (Borchert 1994a, 1994b). We may therefore expect the timing of bud burst and leaf flushing in *Q. magnoliifolia* and *Q. resinosa* to respond to rainfall because of its marked seasonality at the study site. Three years of climatic monitoring indicated that over 90% of annual precipitation falls between June and October in the Tequila Volcano. However, we found that spring leaf phenology (bud burst, leaf unfolding, and leaf spreading) was not correlated with the annual amount of rainfall. It is very likely that the dates of the first substantial rainfalls after the dry period might influence the bud burst date. Unfortunately, we did not obtain data on when the first substantial rainfalls occurred. Once the budding started, a minimum of water availability in ground water reserves may be required to complete leaf development.

The contrasting results for the two oak species studied may indicate that other factors besides temperature and rainfall are driving the leaf phenology of temperate species in tropical latitudes. For example, in tropical dry forests, the onset of bud burst and leafing are determined by seasonal variation in tree water status, day length, and shedding of older leaves (Borchert 1994a, 1994b, 2004; Rivera et al. 2002; Borchert et al. 2005).

#### Conclusions

It has been previously proposed that the phenology of temperate trees in tropical latitudes might not be a good indicator of global warming because of the complex interactions of temperature with other relevant factors such as seasonal rainfall, soil water storage, and photoperiod, making phenological patterns unpredictable from climatic data (Borchert et al. 2005). However, our results indicate that altitudinal gradients are useful to disentangle some of the interactions among relevant variables and that temperature might actually have at least a partial influence on the phenology of some tree species at tropical latitudes. The divergent leaf phenology pattern of oak species described in this study illustrates that species may respond in different directions to climatic changes. Future studies combining long-term phenological observations, common garden experiments to discriminate between adaptation or plasticity, physiology of tree root systems, and the genetic basis of leaf development may contribute to a better understanding of the evolutionary responses of trees to climatic changes.

#### Acknowledgments

We thank G. Sánchez Primo Martínez for field assistance and F.J. López Chávez and his family for logistical support. Comments by three anonymous reviewers to previous versions of the manuscript are appreciated. This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of Mexico (UNAM). E. Hernández-Calderón acknowledges the scholarship and financial support

provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT; grant No. 43987) and UNAM. This project was supported by CONACyT grant 2006-23728 to K. Oyama.

## References

- Ahas, R., Aasa, A., Menzel, A., Fedotova, V.G., and Scheffinger, H. 2002. Changes in European spring phenology. *Int. J. Climatol.* **22**(14): 1727–1738. doi:10.1002/joc.818.
- Albarrán-Lara, A.L., Mendoza-Cuenca, L., Valencia-Ávalos, S., González-Rodríguez, A., and Oyama, K. 2010. Leaf fluctuating asymmetry increases with hybridization and introgression between *Quercus magnoliifolia* and *Quercus resinosa* (Fagaceae) along an altitudinal gradient in Mexico. *Int. J. Plant Sci.* **171**(3): 310–322. doi:10.1086/650317.
- Badeck, F.W., Bondeau, A., Böttcher, K., Doktor, D., Lucht, W., Schaber, J., and Sitch, S. 2004. Responses of spring phenology to climate change. *New Phytol.* **162**(2): 295–309. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01059.x.
- Borchert, R. 1994a. Soil and stem water storage determine phenology and distribution of tropical dry forest trees. *Ecology*, **75**(5): 1437–1449. doi:10.2307/1937467.
- Borchert, R. 1994b. Water status and development of tropical trees during seasonal drought. *Trees*, **8**(3): 115–125. doi:10.1007/BF00196635.
- Borchert, R. 2004. Environmental control of tropical tree phenology. Available from [http://www.biology.ku.edu/tropical\\_tree\\_phenology/](http://www.biology.ku.edu/tropical_tree_phenology/) [accessed 15 November 2011].
- Borchert, R., Robertson, K., Schwartz, M.D., and Williams-Linera, G. 2005. Phenology of temperate trees in tropical climates. *Int. J. Biometeorol.* **50**(1): 57–65. doi:10.1007/s00484-005-0261-7.
- Cambell, G.S., Smith, D.M., and Teare, B.L. 2007. Application of a dew-point method to obtain the soil water characteristics. In *Experimental unsaturated soil mechanics*. Edited by T. Schanz. Springer-Verlag, New York. pp. 71–77.
- Cannell, M.G.R. 1997. Spring phenology of trees and frost avoidance. *Weather*, **52**(2): 46–52. doi:10.1002/j.1477-8696.1997.tb06268.x.
- Cannell, M.G.R., and Smith, R.I. 1986. Climate warming, spring bud burst and frost damage on trees. *J. Appl. Ecol.* **23**(1): 177–191. doi:10.2307/2403090.
- Chmielewski, F.M., and Rotzer, T. 2001. Response of tree phenology to climate change across Europe. *Agric. For. Meteorol.* **108**(2): 101–112. doi:10.1016/S0168-1923(01)00233-7.
- Chuine, I., and Beaubien, E.G. 2001. Phenology is a major determinant of tree species range. *Ecol. Lett.* **4**(5): 500–510. doi:10.1046/j.1461-0248.2001.00261.x.
- Crawley, M.J. 2007. *The R book*. John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, UK.
- Derory, J., Léger, P., García, V., Schaeffer, J., Hauser, M.-T., Salin, F., Luschign, Ch., Plomion, Ch., Glössl, J., and Kremer, A. 2006. Transcriptome analysis of bud burst in sessile oak (*Quercus petraea*). *New Phytol.* **170**(4): 723–738. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01721.x.
- Dittmar, C., and Elling, W. 2006. Phenological phases of common beech (*Fagus sylvatica* L.) and their dependence on region and altitude in southern Germany. *Eur. J. For. Res.* **125**(2): 181–188. doi:10.1007/s10342-005-0099-x.
- Fisher, R.F., and Binkley, D. 2000. *Ecology and management of forest soils*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Fitzjarrald, D.R., Acevedo, O.C., and Moore, K.E. 2001. Climatic consequences of leaf presence in the eastern United States. *J. Climate*, **14**(4): 598–614. doi:10.1175/1520-0442(2001)014<0598:CCOLPI>2.0.CO;2.
- Hunter, A.F., and Lechowicz, M.J. 1992. Predicting the timing of bud burst in temperate trees. *J. Appl. Ecol.* **29**(3): 597–604. doi:10.2307/2404467.
- Kramer, K. 1995. Phenotypic plasticity of the phenology of seven European tree species in relation to climatic warming. *Plant Cell Environ.* **18**(2): 93–104. doi:10.1111/j.1365-3040.1995.tb00356.x.
- Meier, U. 2001. The extended BBCH-scale, general. In *Growth stages of mono- and dicotyledonous plants*. 2nd ed. BBCH Monograph. Edited by U. Meier. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry. Blackwell Wissenschafts, Berlin. pp. 3–10.
- Menzel, A. 2002. Phenology: its importance to the global change community. *Clim. Change*, **54**(4): 379–385. doi:10.1023/A:1016125215496.
- Menzel, A., Sparks, T.H., Estrella, N., Koch, E., Aasa, O., Ahas, R., Alm-Kübler, K., Bissolli, P., Braslavská, O., Briede, A., Chmielewski, F.M., Crepinsek, Z., Curnel, Y., Dahl, Á., Defila, C., Donnelly, A., Filella, Y., Jatczak, K., Måge, F., Mestre, A., Nordli, Ø., Peñuelas, J., Pirinen, P., Remišová, V., Scheffinger, H., Striz, M., Susnik, A., Van Vliet, A.J.H., Wielgolaski, F.-E., Zach, S., and Züst, A. 2006. European phenological response to climate change matches the warming pattern. *Global Change Biol.* **12**(10): 1969–1976. doi:10.1111/j.1365-2486.2006.01193.x.
- Murray, M.B., Cannell, M.G.R., and Smith, R.I. 1989. Date of bud burst of fifteen tree species in Britain following climatic warming. *J. Appl. Ecol.* **26**(2): 693–700. doi:10.2307/2404093.
- R Development Core Team. 2009. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from <http://www.R-project.org/>.
- Reusch, T.B.H., and Wood, T.E. 2007. Molecular ecology of global change. *Mol. Ecol.* **16**(19): 3973–3992. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03454.x.
- Richardson, A.D., Bailey, A.S., Denny, E.G., Martin, C.W., and O’Keefe, J. 2006. Phenology of a northern hardwood forest canopy. *Global Change Biol.* **12**(7): 1174–1188. doi:10.1111/j.1365-2486.2006.01164.x.
- Rivera, G., Elliott, S., Caldas, L.S., Nicolossi, G., Coradin, V.T.R., and Borchert, R. 2002. Increasing day-length induces spring flushing of tropical dry forest trees in the absence of rain. *Trees*, **16**(7): 445–456. doi:10.1007/s00468-002-0185-3.
- Ryan, M.G., and Yoder, B.J. 1997. Hydraulic limits to tree height and tree growth. *Bioscience*, **47**(4): 235–242. doi:10.2307/1313077.
- Systat Software, Inc. 2006. *SigmaPlot for Windows V. 10.0. Build 10.0.0.54*. Systat Software, Inc., San Jose, California.
- Valencia, S.A. 2004. Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Bol. Soc. Bot. Méx.* **75**: 33–53.
- Visser, M.E., and Both, C. 2005. Shifts in phenology due to global climate change: the need for a yardstick. *Proc. R. Soc. B.* **272**(1581): 2561–2569. doi:10.1098/rspb.2005.3356.
- Vitasse, Y., Delzon, S., Bresson, C.C., Michalet, R., and Kremer, A. 2009a. Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden. *Can. J. For. Res.* **39**(7): 1259–1269. doi:10.1139/X09-054.
- Vitasse, Y., Delzon, S., Dufrene, E., Pontailier, J.-Y., Louvet, J.-M., Kremer, A., and Michalet, R. 2009b. Leaf phenology sensitivity to temperature in European trees: do within-species populations exhibit similar responses? *Agric. For. Meteorol.* **149**(5): 735–744. doi:10.1016/j.agrformet.2008.10.019.
- Vitasse, Y., Porté, A.J., Kremer, A., Michalet, R., and Delzon, S. 2009c. Responses of canopy duration to temperature changes in four temperate tree species: relative contributions of spring and autumn leaf phenology. *Oecologia*, **161**(1): 187–198. doi:10.1007/s00442-009-1363-4.
- Wesołowski, T., and Rowiński, P. 2006. Timing of bud burst and tree-leaf development in a multispecies temperate forest. *For. Ecol. Manag.* **237**(1–3): 387–393. doi:10.1016/j.foreco.2006.09.061.
- Williams-Linera, G. 1997. Phenology of deciduous and broadleaved-evergreen tree species in a Mexican tropical lower montane forest. *Global Ecol. Biogeogr. Lett.* **6**(2): 115–127. doi:10.2307/2997568.

**VII.**

**Erasto Hernández-Calderón & Ken Oyama.**

**Ecología molecular de caracteres adaptativos  
fenológicos de árboles de zonas templadas.**

**Artículo de revisión. Para someterse en Botanical  
Sciences.**

1 **Ecología molecular de caracteres adaptativos fenológicos de árboles de zonas**  
2 **templadas.**

3 **Erasto Hernández-Calderón\* & Ken Oyama.**

4 **Hernández-Calderón, E.** ([eras3000@yahoo.unam.mx](mailto:eras3000@yahoo.unam.mx)). Centro de Investigaciones en  
5 Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Antigua Carretera a  
6 Pátzcuaro No. 8701 Col. Ex-Hacienda de San José de La Huerta, Morelia Michoacán.  
7 México 58190.

8 **Oyama, K.** ([kenoyama@cieco.unam.mx](mailto:kenoyama@cieco.unam.mx)): Escuela Nacional de Estudios Superiores  
9 Campus Morelia and Centro de Investigaciones en Ecosistemas, UNAM, Antigua Carretera  
10 a Pátzcuaro No. 8701 Col. Ex-Hacienda de San José de La Huerta, Morelia Michoacán.  
11 México 58190.  
12

13 **Resumen**

14 La base genética de la inducción y liberación de la latencia ha sido estudiada en árboles de  
15 zonas templadas como *Castanea*, *Populus*, *Quercus*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudotsuga* utilizando  
16 principalmente el mapeo de QTLs. El creciente incremento de los recurso genómicos ha  
17 permitido realizar estudios expresionales globales en yemas apicales foliares y tejidos en  
18 estado latente y no latentes en árboles forestales y otros de importancia económica a partir  
19 de los cuales se ha disectado la base molecular para las vías de señalización de la fenología.  
20 Los recursos genómicos han generado miles de marcadores genéticos tipo EST y SSR para  
21 analizar la variación en genes candidato funcionales y las respuestas a la selección natural y  
22 al cambio climático. En base a la cantidad de recursos genómicos *Populus* y *Quercus*  
23 surgen como modelos emergentes para estudiar la base genética de la adaptación.

24 **Abstract.**

25 The genetic basis of the induction and release of dormancy has been studied in temperate  
26 trees as a *Castanea*, *Populus*, *Quercus*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudotsuga* using QTL mapping.  
27 The increasing of genomic resources has enabled global expressional studies in apical leaf  
28 buds and tissues in dormant and non-dormant state in forest trees and other economically  
29 important plants from which has dissected the molecular basis for signaling pathways of  
30 the phenology. Genomic resources have generated thousands of genetic markers like- EST  
31 and SSR to analyzing the variation in functional in candidate genes to study the responses  
32 to natural selection and climate change. Based on the amount of genomic resources *Populus*  
33 and *Quercus* arise as a emerging tree models for studying the genetic basis of adaptation.

34

## 35 **Introducción.**

36 La fenología es el estudio de eventos biológicos cíclicos, como la floración, producción de  
37 frutos y la emergencia de las hojas (Davi *et al.*, 2011), estos fenómenos dependen de  
38 parcialmente patrones climáticos como la temperatura, precipitación y de factores no  
39 climáticos como el fotoperiodo constituyendo una característica adaptativa de las plantas a  
40 la variación ambiental (Bertin, 2008; Howe *et al.*, 2003). Para entender los mecanismos que  
41 controlan la emergencia de las hojas es necesario conocer las bases ecológicas, genéticas y  
42 moleculares que gobiernan la imposición, mantenimiento y liberación de la latencia de  
43 meristemos. En regiones templadas y frías con distinta estacionalidad, la latencia coincide  
44 con condiciones desfavorables en invierno (Myking y Heide 1995). ). La latencia, en  
45 general, es definida como la suspensión temporal visible del crecimiento de cualquier  
46 estructura que contiene un meristemo (Lang, 1987). La ruptura del estado latente es dirigida  
47 por el frío durante el invierno. La liberación de la sucede después de la acumulación de  
48 calor latencia y promueve la apertura de las yemas y la reanudación del crecimiento en  
49 primavera (Hänninen *et al.*, 1990).

50 La regulación de la latencia por señales ambientales en yemas vegetativas es un proceso  
51 complejo necesario para la sobrevivencia, desarrollo y arquitectura de las plantas (Chao *et*  
52 *al.*, 2007) y ayuda a proteger a la plantas de condiciones desfavorables. Lang (1987)  
53 categorizo los estados de latencia como: 1) paralatencia, la inhibición del crecimiento por  
54 órganos distales, 2) endolatencia, la inhibición de la latencia por señales internas de la  
55 yema; y 3) ecolatencia, la inhibición del crecimiento por condiciones ambientales  
56 desfavorables. La vía para la inducción, mantenimiento y liberación de la latencia es un  
57 continuo y ha sido tópico de cientos de artículos a la fecha (Arora *et al.* 2003). Los estudios

58 de la regulación de este proceso han resultado en algunos de los descubrimientos más  
59 fundamentales para las ciencias vegetales (Horvat et al. 2003) y siguen siendo un tópico de  
60 interés.

61 La liberación de la latencia tiene por consecuencia el crecimiento de yemas vegetativas y es  
62 promovida por factores endógenos y exógenos como la temperatura, estatus nutricional,  
63 fotoperiodo, fitohormonas, expresión y represión de genes que son acompañadas por  
64 múltiples divisiones celulares (Arora *et al.*, 2003; den Boer y Murray 2000). Durante la  
65 imposición, los principales inductores son señales hormonales y ambientales, los cuales  
66 ejercen sus efectos a través de la activación o inactivación de genes que dictan los  
67 programas para la endo y ecolatencia (Lang *et al.*, 1987). Dado que está influenciada por  
68 señales ambientales su regulación está controlada en parte por mecanismos epigenéticos  
69 (Valledor *et al.*, 2007). La liberación de la latencia está asociada con el incremento de la  
70 temperatura en primavera e involucra cambios en la expresión de genes con diversas  
71 funciones celulares entre las cuales destacan los relacionados a la producción de energía,  
72 síntesis de proteínas, factores de transcripción, genes de respuesta a estrés y rescate celular  
73 (Derory *et al.* 2006).

74 La evidencia genética para un amplio rango de especies de árboles forestales indica que el  
75 tiempo de la brotación de las yemas es un rasgo cuantitativo. Se ha encontrado un  
76 moderado a un fuerte control genético asociado con caracteres relacionados a la fenología  
77 foliar medida por valores de heredabilidad ( $h^2$ ) para la brotación de yemas en *Populus*  
78 ( $h^2=0.48 - 0.80$ ) (Howe *et al.*, 2000), *Salix* ( $h^2 = 0.43 - 0.80$ ) (Tsarouhas *et al.*, 2003),  
79 *Pseudotsuga menziesii* ( $h^2 = 0.44 - 0.95$ ) (Li y Adams, 1993). La heredabilidad en *Quercus*  
80 ha sido estimada entre 0.15 - 0.87 (Jenssen 1993; Scotti-Saintagne *et al.*, 2004). A la fecha



81 se han determinado algunos genes responsables de la variación de los QTL que controlan la  
82 fenología foliar.

83 El estudio de la fenología ha recobrado mucha importancia en los últimos años debido a  
84 que el principal factor ambiental asociado a la variación fenológica es la temperatura. Su  
85 relación con esta variable ambiental le otorga hace que la fenología foliar tenga un valor  
86 adaptativo ante el cambio climático además de ser un bioindicador del mismo en árboles de  
87 zonas templadas y frías (Bertin 2008). Hay ahora amplia evidencia de que en las últimas  
88 décadas la fenología de muchas plantas se ha modificado y que esos cambios se encuentran  
89 relacionados al calentamiento global (Hughes 2000; Walther *et al.*, 2002; Parmesan y  
90 Yohe 2003; Root *et al.*, 2003).

91 La disminución de la variabilidad es una de las limitantes genéticas que puede impedir la  
92 adaptación al cambio climático (Davis *et al.*, 2005). Monitorear la diversidad genética para  
93 caracteres adaptativos en plantas usualmente es realizado en experimentos de jardín común.  
94 Los genetistas forestales han luchado por décadas para el establecimiento de pruebas de  
95 procedencia. Sin embargo tales investigaciones son costosas y se obtienen resultados hasta  
96 que los árboles alcanzan el estado adulto. Para esas especies la genómica puede ofrecer un  
97 acceso directo a las pruebas de campo para explorar la diversidad genética si se han  
98 identificado los genes de significado adaptativo (Ueno *et al.*, 2010). La investigación de los  
99 bosques forestales surge como un modelo no clásico en eucariontes para estudios  
100 evolutivos y ecológico-genómicos. Los árboles son organismos ideales para develar la base  
101 molecular de la divergencia adaptativa en la naturaleza (González-Martínez *et al.*, 2006). A  
102 la fecha, los recursos genómicos se han incrementado enormemente en tres géneros de  
103 árboles, *Eucalyptus*, *Populus* y *Quercus*. *Populus trichocarpa* (Tuskan *et al.*, 2006) se

104 encuentra totalmente secuenciado. Dos grandes proyectos de secuenciación del eucalipto se  
105 han completado el de *Eucalyptus camaldulensis* por el Instituto de Investigación Kazusa  
106 DNA en Japón (<http://www.kazusa.or.jp/e/resources/database.html>) y el de *E. grandis* por  
107 parte de departamento de energía (DOE) y el Joint Genome Institute (JGI) de los Estados  
108 Unidos (<http://web.up.ac.za/eucagen/default.aspx?a1=1>). Un mapa del genoma de *Quercus*  
109 *robur* se encuentra disponible (Barrenche *et al.*, 1998). La secuenciación de la castaña  
110 americana recientemente a comenzado (Fagaceae Genomics Web).

111 Catálogos de secuencias expresadas etiquetadas (Expressed sequence tags, EST por sus  
112 siglas en ingles) son desarrollados a partir de bibliotecas de cADN para obtener  
113 información expresional de las secuencias en condiciones ambientales contrastantes o en  
114 diferentes estados de desarrollo. Cuando están disponibles ofrecen una fuente poco costosa  
115 de marcadores genéticos (Ellis y Burke 2007). Con el incremento de la disponibilidad de la  
116 información de las secuencias en genes funcionales, la caracterización de la diversidad  
117 genética adaptativa y su asociación con la variación fenotípica se convierte en accesible  
118 *Quercus*. En este género las poblaciones se entrecruzan y tienen tamaños efectivos  
119 grandes lo que permite una gran variación en genes funcionales que resulta útil para  
120 estudiar la base adaptativa a ambientes variables, cambiantes y/o modificados por el  
121 hombre (Gailing *et al.*, 2009). Con base en la complejidad del fenómeno, en esta revisión  
122 se abordan los aspectos genético-moleculares de la inducción y la liberación de la latencia  
123 de yemas foliares de árboles perenes y caducifolios de zonas templadas haciendo énfasis  
124 en el género *Quercus*, así como sus implicaciones en el sentido adaptativo.

125 **Herramientas moleculares empleadas en el descubrimiento de genes relacionados a la**  
126 **fenología.**

## 127 **Marcadores moleculares**

128 El mapeo genético en árboles forestales ha estado en marcha desde hace 20 años y ha  
129 avanzado con el desarrollo de la tecnología en marcadores genéticos, algoritmos para  
130 mapeo y software (TreeGenes database). Los mapas genéticos iniciales fueron construidos  
131 con marcadores polimórficos de longitud en fragmentos de restricción (RFLP). La siguiente  
132 generación de mapas fueron hechos con Marcadores de DNA polimórficos amplificados al  
133 azar (RAPD) y polimorfismos amplificados en fragmentos de longitud (AFLP). Sin  
134 embargo esos marcadores tienen problemas de reproducibilidad. Los mapas con  
135 marcadores de secuencias simples repetidas (SSR) fueron realizados para pocas especies  
136 debido al alto costo del desarrollo de los marcadores SSR (Neale y Kremer, 2011).  
137 Recientemente se ha utilizado los marcadores tipo polimorfismos de un solo nucleótido  
138 mediante los cuales es posible realizar genotipificación SNP de alto rendimiento y obtener  
139 mapas genéticos densos (Eckert *et al.*, 2009). El descubrimiento de SNP por secuenciación  
140 de genes candidato ha sido el principal foco en la genómica de árboles en recientes años. La  
141 frecuencia de SNP en árboles forestales es alto, generalmente en el rango de 1 SNP por 100  
142 pares de base (bp) entre las especies que han sido objeto de reconocimiento (Neale 2006;  
143 Neale y Ingvarsson 2008; Savolainen y Pyhajarvi, 2007).

## 144 **Construcción de mapas genéticos.**

145 Los mapas de ligamiento se basan en el hecho de que, durante la meiosis, los loci que se  
146 encuentran en diferentes cromosomas se separan al azar en los gametos, mientras que los  
147 que se encuentran en un mismo cromosoma tienden a co-segregar, al menos que un evento  
148 de recombinación rompa esta asociación de tipo parental. Mientras que los mapas de

149 ligamiento requieren de la realización de protocolos con cruza, los mapas cromosómicos  
150 se logran usando técnicas que no incluyen la reproducción sexual y, por lo tanto, asigna una  
151 localización según las regiones citogenéticas y no requieren del uso de marcadores  
152 polimórficos. Esas técnicas son: a) hibridación *in situ*; b) la hibridación de células  
153 somáticas, C) híbridos por radiación. Un mapa físico es la representación real de  
154 alineamiento de los genes en un cromosoma. El orden de los genes es el mismo que el dado  
155 por los mapas de ligamiento pero las distancias son medidas en kb o MB. Pueden lograrse  
156 por diversos métodos pero el más conveniente es el ordenamiento de grupos de clones  
157 superpuestos (contigs) ya sean estos clonados en fagos (PI), cósmidos, cromosomas  
158 artificiales de bacterias (BAC's), cromosomas artificiales de levaduras (YAC's). Los mapas  
159 de ligamiento y cromosómicos se basan en la herencia de rasgo simples, sin embargo  
160 muchos de los rasgos son naturalmente de carácter cuantitativo; por lo tanto se ven  
161 influenciados por muchos genes simultáneamente y por factores ambientales. Para estos  
162 rasgos se utiliza el mapeo de un QTL.

### 163 **Secuencias marcadas etiquetadas (Expressed sequence tags, EST).**

164 La genómica forestal comenzó cuando los proyectos de secuencias expresada marcadas  
165 (EST) se iniciaron en pino y álamo. La secuenciación de EST es un método barato y  
166 eficiente para descubrir genes, más allá del tremendo valor de las versiones completas y  
167 analizadas de las secuencias genómicas, no es razonable esperar hasta ese momento para  
168 diseñar mapas de transcripción. En la actualidad se construyen estos mapas sobre la base  
169 de fragmentos cortos de cADN amplificados por PCR a partir de extremos no traducidos de  
170 ARNm, denominados EST's. Se ha logrado un progreso enorme en la obtención de  
171 secuencias parciales obtenidas de clones de cADN (EST).

172 Dada la biología única de los árboles, se consideró que el descubrimiento de los genes  
173 debería dar prioridad a la identificación de genes específicos en árboles. Estos esfuerzos  
174 iniciales basados en el álamo y en el pino fueron modestos en alcance: las primeras  
175 publicaciones reportaron 5000 y 1000 EST para las especies respectivamente. Desde  
176 entonces cerca de 80 000 ESTs han sido secuenciados para el pino  
177 ([www.pinetree.ccg.umn.edu](http://www.pinetree.ccg.umn.edu)) y alrededor de 13 000 para el álamo  
178 ([www.poppel.fysbot.umu.se](http://www.poppel.fysbot.umu.se)).

### 179 **Secuenciación de genomas**

180 La información más detallada que podemos obtener de una región del genoma o del  
181 genoma completo es su secuencia nucleotídica. Secuenciar fragmentos pequeños de ADN  
182 (obtenido por técnicas de sub-clonación o por PCR) es relativamente fácil. Una vez  
183 secuenciado todo el genoma es necesario ensamblarlo. Aun cuando estén mapeados y  
184 secuenciados todos los genes de un organismo se necesitan de análisis bioinformáticos para  
185 comprender la función, la regulación y la interacción de esos genes (post-genómica), los  
186 estudios con plantas transgénicas permite corroborar la función hipotética “*in vivo*” de los  
187 genes la cual se han llevado a cabo en el árbol modelo *Populus* (Boerjan, 2005).

### 188 **Transcriptoma**

189 Se reconoce que el simple descubrimiento de los genes a partir de los análisis de EST no  
190 permite todo el potencial de los métodos genómicos para la investigación de la genética  
191 forestal. Es necesario obtener un mejor entendimiento de los patrones de expresión en un  
192 nivel temporal y espacial. Una plataforma para perfiles de transcripción fue establecida en  
193 el álamo utilizando los primero conjuntos de secuencias EST. Esta técnica se la conoce

194 como microarreglos. Un microarreglo es un conjunto de genes ordenados en una pequeña  
195 superficie (10, 000 muestras por cm<sup>2</sup>). Las bibliotecas genómicas completas se depositan  
196 en microplacas con una ubicación exacta de cada uno de los genes, a estas placas se les  
197 hibridan con sondas de interés, que se obtienen a partir de las síntesis del cDNA marcada  
198 con una molécula fluorescente. Los sitios en donde se hibridan biblioteca-sonda se  
199 observan como imágenes fluorescentes que indican la sobrerregulación o la subregulación  
200 de los genes, es posible obtener valores cuantitativos de cada una de las señales que  
201 finalmente pueden ser corroboradas por técnicas de PCR en tiempo real.

## 202 **PCR en tiempo real.**

203 En los últimos años, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o PCR  
204 cuantitativo ha surgido como una metodología robusta y ampliamente utilizada en  
205 investigación biológica ya que puede detectar y cuantificar cantidades muy pequeñas de  
206 secuencias específicas de ácidos nucleicos. La principal aplicación de esta tecnología es la  
207 rápida y precisa valoración de cambios en la expresión de genes como resultado a  
208 diferentes condiciones (diferentes estados de desarrollo, diferentes ambientes, diferentes  
209 condiciones experimentales, etc.). Mediante esta técnica se cuantifican la cantidad de ARN  
210 mensajero gracias al uso de las transcriptasas inversas que generan ADN complementario  
211 (cADN), la cantidad generada de cAND por retrotranscripción es proporcional al número  
212 de moléculas de ARN presentes en la muestra. Desde el punto de vista más simple, esta  
213 técnica se basa en la detección de una señal fluorescente producida proporcionalmente  
214 durante la amplificación de DNA o cDNA. La PCR cuantitativa determina el momento en  
215 el tiempo durante el proceso de ciclado cuando se detecta por primera vez la amplificación  
216 de PCR, que corresponde con el ciclo en el que la intensidad de la señal del reportero

217 marcado es mayor que la intensidad del ruido de fondo. A este ciclo se le conoce como  
218 ciclo umbral o “threshold cycle” (Ct). Este ciclo umbral determina la fase exponencial de la  
219 reacción y es inversamente proporcional al número de copias originales en la muestra. Se  
220 utilizan como sondas reporteras el SYBR green, sondas de hidrólisis, molecular beacons,  
221 primers marcados, sondas scorpions y sondas FRET.

## 222 **Métodos genéticos para estudiar la adaptación.**

223 Los métodos genéticos comúnmente utilizados para comparar poblaciones naturales son los  
224 scans genómicos que involucran un gran número de marcadores para determinar cuales  
225 están más diferenciados de lo esperado por la neutralidad (Prunier *et al.*, 2011). La  
226 comparación de secuencias de DNA en poblaciones naturales a partir de la hibridación de  
227 DNA sobre microarreglos u otras técnicas puede identificar áreas altamente divergentes  
228 del genoma como los extremos clinales (Turner *et al.*, 2008). Los polimorfismos genéticos  
229 permiten conectar loci polimórficos a la adaptación climática a través del tiempo (Umida *et*  
230 *al.*, 2005). Otro conjunto de métodos son los basados en poblaciones manipuladas, entre  
231 estos tenemos los experimentos de selección y evolución artificial que permiten unir  
232 caracteres relacionados al cambio climático directamente sobre poblaciones que están  
233 localizadas en ambientes que simulan los efectos del cambio climático (Bell y González  
234 ,2009). La comparación de genes candidato se basa en conjuntos de genes que son  
235 candidatos para la divergencia adaptativa a lo largo de gradientes en base a polimorfismos  
236 de DNA o secuencias (Lee *et al.*, 2011). La comparación de transcriptomas se realizan a  
237 partir de estudiar la expresión de genes mediante microarreglos y puede ser útil para  
238 identificar genes que están diferenciados entre poblaciones y extremos clinales (Healy *et*  
239 *al.*, 2010). El mapeo de QTLs permite comparar caracteres cuantitativos en organismos

240 genéticamente homocigotos (Morgan y Mackay, 2006). El mapeo de asociación se basa en  
241 comparar marcadores genéticos con caracteres cuantitativos asociados con la adaptación al  
242 cambio climático (Brachi *et al.*, 2010).

243

244



245 **Genética de la fenología.**

246 Debido a los largos tiempos de generación en la mayoría de los árboles forestales la  
247 producción de F2 o familias de retrocruzamiento para el mapeo de QTL no es factible en  
248 un lapso de tiempo razonable (Gailing *et al.*, 2009). Sin embargo los altos niveles de  
249 heterozigocidad debidas al entrecruzamiento permite utilizar progenies F1 completas o  
250 progenies de medios hermanos para la construcción de mapas genéticos (Gailing *et al.*,  
251 2009). Pruebas cruzadas con marcadores en machos y hembras son utilizadas por separado  
252 para construir mapas de ligamiento que pueden ser alineadas por marcadores segregantes en  
253 ambos parentales (Kremer *et al.*, 2007). Esta estrategia cruzada de dos vías (Grattapaglia  
254 2007) ha sido el método de elección para la construcción de mapas de ligamiento y mapeo  
255 de QTLs para un amplio rango de caracteres incluyendo la fenología en árboles forestales  
256 (Eriksson y Ekberg, 2001; Jermstad *et al.*, 2001; Kremer *et al.*, 2007; Krutovsky y Neale,  
257 2005b; Saintagne *et al.*, 2004; Krutovsky y Neale 2005).

258 El mapeo de QTL que controlan la fenología ha sido variable. En el género *Populus* 3 QTL  
259 controla la formación de yemas y 6 controla la apertura de las mismas (Frewen *et al.*,  
260 2000). En *Populus nigra* los QTL que controla la formación de yemas en diferentes  
261 pedigrís son recurrentemente detectados en seis regiones del genoma, esas regiones  
262 contienen entre 202 y 394 genes candidatos (Rohde *et al.*, 2011).

263 En *Q. robur* la apertura de la yema está controlada por 32 QTLs. Cada QTL tiene un bajo a  
264 moderado efecto (3%-11% de la varianza) pero contribuye a una alta varianza genética  
265 (Scotti –Saintagne *et al.*, 2004). En una cruce de *Q. robur* x *Q. robur* (familia de hermanos  
266 completos) se mapearon los QTL sobre un mapa de ligamiento y se encontró que los QTL

267 detectados explican entre el 16.2-38.1% de la varianza fenotípica total (Galling, 2005).  
268 Un número estadísticamente significativo de de co-localización de QTLs que controlan la  
269 apertura de la yema fue encontrada entre *Q. robur* y *Castanea sativa* indicando que los  
270 QTL entre estas dos especies se encuentran conservados probablemente debido a que las  
271 presiones de selección actuaron sobre las mismas regiones genómicas a través de  
272 mecanismos que mantienen la diversidad sobre los tiempos evolutivos (Casasoli *et al.*,  
273 2006). La variación geográfica tiene efectos importantes sobre la arquitectura genética en  
274 *Pseudotsuga menziesii*, en dos sitios geográficos, se detectaron 33 QTLs que afectan el  
275 tiempo de la brotación pero solo algunos QTLs fueron detectados en ambos sitios. En  
276 *Picea glauca* se encontraron tres solapamientos de QTL que indican regiones con potenciales  
277 efectos pleiotrópicos (Pelgas *et al.*, 2011).

#### 278 **Transcriptomas y expresión de genes relacionados a la fenología**

279 La gran colección de EST de varias especies de árboles de zonas templadas provee a los  
280 investigadores un importante recurso para estudios de genética molecular y la genómica  
281 funcional forestal (tabla 1). La disponibilidad de ESTs en *Q. robur* es grande (103, 000  
282 EST) de los cuales 28, 024 son unigenes ensamblados donde el 18.6% presenta uno o  
283 más motivos de secuencias repetidas simples (SSr) con las cuales se diseñaron pares de  
284 oligonucleótidos para 748 unigenes con los que se obtuvo un mapa de posiciones (bin-  
285 map) que comprende 256 EST-SSr que pueden servir para facilitar la disección de QTLs  
286 que afectan caracteres complejos de importancia ecológica incluyendo la fenología (Durand  
287 *et al.*, 2010). Para *Q. petraea* hay una base de que comprende 145, 827 secuencias  
288 generadas a partir de 20 bibliotecas EST en *Q. petraea* y *Q. robur* de diferentes tejidos  
289 (yemas, hojas, raíces y tejido formador de madera) completamente secuenciadas (Ueno *et*

290 *al.*, 2010) que será útil para el análisis de expresión de genes, descubrimiento de genes de  
291 interés ecológico y mapeo comparativo, de hecho a partir de estas bibliotecas se realizó un  
292 perfil transcripcional de la inducción y liberación de la latencia en *Q. petraea* (Ueno *et al.*  
293 2013), entre los genes diferencialmente expresados se encuentran la proteína temprana  
294 inducible por luz (ELIP) y las proteínas intrínsecas de membrana (PIP), genes de respuesta  
295 a estrés por frío (RCI2B) y proteínas de respuestas a estrés oxidativo como la glutatión S  
296 transferasa la cual tiene diversas funciones de detoxificación y resistencia a estrés oxidativo  
297 (Ueno *et al.*, 2013).

298 Estudios recientes han utilizado aproximaciones globales para analizar los mecanismos  
299 moleculares de la latencia. Perfiles de expresión involucrados en la latencia inducida por el  
300 frío y el fotoperiodo así como su efecto en la apertura de las yemas durante primavera han  
301 sido analizados en *Populus tremula* (Schrader *et al.*, 2004), *P. tremula x P. alba* (Ruttink *et*  
302 *al.*, 2007, Rhode *et al.*, 2007), *P. deltoides* (Park *et al.*, 2008), *Picea abies* (Yakovlev *et al.*,  
303 2006), *Quercus petraea* (Derory *et al.*, 2006), frambuesa (Mazzitelli *et al.*, 2007), *Prunus*  
304 *persica* (Basset *et al.*, 2006, Leida *et al.*, 2010) y albaricoque japoneses (Yamane *et al.*,  
305 2008). Los porcentajes de distribución de los ESTs encontrados en bibliotecas de yemas y  
306 tejidos en estado latentes y no latentes de las especies anteriormente mencionadas se  
307 clasificaron de acuerdo al Centro de Información para Secuencias de Proteínas de Múnich  
308 ([http://mips.helmholtz-muenchen](http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/search_main_frame.html)  
309 *al.* 2002), para sintetizar esta información se presentan los datos como promedios de los  
310 porcentajes encontrados en esos estudios (Fig. 1). Entre los procesos biológicos con mayor  
311 proporción de ESTs en yemas latentes se encuentran genes sin clasificación clara (13.1%) o  
312 proteínas sin clasificar (12.4%), dentro de los genes que tienen función asignada

313 encontramos que participan activamente en tejidos latentes genes de rescate celular, defensa  
314 y virulencia (12.7%), transcripción (11.7%), metabolismo (7%) y transporte celular (6.7%)  
315 (Fig. 1). En promedio las funciones biológicas asignadas a los ESTs de tejidos no latentes  
316 son también en alta proporción las proteínas con clasificación no clara ( 17.7%) y proteínas  
317 sin clasificar (9.3%), le siguen en porcentaje aquellos genes relacionados con la energía  
318 (12.97%) y metabolismo (9.28%) son importantes también los genes relacionados a la  
319 síntesis de proteínas (7.25%), proteínas de unión (6.45%) , ciclo celular (6.35%) y aunque  
320 muestran una clara represión en yemas no latentes siguen participando los genes  
321 relacionados con el rescate celular (5.61%) y los factores de transcripción (5.15%), el resto  
322 de los genes tanto en tejidos latentes y no latentes se encuentra representados entre 0.1-  
323 4.0% (Fig. 1). La expresión de genes en los anteriores estudios fue validada mediante la  
324 cuantificación de varios genes candidatos por medio de PCR en tiempo real (Tabla 2).

325 En *Populus tremula* se estudiaron los patrones de cambio de la expresión de genes en  
326 meristemas en transición. De la fase activa de crecimiento a la latencia involucra una  
327 modulación de varios procesos celulares. Los cambios incluyen represión de numerosos  
328 procesos celulares con la inducción de genes específicos de la latencia y una reducción  
329 general en la complejidad del transcriptoma completo en el cambium latente. Las  
330 alteraciones metabólicas de meristemas latentes son el reflejo en la inducción de genes  
331 involucrados en la degradación del almidón y en el ciclo glioxisomal. Interesantemente la  
332 inducción de tipo-*RGAI* sugiere la modificación de de la vía de señalización de giberelinas  
333 durante la latencia cambial. La inducción de genes como *FIE* y *HAP2* indican una potencial  
334 función para los reguladores transcripcionales en la orquestación de cambios extensivos en  
335 la expresión de genes durante la latencia (Schrader *et al.*, 2004).

336 Para *Quercus petraea* se monitorearon los patrones de expresión en seis estados de  
337 desarrollo de las yemas (Derory *et al.*, 2006). Los macroarreglos revelan 236 transcritos  
338 con expresión diferencial durante el proceso, las principales funciones asignadas para esos  
339 genes son: rescate celular/defensa, metabolismo, síntesis de proteína, ciclo celular y  
340 factores de transcripción, el homólogo del factor de transcripción DAG2 (proteínas dedos  
341 de zinc que afecta la germinación 2) estos genes muestra expresiones contrastantes entre  
342 yemas latentes y no latentes. El transcriptoma en *Castanea sativa* revela que las yemas  
343 latentes están caracterizadas preponderantemente por genes asociados a las respuestas de  
344 estrés, mientras que las yemas no latentes están caracterizadas por genes asociados con la  
345 energía, síntesis de proteínas y componentes celulares para el desarrollo y el crecimiento.  
346 Particularmente se encontró que los genes que codifican para la histona mono-ubiquitinasa  
347 *HUB2* y histona acetiltransferasa *GCN5L* estuvieron asociados con la latencia mientras que  
348 el gene que codifica para la histona *H3* cinasa *AUR3* estuvo asociado con el crecimiento  
349 (Santamaría *et al.*, 2011). A nivel de regulación epigenética en *Castanea sativa* se ha  
350 encontrado que los niveles de metilación incrementan durante la formación de yemas y  
351 disminuye cuando sucede la apertura, mientras que los niveles de la histona H4 acetilada  
352 (*AcH4*) incrementan durante la apertura. El patrón global de metilación y acetilación  
353 muestran patrones contrarios y coinciden con cambios en la latencia de yemas (Santamaría  
354 *et al.*, 2009).

355 A partir de dos librerías de substracción en *Picea abies* (abeto rojo) una de genes  
356 expresados en plantas con brotación temprana de hojas (EFL por sus siglas en ingles) y otra  
357 tardía (LFL) se estudio la expresión de genes implicados en los tiempos de la brotación de  
358 yemas. En las plantas EFL los ESTs que se encontraron codifican proteínas del aparato

359 fotosintético, metabolismo energético y proteínas relacionadas al estrés, en contraparte, los  
360 ESTs de las plantas LFL codifican proteínas tipo-metalotioneina, histonas y factores de  
361 transcripción. Los resultados fueron validados mediante RT-PCR cuantitativa para 25 genes  
362 y se observó que los altos niveles de actividad de estos genes se mantuvieron aun cuando las  
363 plantas estuvieran en la fase ecolatente. Los resultados indican que la brotación de yemas  
364 tardías no es resultado de un retardo en la actividad de los genes sino más bien está  
365 asociada con procesos transcripcionales activos (Yakovlev *et al.*, 2006).

366 En muchos árboles la percepción de días cortos (SD) puede disparar el cese del  
367 crecimiento, la entrada de la latencia y el establecimiento de los requerimientos de  
368 enfriamiento para la apertura de la yema. Mediante la utilización de plantas mutantes (evg)  
369 de durazno (*Prunus pérsica*) que se caracterizan por crecer siempre y no entrar en la fase  
370 de latencia se filtró la expresión de genes comparando plantas mutantes con silvestres  
371 después de la exposición a días cortos. Se identificaron 23 genes sobre regulados en el  
372 tipo silvestre con respecto a las mutantes. De todos los genes estudiados más del 25 por  
373 ciento tienen una función putativa no asignada. Una similar proporción de genes no  
374 clasificados a sido reportada en otros estudios de latencia en plantas leñosas indicando que  
375 la representación de genes expresados en las bases existentes es baja (Mathiason *et al.*,  
376 2009). El fenotipo no latente (evg) corresponde con la delección en el grupo LG1 del mapa  
377 genético. Un grupo de genes DAM que pertenecen a la subfamilia –SVP (acrónimo en  
378 inglés de Short Vegetative Phase) de genes de la caja MAD (*MAD-Box*) se encuentran  
379 localizados en esta región de (Jiménez *et al.*, 2010). Se encontró además que *DAM3*, *DAM5*  
380 y *DAM6* se suprimen por exposición al frío en el campo y condiciones controladas. Los  
381 niveles de expresión de *DAM5* y *DAM6* se suprimen por las temperaturas de enfriamiento y

382 están inversamente correlacionadas con la tasa de apertura de la yema (Jiménez *et al.*,  
383 2010). En esta misma especie se construyó una biblioteca por supresión-sustracción (SSH)  
384 entre yemas latentes y no latentes para identificar los genes expresados diferencialmente  
385 (Leida *et al.*, 2010). Se encontraron 3 genes (*PpB16*, *PpB17* y *PpB26*) que son parte de  
386 seis genes similares localizados en tándem en el grupo de ligamiento 1 (*DAM5*, *DAM6* y  
387 *DAM4* respectivamente) el hallazgo de esos genes confirma su participación en el  
388 detenimiento del crecimiento y la latencia.

389 En plantas con altos requerimientos de frío como la grosella negra (*Ribes nigrum*) las  
390 temperaturas suaves durante el invierno tienen efectos perjudiciales para su producción,  
391 debido a esto ha crecido el interés en Europa sobre el control genético de la latencia.  
392 Usando tejido de yemas foliares se generó una librería de cDNA como una fuente de ESTs  
393 para la construcción de un microarreglo con el que se examinaron los patrones de  
394 expresión de genes a lo largo de la apertura de la yema. La actividad de los genes fue más  
395 baja en los estadios iniciales de la latencia e incremento al máximo con el tiempo la  
396 apertura. Tres genes que corresponden a la proteína de unión a calmodulina,  $\beta$ -tubulina  
397 y, CoA carboxilasa se colocaron con un QTL para la apertura de la yema (Hedley *et al.*,  
398 2010). Algunos genes de los que se encuentran sobre expresados son los factores de  
399 transcripción (TF), de los cuales varios son miembros de la familia de las proteínas dedos  
400 de zinc (*B-box*, *CCCH*, *CH2H* y *CH3C4*/ tipo anillo que se conocen tienen importantes  
401 funciones en las vías de transducción de señales en las plantas (Ciftci-Yilmaz y Mittler,  
402 2008). Otra clase de factores de transcripción que muestra una gradual sub-regulación en la  
403 grosella son los genes *SVP* que pertenecen a los factores de transcripción *MADS-box* y son

404 importantes en la señalización de la transición de la latencia en varias especies (Yamane *et*  
405 *al.*, 2008; Mazzitelli *et al.*, 2007).

406 En la frambuesa (*Rubus idaeus*) la apertura de las yemas es pobre y desigual y muchas  
407 yemas subapicales permanecen en estado de latencia. A partir de un microarreglo se  
408 determinaron cuatro patrones de expresión y se determinaron nuevos genes candidatos  
409 claves relacionados a la apertura de la yema. Un alto porcentaje de genes expresados se  
410 refieren a aquellos relacionados a las respuestas al estrés, defensa y detoxificación,  
411 siguieron en orden los genes implicados en el metabolismo, factores de transcripción y  
412 energía (Mazzitelli *et al.*, 2007).

413 En *Quercus robur* se estudió el transcriptoma de diferentes estados de desarrollo foliar en  
414 relación a la sequía y se encontró que la mayoría de genes expresados son de función  
415 desconocida y una activación de genes de respuestas de defensas las cuales son más fuertes  
416 durante el segundo año de sequía persistente. Los genes de función conocida  
417 diferencialmente expresados tiene funciones protectoras, son factores transcripcionales o  
418 genes relacionados a algún transportador así como genes asociados a la senescencia y  
419 varias amilasa (Spieß *et al.*, 2012).

#### 420 **Relojes circadianos**

421 Otro componente de las mecanismo moleculares de la fenología son los relojes circadianos,  
422 estos permiten a las plantas adaptarse a cambios ambientales periódicos de luz y  
423 temperatura incrementando el crecimiento, sobrevivencia y ventaja competitiva (Green *et*  
424 *al.*, 2002; Dodd *et al.*, 2005). Aunque los componentes de los relojes no parecen estar  
425 conservados entre los reinos, los mecanismos en diferentes organismos son marcadamente



426 similares (Dunlap, 1999; Hamer *et al.*, 2001; Bell-Pedersen *et al.*, 2005). En *Castanea*  
427 *sativa* se utilizaron los genes marcadores análogos al oscilador central de *Arabidopsis*  
428 *CsTOC1* y *CsLHY*. Los niveles de mRNA son ciclados diariamente en plántulas y adultos  
429 pero durante la latencia esos genes se encuentran constitutivamente expresados (Ramos *et*  
430 *al.*, 2005). Esta alteración también afecta *CsPRR5*, *CsPRR7* y *CSPRR9* que son  
431 componentes del sistema de retroalimentación del oscilador (Ibáñez *et al.*, 2008).

432 Los componentes del reloj circadiano en el híbrido *Populus tremula* x *Populus tremuloides*  
433 (Ptt) son el gen del HIPOCOTILO ELONGADO TARDIO (*PttLHY1*, *PttLHY1*) y el tiempo  
434 de expresión de *CAB*, estos genes participan también en la tolerancia al congelamiento y  
435 son candidatos para el vigor al frío. La subregulación de *PttLHY1* y *PttLHY1* causa un  
436 retardo en el inicio de la brotación de yemas. En adición a la función del proceso  
437 controlado por la longitud del día, *PttLHY* juegan una función en los procesos de latencia  
438 dependientes de la temperatura en *Populus* como el vigor al frío y la apertura de las yemas  
439 (Ibáñez, 2010).

440

#### 441 **Regulación de genes asociados a la fenología.**

#### 442 **Genes de respuesta a ácido abscísico (ABA) y fotoperiodo.**

443 A partir de la disección de QTLs en *Populus* se detectó que los genes *PHYB1*, *PHYB2*  
444 están involucrados en la percepción del fotoperiodo, mientras que *ABI1B*, *ABI1D* y *ABI3*  
445 en la transducción de señales de respuesta a ácido abscísico (ABA) jugando un papel  
446 importante en la latencia (Frewen *et al.*, 2000). El ABA es una hormona inducible por  
447 estrés hídrico que junto con el etileno juega un papel en la senescencia (Fredorof, 2002).

448 Los casos donde los fitocromos actúan sinérgicamente con el ABA son bien conocidos  
449 (Finlayson *et al.*, 1998; Wetherwax *et al.*, 1998). En relación al ABA se conoce que hay  
450 una compleja interacción de mecanismos señalizadores, por ejemplo en el híbrido *Populus*  
451 *tremula x P. alba* tres genes regulatorios *AP2/EREB*, *ERF4* y *WRKY11* están asociados con  
452 pasos cruciales en la inducción de la latencia. Los tres genes regulatorios podría actuar río  
453 abajo de la señales de etileno y/o ABA durante la inducción de la latencia (Rhode *et al.*,  
454 2007). La transducción de señales de etileno y ABA son secuencialmente activadas durante  
455 el desarrollo de las yemas (Ruttink *et al.*, 2007). Un incremento en las concentraciones de  
456 ABA ha sido demostrada en yemas apicales de álamo durante la inducción de la latencia  
457 (Rhode *et al.*, 2002). La sobreexpresión de gen *INSENSIBLE AL ÁCIDO ABSCÍSICO*  
458 (*ABI3*) previene la formación de yemas apicales cerradas bajo la inducción de días cortos,  
459 indicando que ABA puede contribuir a la transición de yemas cerradas (Ruttink *et al.*,  
460 2007; Rhode *et al.*, 200). El ABA también ha sido implicado en el cese del crecimiento y  
461 vigor al frío (Welling *et al.*, 2002). Genes inducidos por frío severo como la *proteína rara*  
462 *inducida por el frío2B*, *RCI2B* pertenecen a una pequeña familia multigénica regulada por  
463 bajas temperaturas y ABA y han sido aisladas en *Quercus* (Ueno *et al.*, 2103) sugiriendo  
464 que estos genes están involucrados en el mantenimiento de la integridad de la membrana  
465 por las bajas temperaturas. También se encontró el gen *ERD14* de la familia de las  
466 dehidrinas, las cuales protegen contra el estrés son sintetizadas por bajas temperaturas y  
467 ABA (Ueno *et al.*, 2013). Las acuaporinas son proteínas integrales de membrana que  
468 facilitan el transporte de agua a través de las membranas también son reguladas por ABA  
469 (Jang *et al.*, 2004).

470

## 471 **Dehidrinas y genes LEA**

472 Muchos de los genes encontrados en yemas latentes son predominantemente genes  
473 asociados al estrés, diferentes proteínas se acumulan durante la pérdida de agua para  
474 proteger y estabilizar las estructuras celulares durante la deshidratación. Esa incluyen las  
475 proteínas LEA (Late embryogenesis abundant), proteínas de shock térmico y las proteínas  
476 em (miembros de LEA). Las proteínas LEA son inducidas por deshidratación en  
477 condiciones de sequía, baja temperatura, salinidad y maduración de la semilla (Chung y  
478 Parish, 2008). La expresión de *LEA* fue alta en el estado latente en *C. sativa* (Santamaría *et*  
479 *al.*, 2011) en encino (Derory *et al.*, 2006) y en álamo (Schrader *et al.*, 2004, Ruttink *et al.*,  
480 2007). *LEA* tiene una fuerte expresión a partir de dos años de régimen de sequia en *Q.*  
481 *robur* (Spieß *et al.*, 2012).

482

## 483 **Factores de transcripción**

484 Otro grupo importante de genes expresados en yemas latentes y no latentes son los factores  
485 de transcripción. El factor de transcripción *DRBA1A* contiene un motivo *AP2/ERB* que  
486 tiene un función de unión al promotor que contiene el *CRT/DRE* (elementos de respuesta a  
487 la deshidratación) que existe en muchos genes *LEA*. La sobreexpresión de *DREB1A* se  
488 induce en condiciones normales, la sobreexpresión de aquellos genes relacionados al estrés  
489 por frío confiere tolerancia al estrés hídrico y al estrés por baja temperatura. La  
490 sobreexpresión de *DREB1A* durante la ecolatencia puede ser interpretado a la luz de la  
491 sobreexpresión de *LEA* en *Q. petraea* (Ueno *et al.*, 2013). *AP2/ERB* también está asociado  
492 a la inducción de la latencia en el álamo híbrido (Rohde *et al.*, 2007). Ciertas proteínas de

493 shock térmico son inducidas en respuesta a bajas temperaturas y están involucradas en la  
494 aclimatación al frío (Ramos *et al.*, 2005). En *C. sativa* se encontraron factores de  
495 transcripción *HPSTF* que controlan la expresión de proteínas de shock térmico. La  
496 expresión de *HPSTF* soporta la función para iniciar la apertura de las yemas. (Santamaría *et*  
497 *al.* 2011). La expresión de histonas *H3* y *H4* así como los factores de transcripción *DAG2*  
498 inducen el inicio de la apertura de las yemas en *Q. petraea* (Derory *et al.*, 2006). Las  
499 histonas *H3* y *H4* reflejan el incremento de división celular mientras que *DAG2* (Proteína  
500 dedos de Zinc que afecta la germinación 2) actúa como un factor de transcripción  
501 específicamente involucrado en el control maternal de la germinación (Gualberti *et al.*,  
502 2002) y también se ha encontrado su participación en respuestas a estrés (Cooper, 2003),  
503 Las proteínas dedos de Zinc también se han encontrado en frambuesa (Mazzitelli *et al.*,  
504 2007) y en yemas de durazno (Leida *et al.*, 2010).

505 Un grupo importante en la adquisición de la latencia son los genes *DAM* (cajas-MADS  
506 asociadas a la dormancia) lo cuales están regulados coordinadamente con la latencia en  
507 yemas de varias especies de plantas perenes (Horvat *et al.*, 2010; Jiménez *et al.*, 2010; Li  
508 *et al.*, 2010). En el durazno mutante que “siempre crece” (*evg*) los genes *MAD-box* son  
509 probablemente los responsables de continuo crecimiento del fenotipo mutante (Jiménez *et*  
510 *al.*, 2010). También se ha encontrado su expresión en el cerezo negro (Hedley *et al.*, 2010)  
511 La expresión de dos genes que codifican proteínas *DAM* en euforbias (Horvat *et al.*, 2010)  
512 reflejan el status de latencia dentro del meristemo foliar, ambos genes se inducen por  
513 temperaturas frías y son diferencialmente expresados dependiendo de la longitud del día.  
514 Las *cajas-MADS* son claramente componentes importantes de la señalización en la  
515 transición de la latencia en varias especies (Hedley *et al.*, 2010). En la frambuesa durante

516 la liberación de la latencia de yemas florares se encontró un factor de transcripción *tipo-*  
517 *SVP (caja-MADS)* la cual ejerce su función sobre ápices vegetativos de las hojas, sin  
518 embargo *SVP* ejerce su función independientemente de la longitud del día y las bajas  
519 temperaturas ajustándose a un vía autónoma de represores de la floración probablemente  
520 por el gen *CONSTANS* y el *LOCUS T DE FLORACIÓN* (Mazzitelli *et al.*, 2007). En  
521 *Populus* existe un modelo acerca de las señales fisiológicas y hormonales y la manera en  
522 que estas señales regulan la expresión de genes durante la liberación de la latencia y sugiere  
523 que las temperatura frías (5°C) inducen el locus de floración T (FT) y tanto los lípidos  
524 anclados GPI como GH17s inducido por giberelinas (GA3) reabren los conductos  
525 señaladores en brotes embrionarios. Cuando las temperaturas se eleva, los conductos  
526 nuevamente abiertos facilitan el movimiento del FT y CENL1 a sus blancos, donde ellos  
527 dirigen la expansión de yemas, la elongación de los brotes y la morfogénesis (Rhine *et al.*,  
528 2011).

### 529 **Estudios evolutivos de genes funcionales relacionados a la fenología.**

530 *Quercus* es un género atractivo para estudios evolutivos, principalmente para el desarrollo  
531 del concepto de especies, especiación y adaptación; sin embargo muy poco se conoce  
532 acerca de los niveles de polimorfismo de nucleótidos en los genes funcionales nucleares  
533 (Quang *et al.*, 2008). Las respuestas adaptativas de los árboles a los rápidos cambios  
534 climáticos puede depender de los niveles de variación dentro de poblaciones naturales  
535 (Derory *et al.*, 2010). La diversidad nucleotídica de 9 genes candidatos para la apertura de  
536 la yema en *Q. petraea* ha sido evaluada en un gradiente geográfico en Europa (Derory *et*  
537 *al.*, 2010). La diversidad nucleotídica fue grande, la cual también ha sido observada en *Q.*  
538 *crispula* (Quang *et al.*, 2008), pero la diferenciación entre poblaciones no fue mucho mayor

539 que para los marcadores neutros (microsatélites), los polimorfismos de un solo nucleótido  
540 no se desviaron de la expectativa neutral confirmando que los encinos son especies  
541 altamente variables (Kermer y Petit, 1993; Mariette *et al.*, 2002). La variación de un gen  
542 dehidrina fue analizada en *Q. petraea* a lo largo de un gradiente altitudinal, se encontraron  
543 algunas substituciones e indels (inserciones/delecciones) pero solo un bajo nivel de  
544 diferenciación genética (Vorman *et al.*, 2010).

## 545 **Conclusión**

546 El avance de la genética ha permitido mapear QTL relacionadas a la apertura de la yema  
547 principalmente en *Populus* y *Quercus*. Los estudios transcriptómicos revelan la  
548 participación de los genes de rescate celular defensa/virulencia y transcripción en tejidos  
549 latentes y genes relacionados a la energía, metabolismo, síntesis de proteínas y ciclo  
550 celular en tejidos no latentes. Una gran cantidad de genes relacionados a la fenología son  
551 proteínas que no tienen clasificación clara o que se encuentran sin clasificar abriendo una  
552 ventana para el estudio de las funciones de los productos génicos. Los niveles de variación  
553 en genes funcionales relacionados principalmente a la apertura de la yema solo han sido  
554 analizados en gradientes geográficos y altitudinales en *Q. petraea* y los resultados han sido  
555 contradictorios, es necesario evaluar la diversidad de estos genes en otras especies de  
556 encino, en ambientes geográficos y altitudinales más amplios utilizando toda la longitud de  
557 su secuencia para comprender los niveles de variación, diferenciación y la huella de la  
558 selección natural y su probable papel adaptativo ante el cambio climático. Los recursos  
559 genómicos en *Populus*, *Quercus* y *Castanea* pueden ser transferidos con relativa facilidad  
560 a diferentes especies crecidas en otras zonas templadas sentando las bases para el estudio  
561 de la genética adaptativa ante el cambio climático.

562

563 **Agradecimientos.**

564 EHC agradece el soporte financiero a CONACYT partida número 43987, al Posgrado en

565 Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a Ken

566 Oyama.

567

568 **Referencias.**

- 569 Alberto, J. F., Derory, J., Boury, C., Frigerio, J-M., Zimmermann, N. E., Kremer, A. 2010.  
570 Imprints of natural selection along environmental gradients in phenology-related genes of  
571 *Quercus petraea*. *Genetics* 195: 495-512.
- 572 Arora, R., Rowland, L. J., Tanino, K. 2003. Induction and release of bud dormancy in  
573 woody perennials: a science comes of age. *Hortscience* 38: 911-921.
- 574 Barreneche, T., Bodenes, C., Lexer, C., Trontin, J-F., Fluch, S., Streiff, R., Plomion, C.,  
575 Roussel, G., Steinkellner, H., Burg, K., Favre, J-M., Glossl, J, Kremer, A. 1988. A genetic  
576 linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite,  
577 minisatellite, isozyme and 5S rDNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* 97:1090-  
578 1103.
- 579 Bassett, C. L., Wisniewski, M. E., Artlip, T. S, Norelli, J. L., Renaut, J., Farrell, R. E. 2006.  
580 Global analysis of genes regulated by low temperature and photoperiod in peach bark.  
581 *Journal of the American Society for Horticultural Science* 131(4):551-563.
- 582 Bell, G., Gonzalez, A. 2009. Evolutionary rescue can prevent extinction following  
583 environmental change. *Ecology Letters* 12:942–948.
- 584
- 585 Bell-Pedersen, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J., Golden, S. S., Hardin, P. E, Thomas, T.  
586 L. 2005. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms.  
587 *Nature Review Genetics* 6: 544–556.



588 Bell-Pederson, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J., Golden, S. S. Hardin, P. E. 2005.  
589 Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organism. Nature Review  
590 Genetics 6: 544-556.  
591

592 Bertin, R. I. 2008. Plant phenology and distribution in relation to recent climate change.  
593 Journal of Torrey Botanical Society **135**(1): 126-146.

594 Boerjan, W. 2005. Biotechnology and the domestication of forest trees. Current Opinion in  
595 Biotechnology 16: 159-166.

596 Brachi, B., Faure, N., Horton, M., Flahauw, E., Vazquez, A., *et al.* 2010. Linkage and  
597 association mapping of *Arabidopsis thaliana* flowering time in nature. PLoS Genetics.  
598 6:e1000940.

599 Burke, J., Davison, D., Hide, W. 1999. d2\_cluster: a validated method for clustering EST  
600 and full-length cDNA sequences. Genome Research 9 (11): 1135-1155.

601 Cassasoli, M., Derory, J., Morera-Dutrey, C., Brendel, O., Porth, I., Guehl, J-M., Villani,  
602 F., Kremer, A. 2006. Comparision of quantitative trait loci for adaptative traits between  
603 oaks and chestnut based on an expressed sequence tag consensus map. Genetics 172: 533-  
604 546.

605 Chao, W. S., Foley, M. E., Horvath, D. P., Anderson, J. V. 2007. Signals regulating  
606 dormancy in vegetative buds. International Journal of Plant Developmental Biology 1(1):  
607 49-56.

608 Chung, S., Parish, R. W. 2008. Combinatorial interactions of multiple cis-elements  
609 regulating the induction of the *Arabidopsis XERO2* dehydrin gene by abscisic acid and  
610 cold. *Plant Journal* 54:15–29.

611 Ciftci-Yilmaz, S., y Mittler, R. 2008. The zinc finger network of plants. *Cellular and*  
612 *Molecular Life Sciences*. 65:1150-1160.

613 Davi, H., Gillmann, M., Ibanez, T., Cailleret, M., Bontemps, A., Fady, B., Lefèvre, F.  
614 2011. Diversity of leaf unfolding dynamics among tree species: New insights from a study  
615 along an altitudinal gradient. *Agricultural and Forest Meteorology* 151: 1504– 1513.

616 Davis, M.B., Shaw, R.G., Etterson, J.L. 2005. Evolutionary responses to changing climate.  
617 *Ecology* 86: 1704-1714.

618 den Boer, B. G. W., y Murray, J. A. H. 2000. Control of plant growth and development  
619 through manipulation of cell-cycle genes. *Current Opinion in Biotechnology* 11, 138–145.

620 Derory, J., Léger, P., Garcia, V., Schaeffer, J., Hauser, M.T, Salin, F., Luschnig, C.,  
621 Plomion, C., Glossl, J., Kremer, A. 2006. Transcriptome analysis of bud burst in sessile oak  
622 (*Quercus petraea*). *New Phytologist*. 170(4):723-738.

623

624 Derory, J., Scotti-Saintagne, C., Bertocchi, E., Dantec, L. L., Graignic, N., Jauffres, A.,  
625 Cassasoli, M., Chancerel, E., Bodénès, C., Alberto, F., Kremer, A. 2010. Contrasting  
626 relationships between the diversity of candidate genes and variation of bud burst in natural  
627 and segregating populations of European oaks. *Heredity* 104: 438-448.

628

629 Dodd, A.N., Salathia, N., Hall, A., Kével, E., Tóth, R., Nagy, F., Hibberd, J. M., Millar, A.  
630 J., Webb, A. A. R. 2005 Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival,  
631 and competitive advantage. *Science* 309: 630–633.

632 Dunlap, J. C. 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96: 271–290.

633 Durand, J., Bodénès, C., Chancerel, E., Frigerio, J-M., Vendramin, G., Sebastiani, F.,  
634 Buonamici, A., Gailing, O., Koelewijn, H-P., Villani, F., Mattioni, C., Cherubini, M.,  
635 Goicoechea, P. G., Herrán, A., Ikarán, Z., Cabané, C., Ueno, S., Alberto, F., Dumoulin P-  
636 Y., Guichoux, E., de Duravar, A., Kremer, A., Plomion, Ch. 2010. A fast and cost-effective  
637 approach to develop and map EST-SSR markers: oak as a case study. *BMC Genomics*  
638 11:570. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/570>.

639

640 Eckert, A., Pande, B., Ersoz, E. S., Wright, M. H., Rashbrook, V. K., Nicolet, Ch. M.,  
641 Neale, D. B. 2009. High-throughput genotyping and mapping of single nucleotide  
642 polymorphism in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Tree Genetics and Genomes* 5: 225-234.

643 Fedoroff, N. V. 2002. Cross-talk in abscisic acid signaling. *Sciences Signal Traduction*  
644 Knowledge Enviroment. (<http://stke.sciencemag.org/>).

645 Finlayson, S. A., Lee, I-J., Morgan, P. 1998. Phytochrome b and the regulation of circadian  
646 ethylene production in sorghum. *Plant Physiology* 116, 17–25.

647 Frewen, B. E., Chen, T. H. H., Howe, G. T., Davis, J., Rohde, A., Boerjan, W., Bradshaw,  
648 H. D. Jr. 2000. Quantitative trait loci and candidate gene mapping of bud set and bud flush  
649 in *Populus*. *Genetics* 154: 837-845.

650 Gailing, O., Kremer, A., Steiner, W., Hattmer, H. H., Finkeldey, R. 2005. Results on  
651 quantitative trait loci for flushing date in oaks can be transferred to different segregating  
652 progenies. *Plant Biology* 7: 516-525.

653 Gailing, O., Vorman, B., Leinemann, L., Finkeldey, R. 2009. Genetic and genomic  
654 approaches to assess adaptive genetic variation in plants: forest trees as a model.  
655 *Physiologia Plantarum* 137: 509-519.

656 González-Martínez, S. C., Krutovsky, K. V., Neale, D. B. 2006. Forest-tree population  
657 genomics and adaptive evolution. *New Phytologist* 170: 227-238.

658 Grattapaglia, D., Sederoff, R. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and  
659 *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers.  
660 *Genetics* 137: 1121-1137.

661 Green, R. M., Tingay, S., Wang, Z., Tobin, E. M. 2002. Circadian rhythms confer higher  
662 level of fitness to *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* 129: 576-584.

663 Gualberti, G., Papi, M., Bellucci, L., Ricci, I., Bouchez, D., Camilleri, C., Constantino, P.,  
664 Vittorioso, P., 2002. Mutation in the Dof zinc finger genes DAG2 and DAG1 influence  
665 with opposite effects the germination of *Arabidopsis* seeds. *The Plant Cell* 14: 1253-1263.

666 Hänninen, H., Häkkinen, R., Hari, P., Koski, V. 1990. Timing of growth cessation in  
667 relation to climatic adaptation of northern woody plants. *Tree Physiology* 6: 29-39.

668 Harmer, S. L., Panda, S., Kay, A. 2001. Molecular bases of circadian rhythms. *Annual*  
669 *Review of Developmental Biology* 17: 215-253.

670 Harmer, S.L., Panda, S., Kay, S. A. 2001. Molecular bases of circadian rhythms. Annual  
671 Review of Cell and Developmental Biology 17: 215–253.

672 Healy, T. M., Tymchuk, W. E., Osborne, E. J., Schulte, P. M. 2010. Heat shock response of  
673 killifish (*Fundulus heteroclitus*): candidate gene and heterologous microarray approaches.  
674 Physiological Genomics 41:171–184.

675

676 Hedley, P. E., Russell, J. R., Jorgensen, L., Gordon, S., Morris, J. A., Hackett, C. A.,  
677 Cardle, L., Brenna, R. 2010. Candidate genes associated with bud dormancy release in  
678 blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). 2010. BMC Plant Biology 10:202.  
679 <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/10/202>.

680

681 Horvath, D. P., Anderon, J. V., Chao W. S., Foley, M. E. 2003. Knowing when to grow:  
682 signals regulating bud dormancy. Trends in Plant Science 8: 534-540.

683 Horvath, D. P., Sung, S., Kim, D., Chao, W., Anderson, J. 2010. Characterization,  
684 expression and function of DORMANCY ASSOCIATED MAD-BOX genes from leafy  
685 spurge. Plant Molecular Biology 73: 169-179.

686 Howe, G. T., Aitken, S. N., Neale, D. B., Jermstad, K. D., Wheeler, N. C., Chen, T. H. H.  
687 2003. From genotype to phenotype: unraveling the complexities of cold adaptation in forest  
688 trees. Canadian Journal of Botany 81: 1247-1266.

689 Howe, G. T., Saruul, P., Davis, J., Chen, T. H. H. 2000. Quantitative genetics of bud  
690 phenology, frost damage, and Winter survival in an F2 family of hybrid poplars.  
691 Theoretical and Applied Genetics 101: 632-642.

692 Hughes, L. 2000 Biological consequences of global warming: is the signal already  
693 apparent? Trends in Ecology and Evolution 15, 56–61. (doi:10.1016/S0169-  
694 5347(99)01764-4).

695 Ibañes, C., Ramos, A., Acebo, P., Contreras, A., Casado, R., Allona, I., Aragoncillo, C.  
696 2008. Overall alteration of circadian clock gene expression in the chestnut cold response.  
697 Plos One 3 (10): e3567.

698 Ibáñez, C., Kozerewa, I., Johansson, M., Ögren, Rohde, A., Eriksson, M. E. 2010.  
699 Circadian clock components regulate entry and affect exit of seasonal dormancy as well as  
700 winter hardiness in *Populus* trees. Plant Physiology 153: 1823-1833.

701 Jang, J. Y., Kim, D. G., Kim, Y. O., Kim, J. S, Kang, H. 2004. An expression analysis of a  
702 gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in  
703 *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology 54:713–725.

704 Jensen, J. S. 1993. Variation of growth in Danish provenance trials with oak (*Quercus*  
705 *robur* L. and *Quercus petraea* Mattuschka Liebl). Annales des Sciences Forestieres 50:  
706 203-207.

707 Jiménez, S., Li, Z., Reighard, G. L., Bielenberg, D, G. 2010. Identification of genes  
708 associated with growth and bud dormancy entrance using a dormancy-incapable mutant.  
709 BMC Plant Biology 10:25. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/10/25>.

710 Kremer, A. 2007. In Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants (ed. Kole, C.)  
711 Springer. Pp 161-187.

712 Kremer, A., Petit, R. J. 1993. Gene diversity in natural populations of oak species. *Annals*  
713 *of Forest Sciences* 50: 186s-203s.

714 Lang, G. A., Early, J. D., Martin, G. C., Darnell, R. L. 1987. Endo-, para-, and eco-  
715 dormancy: physiological terminology and classification for dormancy research.  
716 *HortScience* 22:371-377.

717 Lee, S. F., Chen, Y., Varan, A. K., Wee, C. W., Rako, L., *et al.* 2011. Molecular basis of  
718 adaptive shift in body size in *Drosophila melanogaster*: functional and sequence analyses  
719 of the *Dca* gene. *Molecular Biology Evoution*. 28:2393–2402.

720

721 Leida, C., Terol, J., Martí, G., Agustí, M., LLácer, G., Badenes, M. L., Ríos, G. 2010.  
722 Identification of genes associated with bud dormancy release in *Prunus pérsica* by  
723 suppression subtractive hybridization. *Tree Physiology* 30: 655-666.

724

725 Li, P., Adams, W. T. 1993. Genetic control of bud phenology in pole-size trees and  
726 seedlings of coastal Douglas-fir. *Canadian Journal of Forest Research* 23: 1043-1051.

727 Mariette, S., Cottrel, J., Csaiks, U. M., Goikoechea, P., Koning, A., Lowe, A. J. 2002.  
728 Comparision of levels of genetic diversity detected with AFLP and microsatellite markers  
729 within and mixed *Q-petraea* (Matt.) Liebl. And *Q-robur* L. stands. *Silvae Genetica* 51: 72-  
730 79.

731 Mathiason, K., He, D., Grimplet, J., Venkateswari, J., Galbraith, D., Or, E., Fennell, A.  
732 2009. Transcript profiling in *Vitis riparia* during chilling requirement fulfillment reveals

733 coordination of gene expression patterns with optimized bud break. *Functional &*  
734 *Integrative Genomics* 9(1):81-96.

735 Mazzitelli, L., Hancock, R. D., Haupt, S., Walker, P. G., Pont, S. D. A., McNicol, J., Cardle  
736 L., Morris, Jenny, Viola, R., Brennan, R., Hedley, P. E., Taylor, M. A. 2007. Co-ordinated  
737 gene expression during phases of dormancy release in raspberry (*Rubus idaeus* L.) buds.  
738 *Journal of Experimental Botany* 58(5): 1035-1045.

739 Morgan, T. J, Mackay, T. F. C. 2006. Quantitative trait loci for thermotolerance phenotypes  
740 in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 96:232–242.

741

742 Myking, T., and Heide, O. M. 1995. Dormancy release and chilling requirement of buds of  
743 latitudinal ecotypes of *Betula pendula*. *Tree Physiology* 15 (11): 697-704.

744 Neale, D. B. Genomics to tree breeding and forest health. 2007. *Current Opinion in*  
745 *Genetics and Development* 17: 539-544.

746 Neale, D. B., Ingvarsson, P. K. 2008. Population, quantitative and comparative genomics of  
747 adaptation in forest trees. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 149-155.

748 Neale, D. B., Kremer, A. 2011. Forest tree genomics: growing resources and applications.  
749 *Nature Reviews* 12: 111-122.

750 Park, S., Keathley, D. E., Han, K. H. 2008. Transcriptional profiles of the annual growth  
751 cycle in *Populus deltoides*. *Tree Physiology* 28(3):321-329.

752



753 Parmesan, C., y Yohe, G. 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts  
754 across natural systems. *Nature* 421, 37–42. (doi:10.1038/nature01286).

755 Pelgas, B., Bousquet, J., Meirmans, P. G., Ritland, K., Isabel, N. 2011. QTL mapping in  
756 white spruce: gene maps and genomics regions underlying adaptative traits across  
757 pedigrees, years and environments. *BMC Genomics* 12:145.  
758 <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/145>

759 Prunier, J., Laroche, J., Beaulieu, J., Bosquet, J. 2011. Scanning the genome for gene SNPs  
760 related to climate adaptation and estimating selection at the molecular level in boreal black  
761 spruce. *Molecular Ecology*. 20:1702–1716.

762 Quang, N. D., Ikeda, S., Harada. 2008. Nucleotide variation in *Quercus crispula* Blume.  
763 *Heredity* 101: 166-174.

764 Ramos, A., Pérez-Solís, E., Ibáñez, C., Casado, R., Collada, C., Gómez, L., Arangoncillo,  
765 C., Allona, I. 2005. Winter disruption of the circadian clock in chestnut. *Proceedings of the*  
766 *National Academy of Sciences* 102 (19): 7037-7042.

767 Rinne, P. H. L., Welling, A., Vahala, J., Ripel, L., Ruonala, R., Kangasjärvi, J., van der  
768 Schoot, C. 2011. Chilling of dormant bud hyperinduces *FLOWERING LOCUS T* and  
769 recruits GA-inducible 1, 4-β-gGlucanases to roeopen signal conduits and release dormanci  
770 in *Populus*. *The Plant Cell* 23: 130-146.

771 Rohde, A., Prinsen, E., Ricke, D. R., Engler, G., Montagu, M. V., Boerjan, W. 2002.  
772 PtABI3 Impinges on the growth and diffeteniacion of embryonic leaves during bud set in  
773 poplar. *The Plant Cell* 14: 1885-1901.

774 Rohde, A., Ruttink, T., Hostyn, V., Sterck, L., Van Driessche, K., Boerjan, W. 2007. Gene  
775 expression during the induction, maintenance, and release of dormancy in apical buds of  
776 poplar. *Journal of Experimental Botany* 58(15- 16):4047-4060.

777 Rohde, A., Storme, V., Jorge, V., Gaudet, M., Vitacolonna, N., Fabbrini, F., Ruttink, T.,  
778 Zaina, G., Marron, N., Dillen, S., Steenackers, M., Sabatti, M., Morgante, M., Boerjan, W.,  
779 Bastien, C. 2011. Bud set in poplar – genetic dissection of a complex trait in natural and  
780 hybrid populatios. *New Phytologist* 189: 106-121.

781

782 Root, T. L., Price, J. T., Halls, K. R., Schneider, S. H., Rosenzweig, C., Pounds, J. A.  
783 2003. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature* 421: 57-60.

784 Ruttink, T., Arend, M., Morreel, K., Storme, V., Rombauts, S., Fromm, J., Bhalerao, R. P,  
785 Boerjan, W., Rohde, A. 2007 A molecular timetable for apical bud formation and dormancy  
786 induction in poplar. *Plant Cell* 19(8):2370-2390.

787 Santamaría, M.E., Hasbún, R., Valera, M.J., Meijón, M., Valledor, L., Rodríguez, J.L.,  
788 Toorop, P. E., Cañal, M.J., Rodríguez, R. 2009. Acetylated H4 histone and genomic DNA  
789 methylation patterns during bud set and bud burst in *Castanea sativa*. *Journal of Plant*  
790 *Physiology* 166: 1360-1369.

791 Santamaría, M. E., Rodríguez, R., Cañal, M. J., Toorop, P. E. 2011. Transcriptome analysis  
792 of chesnut (*Castanea sativa*) tree buds suggest a putative role for epigenetic control of bud  
793 dormancy. *Annals of Botany* 108: 485-498.

794 Savolainen, O., Pyhajarvi, T. 2007. Genomics diversity in forest trees. *Current Opinion in*  
795 *Plant Biology* 10: 162- 167.

796 Schoof, H., Zaccaria, P., Gundlach, H. 2002. MIPS *Arabidopsis thaliana* database  
797 (MAtdB): and integrated biological knowledge resource bases on the first complete plant  
798 genome. Nucleic Acids Research 30: 91-93.  
799

800 Schrader, J., Moyle, R., Bhalerao, R., Hertzberg, M., Lundeberg, J., Nilsson, P., Bhalerao,  
801 R. P. 2004. Cambial meristem dormancy in trees involves extensive remodelling of the  
802 transcriptome. The Plant Journal 40(2):173-187.  
803

804 Scotti-Saintagne, C., Bodénès, C., Barreneche, T., Bertocchi, E., Plomion, C., Kremer, A.  
805 2004. Detection of quantitative trait loci controlling bud burst and height growth in  
806 *Quercus robur* L. Theoretical and Applied Genetics 109: 1648-1659.  
807

808 Spieß, Nadine., Ourfir, M., Matušíková, Stierscheider, M., Kopecky, D., Homolka, A.,  
809 Burg, K., Fluch, S., Huasman, J-F., Wilhem, E. 2012. Environmental and Experimental  
810 Botany 77: 117-126.  
811

812 Tsarouhas, V., Gullber, U., Lagercrantz, U. 2003. Mapping of quantitative trait loci  
813 controlling timing of bud flush in *Salix*. Hereditas 138: 172-178.  
814

815 Turner, T. L., Levine, M. T., Eckert M. L., Begun, D. J. 2008. Genomic analysis of  
816 adaptive differentiation in *Drosophila melanogaster*. Genetics 179:455–473.  
817

818 Tuskan, GA., S. DiFazio, S. Jansson, J. Bohlmann, I. Grigoriev, U. Hellsten, N. Putnam, S.  
819 Ralph, S. Rombauts, A. Salamov, J. Schein, L. Sterck, A. Aerts, R. R. Bhalerao, R. P.

820 Bhalerao, D. Blaudez, W. Boerjan, A. Brun, A. Brunner, V. Busov, M. Campbell, J.  
821 Carlson, M. Chalot, J. Chapman, G.-L. Chen, D. Cooper, P. M. Coutinho, J. Couturier, S.  
822 Covert, Q. Cronk, R. Cunningham, J. Davis, S. Degroeve, A. Déjardin, C. dePamphilis, J.  
823 Detter, B. Dirks, I. Dubchak, S. Duplessis, J. Ehling, B. Ellis, K. Gendler, D. Goodstein,  
824 M. Gribskov, J. Grimwood, A. Groover, L. Gunter, B. Hamberger, B. Heinze, Y.  
825 Helariutta, B. Henrissat, D. Holligan, R. Holt, W. Huang, N. Islam-Faridi, S. Jones, M.  
826 Jones-Rhoades, R. Jorgensen, C. Joshi, J. Kangasjärvi, J. Karlsson, C. Kelleher, R.  
827 Kirkpatrick, M. Kirst, A. Kohler, U. Kalluri, F. Larimer, J. Leebens-Mack, J.-C. Leplé, P.  
828 Locascio, Y. Lou, S. Lucas, F. Martin, B. Montanini, C. Napoli, D. R. Nelson, C. Nelson,  
829 K. Nieminen, O. Nilsson, V. Pereda, G. Peter, R. Philippe, G. Pilate, A. Poliakov, J.  
830 Razumovskaya, P. Richardson, C. Rinaldi, K. Ritland, P. Rouzé, D. Ryaboy, J. Schmutz, J.  
831 Schrader, B. Segerman, H. Shin, A. Siddiqui, F. Sterky, A. Terry, C.-J. Tsai, E.  
832 Uberbacher, P. Unneberg, J. Vahala, K. Wall, S. Wessler, G. Yang, T. Yin, C. Douglas, M.  
833 Marra, G. Sandberg, Y. Van de Peer, and D. Rokhsar. 2006. The Genome of Black  
834 Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). Science 313 (5793), 1596.  
835 Ueno, S., Klopp, Ch., Leplé, J. Ch. Derory, J., Noirot, C., Léger, V., Prince, E., Kremer, A.,  
836 Plomion, Ch., Le Provost, G. 2013. Transcriptional profiling of bud dormancy induction and  
837 release in oak by next-generation sequencing. BMC Genomics 14:236.  
838 <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/236>  
839 Ueno, S., Le Provost, G., Léger, V., Klopp, Ch., Noirot, C., Frigerio, J-M., Salin, F., Salse,  
840 J., Abrouk, M., Murant, F., Brendel, O., Derory, J., Abadie, P., Léger, P., Cabane, C.,  
841 Barré, A., de Daruvar, A., Couloux, A., Wincker, P., Reviron, M-P., Kremer, A., Plomion,

842 Ch. 2010. Bioinformatic analysis of ESTs collected by Sanger and pyrosequencing methods  
843 for a keystone forest tree species: oak. *BMC Genomics* 11:650.

844 Umina, P. A., Weeks, A. R., Kearney, M. R., McKechnie, S. W., Hoffmann, A. A. 2005. A  
845 rapid shift in a classic clinal pattern in *Drosophila* reflecting climate change. *Science*  
846 308:691–693.

847

848 Valledor, L., Hasbún, R., Meijón, M., Rodríguez, J. L., Santamaría, E., Viejo, M., Berdasco,  
849 M., Feito, I., Fraga MF, Cañal, M. J., Rodríguez, R. 2007. Involvement of DNA  
850 methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult*  
851 91(2):75–86.

852 Vorman, B., Gailing, O., Derory, J., Plomion, C., Kremer, A., Finkeldey, R.  
853 2011. Characterisation and natural variation of a dehydrin gene in *Quercus petraea* (Matt.)  
854 Liebl. *Plant Biology* 13: 881-887.

855 Walther, G. R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T. J. C.,  
856 Fromentin, J. M., Hoegh-Guldberg, O. y Bairlein, F. 2002. Ecological responses to recent  
857 climate change. *Nature* 416, 389–395. (doi:10.1038/416389a).

858 Weatherwax, S. C., Williams, S. A., Tingay, S., Tobin, E. M. 1998. The phytochrome  
859 response of the *Lemna gibba* NPR1 gene is mediated primarily through changes in abscisic  
860 acid levels. *Plant Physiology* 116, 1299–1305.

861 Welling, A., Moritz, T., Palva, E.T. and Junttila, O. 2002. Independent activation of cold  
862 acclimation by low temperature and short photoperiod in hybrid aspen. *Plant Physiology*  
863 129,1633–1641.

864 Yakovlev, I. A., Fossdal, C-G., Johnsen, Ø., Junttila, O., Skrøppa. 2006. Analysis of gene  
865 expression during bud burst initiation in Norway spruce via ESTs from subtracted cDNA  
866 libraries. *Tree Genetics and Genomes* 2: 39-52.

867 Yamane, H., Kashiwa, Y., Ooka, T., Tao, R., Yonemori, K. 2008. Suppression subtractive  
868 hybridization and differential screening reveals endodormancy-associated expression of an  
869 SVP/AGL24 -type MADS-box gene in lateral vegetative buds of Japanese apricot. *Journal*  
870 *of the American Society for Horticultural Science* 133(5):708-716.

871

872

873 Tabla 1. Información genómica de los principales géneros de árboles de zonas templadas  
 874 comparadas con la planta modelo *Arabidopsis*. Datos recuperados el 10 de diciembre de  
 875 2013. DNA/RNA = secuencias de nucleótidos, EST = Secuencias expresadas etiquetadas,  
 876 Genomas = Proyectos de secuenciación genómica, Ensamblados = Información genómica  
 877 ensamblada, Unigénes = Grupos de transcritos expresados, Genes = Información de los  
 878 locus colectados, Proteínas = Secuencias de proteínas.

Género	DNA/RNA	EST	Genomas	Ensamblados	Unigenes	Genes	Proteínas
<i>Pinus</i>	300801	730034	15	1	17379	1531	103590
<i>Populus</i>	170280	455250	22	4	81682	45025	370474
<i>Picea</i>	84333	576345	3	2	47922	407	32382
<i>Quercus</i>	71106	150819	2	0	7170	137	9916
<i>Prunus</i>	61782	115204	13	5	7481	244	41049
<i>Salix</i>	9677	776	4	0	0	4	2691
<i>Rubus</i>	3709	3184	3	0	0	25	5894
<i>Castanea</i>	3041	10691	2	0	0	130	1421
<i>Eucalyptus</i>	68391	168309	10	1	0	8541	19304
<b><i>Arabidopsis</i></b>	<b>746023</b>	<b>1922394</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>155886</b>	<b>172365</b>	<b>1231275</b>

879

880

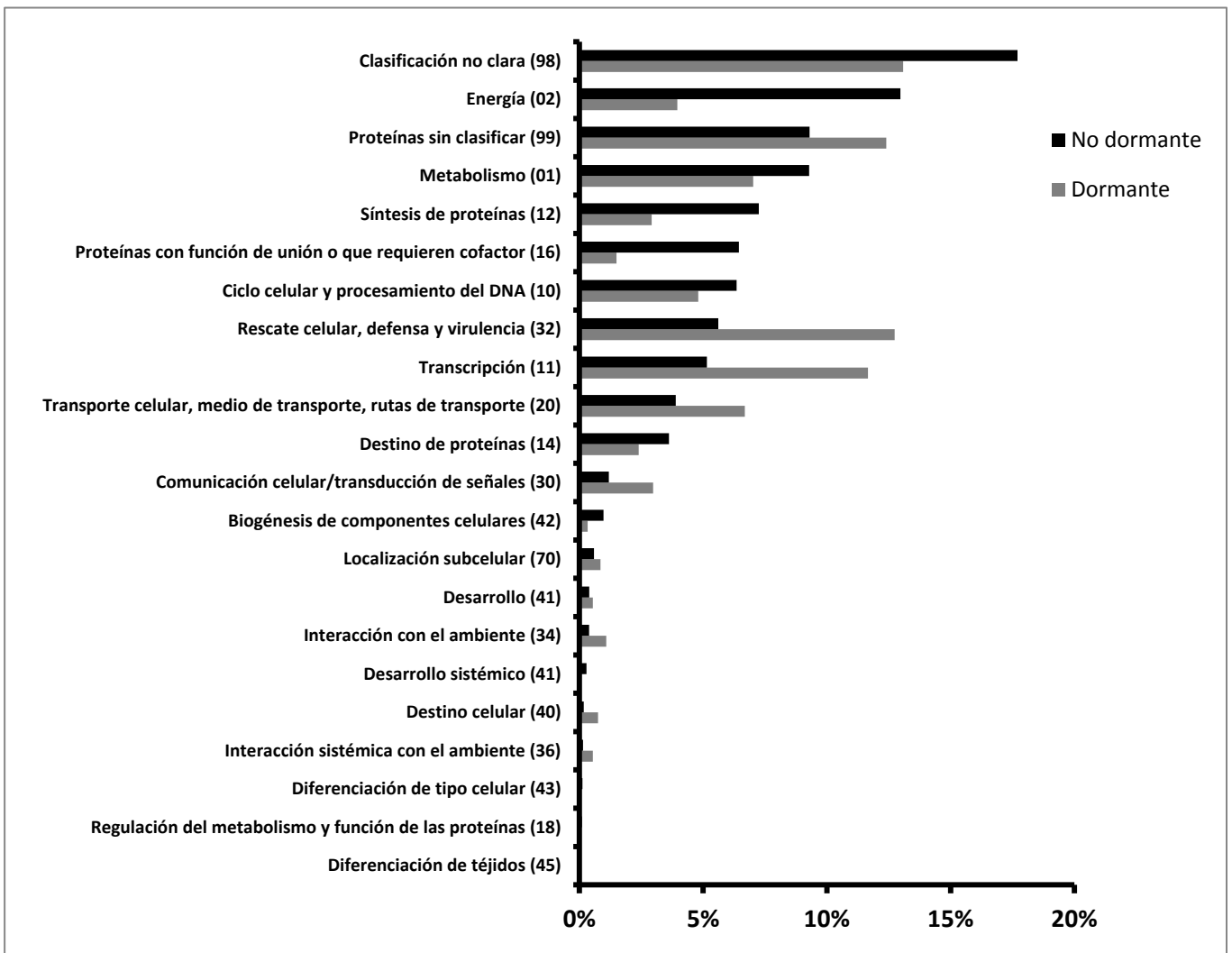
881 Tabla 2. Genes relacionados a la fenología utilizados para validar experimentos de  
 882 expresión por medio de RT-PCR cuantitativo.

Especie	Genes	Participación/método	Referencia
<i>Castanea sativa</i>	<i>HUB2, GCN5L, GOLS, RADSAM, SAMS, HSPTF, HSPTF90, AUR3, Actina</i>	Imposición de latencia, Emergencia de hojas (EST-SSH)	Santamaría <i>et al.</i> 2011
<i>Picea abies</i>	<i>ZFPDOF, Zfc3H4, ZFC2H2, eIF5a, GNAT, HDac, DAM, SET, H3a, H4, NLY, SCF/UIP2, MTi, PAERD, Dhd1, Dhd2, PRKase, SK5, Aqp, Lir1, L13a, U18, U24, U35, U44</i>	Emergencia de hojas (EST-SSH)	Yakovlev <i>et al.</i> 2006
<i>Populus tremula x Populus alba</i>	<i>WRKY, AP2/EREPB, ERF4</i>	Inducción de latencia, liberación de latencia (cDNA-AFLP)	Rhode <i>et al.</i> 2007
<i>Populus tremula x P. tremuloides</i>	<i>GH17, GA3 (ox1, ox2, ox3, ox6, ox8), GA2ox1, DELLA-like, GIP-like</i>	Liberación de la latencia (PCRq dirigida)	Rhine <i>et al.</i> 2011
<i>Prunus persica</i>	<i>DAM3, DAM5, DAM6, EVG16, EVG17</i>	Apertura de yema (PCRq dirigida)	Jiménez <i>et al.</i> 2010
<i>Prunus persica</i>	<i>Amidasa, ABP20, GH18, ATP sulfurilasa, KEG, LIM, MRP6, U1, LEA, Metalotioneina, PR-1, DAM1, DAM6, EET, U2, U3, U4,</i>	Imposición de latencia (EST-SSH)	Jiménez <i>et al.</i> 2010
<i>Prunus persica</i>	<i>DAM1, DAM6, PpB (19, 20, 29, 43, 62, 71, 87, 88)</i>	Liberación latencia (EST-SSH)	Leida <i>et al.</i> 2010
<i>Quercus petraea</i>	<i>18Sr, Efi-α, CS, GST, DRM1, GASA, XERO2, PIP, AWPM19, GID, LEA, ELP, Globulina, XET</i>	Inducción y liberación de latencia (Pirosecuenciación)	Ueno <i>et al.</i> 2013
<i>Quercus petraea</i>	<i>LEA, GS, FPDOF, PCFS, PPSF21, RAS1, G3PDHF, PHAt2g, PT19F6.8, Zhw21,</i>	Emergencia de hojas (EST-SSH)	Derory <i>et al.</i> 2006
<i>Quercus robur</i>	<i>BMY7, GLP3, E8, LTP</i>	Emergencia de hojas relacionado a la sequía (EST-Microarreglos)	Spieß <i>et al.</i> 2011
<i>Ribes nigrum</i>	<i>TUB, ACC, SVP, MAD-box, CAL, XET, PHI</i>	Liberación de latencia (EST-microarreglos)	Hedley <i>et al.</i> 2010

883



884 **Figura 1.** Clasificación funcional de secuencias expresadas marcadas etiquetada (EST) de  
 885 acuerdo al centro de información para secuencias de proteínas de Munich (MIPS). Los  
 886 datos representan los promedio de los porcentajes de EST encontrados en bibliotecas para  
 887 yemas dormantes y no dormantes en *Castanea sativa* (Santamaría *et al.* 2011); *Quercus*  
 888 *petraea* (Derory *et al.* 2005); *Populus tremula x P. alba* (Rohde *et al.* 2007); *P. tremula*  
 889 (*Schrader et al.* 2004); *Prunus pérsica* (Leida *et al.* 2010) y *Picea abies* (Yakovlev *et al.*  
 890 2006).



891 **Material suplementario.**

892 S1. Lista de los nombres de los genes utilizados en experimentos de PCR en tiempo real.

<i>Gene</i>	Nombre	<i>Gene</i>	Nombre
<i>Zhw21</i>	Proteína hipotética dominio de transportador de péptido	<i>GNAT</i>	N acetil transferasa
<i>ZFPDOf</i>	Motivo de unión a DNA dedos de Zinc	<i>GLP3</i>	Proteína tipo germinina 3
<i>ZfC3H4</i>	Dedos de Zinc C3H4	<i>GIP-like</i>	Gen de respuesta a ácido giberélico
<i>ZFC2H2</i>	Dedos de Zinc C2H2	<i>GID</i>	Receptor de giberelina
<i>XET</i>	Xiloglucana endotransglucosilasa	<i>GH17</i>	Glicosil hidroxilasa
<i>XERO2</i>	Dehidrina Xero 2	<i>GASA</i>	Regulada por Giberelinas GASA/CAST
<i>WRKY</i>	Factor de transcripción WRKY 11	<i>GA3 ox3, 2, 1, 8</i>	Biosíntesis de ácido gibérelico ox3, ox2, ox1, ox8
<i>UNK18, Unk24, Unk35, Unk44</i>	Proteínas desconocidas (Unknow) 18, 24, 35, 44	<i>G3PDHF</i>	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
<i>U4, U3,U2, U1</i>	Desconocida 4, 3, 2, 1	<i>EVG17, 16</i>	Locus EVG 17, 16
<i>TUB</i>	$\beta$ -tubulina 2	<i>ERF4</i>	Factor de unión a elemento de respuesta de etileno
<i>SVP</i>	Fase vegetativa corta	<i>ELP</i>	Proteína temprana inducida por luz
<i>SK5</i>	Proteín cinasa 5	<i>eIF5A</i>	Factor de iniciación de la traducción 5A
<i>SET</i>	Domino de Histona metiltransferasa	<i>Efi-<math>\alpha</math></i>	Factor de elongación 1- $\alpha$
<i>SCF/UIP2</i>	Subunidad SKp1 del complejo SCF	<i>E8</i>	Expanina 8
<i>SAMS</i>	S-adenosil metionina sintetasa	<i>DRM1</i>	Proteína asociada a la dormancia 1
<i>RASI</i>	Inhibidor de $\alpha$ -amilasa/subtilisina	<i>DOF</i>	Proteína dedo de Zinc DAG2
<i>RADSAM</i>	S-adenosil metionina sintetasa radical	<i>Dhd1, Dhd2</i>	Dehidrina 1 y 2
<i>PT19F6.8</i>	Proteína hipotética dominio de transportador de péptido	<i>Della-like</i>	Represon de proteínas Della
<i>PSF21</i>	Proteína específica de polen	<i>DAM6</i>	Genes asociados a la dormancia MAD-Box
<i>PRKase</i>	Fosforibulicinasas	<i>DAM6</i>	Genes asociados a la dormancia MAD-Box
<i>PpB88</i>	Sin similitud en las bases de datos	<i>DAM5</i>	Genes asociados a la dormancia MAD-Box
<i>PpB87</i>	Sin similitud en las bases de datos	<i>DAM3</i>	Genes asociados a la dormancia MAD-Box

<i>PpB71</i>	Proteína de unión a DNA	<i>DAM1</i>	Genes asociados a la dormancia MAD-Box
<i>PpB62</i>	Flavonoide 3 hidroxilasa	<i>DAM</i>	Adenosil metil transferasa
<i>PpB43</i>	Sin similitud en las bases de datos	<i>CAL</i>	Proteína de unión a calmodulina
<i>PpB29</i>	Forisoma	<i>BMY7</i>	β-amilasa 7
<i>PpB20</i>	Factor de transcripción de la familia GRAS	<i>AWPM19</i>	Proteína de la membrana tipo AWPM19
<i>PpB19</i>	Proteína dedos de zinc	<i>ATP sulfurilasa</i>	ATP sulfurilasa
<i>PIP</i>	Proteína intrínseca de membrana	<i>At2g14910</i>	Proteína hipotética de Arabidopsis t
<i>PHI</i>	Phi-1	<i>Aqp,</i>	Acuaporina
<i>PCSF</i>	Protein cinasa asociada a la fase s	<i>Amidasa</i>	Amidasa
<i>PaERD</i>	Respuesta inicial a la deshidratación	<i>Actina</i>	Actina
<i>NLY</i>	Proteína tipo floricauda/leafy	<i>ACC</i>	Aceti-CoA carboxilasa
<i>MRP6</i>	Cassete transportador de unión a ATP	<i>ABP20</i>	Proteína de union a auxina 20
<i>Metalotioneina</i>	Metalotioneina	<i>18Sr</i>	Proteína 18s ribosomal
<i>LTP</i>	Proteína transportadora de lípidos	<i>XET</i>	Xiloglucana endotransglucosilasa/hidrolasa 9
<i>Lir1</i>	Proteína regulada por luz	<i>PR-1</i>	Proteína relacionada a la patogénesis 1
<i>LIM</i>	Proteína de unión a zinc	<i>Mtl</i>	Metalotioneina
<i>LI3a</i>	Proteína ribosomal 60s LI3a	<i>HDac</i>	Histona desacetilasa
<i>LEA</i>	Proteína abundante de embriogenesis tardia	<i>Globulina</i>	Globulina 7s 2
<i>KEG</i>	Keep on Go in	<i>GH18</i>	Glicosil hidroxilasa
<i>HUB2</i>	Histona monoubiquitinasa2	<i>GCN5L</i>	Histona acetil transferasa
<i>HSPTF90</i>	Factor de transcripción para la proteína de Shock termico 90	<i>EET</i>	Proteína específica de epicotilo
<i>HSPTF</i>	Factor de transcripción para la proteína de Shock termico 90	<i>DAM6</i>	Genes asociados a la dormancia MAD-Box
<i>H4</i>	Histona 4	<i>DAM1</i>	Genes asociados a la dormancia MAD-Box
<i>H3a</i>	Histona 3a	<i>CS</i>	Cold-Shock (Shock al frío)
<i>GST</i>	Glutation S transferasa	<i>AUR3</i>	Histona serin cinasa H3
<i>GS</i>	Galactinol sintasa	<i>AP2/EREPB</i>	Factor de transcripción AP2/EREPB
<i>GOLS</i>	Galactinol sintasa ortologa		

## VIII. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.

La tesis aborda las respuestas de los árboles a variables ambientales como la temperatura y precipitación desde diferentes niveles de integración de la materia como son la ecología de comunidades (capítulo uno) ecología de poblaciones (capítulo 2) y biología molecular (capítulo 3).

En el capítulo uno se estudian dos aspectos acerca de la diversidad, el primero está relacionado a la diversidad alfa y beta de árboles y el segundo hace referencia a la diversidad funcional, ambos aspectos a lo largo de un gradiente altitudinal. En países megadiversos como México, el inventario de la diversidad biológica esta aun lejos de estar completo y tiene un retraso de siglos respecto a otros países, principalmente los europeos. En relación a la beta diversidad, se estima que en México, el recambio de especies, más que la diversidad alfa es el componente más importante para explicar la extraordinaria biodiversidad en el ámbito nacional (Rodríguez *et al.* 2003).

Con respecto a los patrones altitudinales de  $\alpha$ -diversidad, se encuentra ampliamente documentado que la riqueza de especies en relación a la altitud tiene un pico máximo de riqueza en altitudes intermedias (a manera de joroba), el otro patrón es una disminución monotonía de la riqueza de especies con el incremento de la elevación (Rahbek 1995; Rahbek, 2005). Las explicaciones al primer patrón se basan en que existen condiciones climáticas moderadas a medias elevaciones (alta humedad, temperaturas medias), mayor fragmentación en zonas bajas (Rosenzweig y Ziv 1999), interacción metapoblacional (Stevens 1989), efectos del origen de los taxa (Kessler 2001; Grytnes 2003) y procesos históricos y evolutivos (Ricklefs 2004). En nuestro caso encontramos no

encontramos una relación entre la altitud y la  $\alpha$ -diversidad debido a la dominancia completa de la familia Fagaceae distribuida desde los 1400 m hasta los 2300 m. Aunque se observa dos picos de riqueza uno a 1400 m, sitio en donde convergen elementos del bosque tropical seco y elementos de bosque templado y el otro a 2200-2400 m sitio de bosque mesófilo de montaña. La ausencia de relación de la riqueza con la altitud ha sido observada en otras montañas mexicanas. En relación a la diversidad beta encontramos que casi no hay reemplazo de familias por arriba de 1600 m. La dominancia completa de fagáceas y del género *Quercus* a partir de 1600 m sugiere que hay una estructura filogenética no aleatoria (Vamosi *et al.* 2008; Cavender-Bares *et al.* 2009). Sin embargo si el análisis se efectúa a nivel de especies se encuentra un recambio de especies completa en cada nivel altitudinal.

De cara al cambio climático, se espera que el aumento del CO<sub>2</sub> en la atmósfera sea el primero o el segundo operador de la pérdida de la biodiversidad (Sala *et al.* 2000, Thomas *et al.* 2004). Existe ahora amplia evidencia de que el cambio climático moderno está reorganizando las distribuciones geográficas de plantas y animales (Parmesan y Yohe, 2003) de tal manera que los listados de especies completos y son necesarios para definir aéreas prioritarias de manejo y conservación.

### **Diversidad funcional.**

Todas las especies de plantas utilizan los mismos recursos como son: luz, agua, CO<sub>2</sub> y nutrientes minerales. Sin embargo las diferencias ecológicas entre las plantas vasculares surgen de las diferentes formas de adquirir los mismos recursos más que de un uso alternativo de los productos alimenticios (Westoby *et al.* 2002). Las hojas, tallos, raíces y semillas varían entre las especies en construcción, tiempo de vida y asignación relativa de

recursos. La enorme variación interespecífica en caracteres vegetales ha sido observada en las tasas de crecimiento, fotosíntesis, respiración, tiempo de vida de las hojas, nitrógeno foliar y área específica las cuales varían entre 10 a 100 veces (Grime y Hunt 197; Chapin 1980; Schulze *et al.* 1994; Reich *et al.* 1997). Tales variaciones representan adaptaciones a un rango de condiciones ambientales que ocurren en hábitats divergentes tanto a nivel local como global (Reich *et al.* 1999).

Recientemente se han utilizado métodos basados en caracteres funcionales para entender como múltiples mecanismos influyen el ensamblaje de comunidades a través de gradientes ambientales (Weiher *et al.* 2011) incluyendo gradientes altitudinales (Kluge y Kessler 2011, Hoiss *et al.* 2012, Spasojevic y Suding 2012). Esos estudios a menudo apuntan sobre dos mecanismos de ensamblaje que se piensa influyen los patrones de diversidad a lo largo de gradientes ambientales: la filtración ambiental, la cual puede incrementar la similitud de caracteres de las especies a través de restricciones abióticas (Weiher y Keddy 1995), y las interacciones competitivas que previenen la co-existencia de las especies muy similares (Chesson 2000). La síntesis global de caracteres funcionales en plantas han destacado dos patrones prevalentes. En el primero, los valores medios de los caracteres clave de plantas muestran cambios significativos a través de gradientes climáticos, tanto a escalas globales como locales (Bailly y Sinnott, 1916; Baker 1972; Dolph y Dilcher 1980; Wright *et al.* 2005; Moles *et al.* 2007). En el segundo, estudios en todas las escalas revelan que altos niveles de disparidad son observados dentro de las comunidades. En orden para unir los mecanismos abióticos y bióticos a los patrones de diversidad a través de la elevación, podemos asumir que la variabilidad del carácter refleja

la variación en el uso de recursos dentro de una población y por lo tanto refleja el nicho espacial y la amplitud (Viola *et al.* 2002).

En nuestro estudio nos centramos en analizar como los patrones de caracteres funcionales de tallo (altura máxima de tallo, área basal, cantidad de tallos basales, densidad de la madera, densidad de la corteza) y de hoja (área foliar, contenido de masa seca foliar, masa foliar por unidad de área y valor de Huber) cambian a lo largo de un gradiente altitudinal en el Volcán de Tequila, Jalisco. Cada carácter funcional fue escalado del nivel de especie al nivel de comunidad utilizando la media ponderada de la comunidad (CWM; Lavorel *et al.* 2007) un parámetro que puede ser visto como el valor funcional promedio de la comunidad vegetal. El cálculo de CMW utiliza el área basal, más que la abundancia porque esta refleja la biomasa de las especies, un indicador del desempeño de las plantas a las condiciones ambientales (Lohbeck *et al.* 2013). Por otro lado, los gradientes altitudinales proveen de una oportunidad experimental ideal para estudiar la variación de caracteres funcionales en respuesta al ambiente y las implicaciones de esta variación para la capacidad de las poblaciones para responder a condiciones ambientales cambiantes (Körner 2007).

Encontramos que la altura de los árboles incrementa con la altitud, contrario al gran cuerpo de estudios que mencionan que el área basal y la altura de los árboles disminuye con la altitud (Vázquez & Givnish 1998; Bresson *et al.* 2011; Thomas 2011; Petit *et al.* 2011; De Bello *et al.* 2012) este patrón también es concordante con los reportes en gradientes latitudinales donde incrementos en la disponibilidad hidráulica y temperatura favorecen el incremento en la altura del árbol (Méndez-Alonzo *et al.* 2008; Moles *et al.* 2009).

Con la altitud incrementa la masa foliar por área (LMA) y el contenido de masa seca foliar (LDCM) probablemente debido al incremento del tiempo de vida de la hojas (Bresson *et al.* 2011). Encontramos también patrones de asociación entre los caracteres de hoja y tallo, en altas altitudes están dominadas por especies siempre verdes con alta LMA y LDCM, densidad de la corteza, densidad de la Madera y valor de Huber asociado a la eficiencia fotosintética a bajas temperaturas que se relaciona con la adquisición de carbono y uso eficiente de agua a bajas temperaturas (Huxman *et al.* 2008). Las relaciones entre caracteres funcionales y la altitud indican que diferentes operadores ambientales determinan el ensamblaje de las comunidades a la escala espacial que nosotros estudiamos.

### **Fenología.**

La fenología es el estudio científico de los eventos biológicos cíclicos como la floración, apertura de la yema, despliegue de hojas, formación y dispersión de semillas (Davi *et al.* 2011). Todos esos eventos son importantes caracteres adaptativos para la vegetación ya que determinan los tiempos de duración de la estación de crecimiento y el periodo de reproducción (Chuine *et al.* 2000), también son el principal determinante para la distribución de las especies (Chuine y Beaubien 2001) y está relacionada a la adecuación individual de las plantas (Rathcke y Lacey 1985) además de jugar un papel crucial en el balance de carbono y la productividad de ecosistemas terrestres (Rootzer *et al.* 2004).

El tiempo de los eventos fenológicos en árboles de zonas templadas esta bajo un fuerte control de la temperatura (Hunter y Lechowics 1992; Hänninen 1995) y por lo tanto ha llegado a ser un excelente indicador biológico del cambio climático debido a su sensibilidad y dependencia a las variables climáticas, como la temperatura del ambiente



(Ahas *et al.* 2000) o la disponibilidad de agua (Peñuelas *et al.* 2004). En contraste a los árboles templados, la fenología de los árboles en regiones tropicales, donde hay una alta variación estacional en la precipitación, no se puede pronosticar a partir de datos climáticos (Borcher *et al.* 2005). Esto es debido a que la apertura de la yema y la salida de las hojas están determinadas principalmente por variables no climáticas (Borchert 1994; Rivera *et al.* 2004).

Los encinos mexicanos son un ejemplo de un grupo de árboles de origen templado pero que dominan latitudes tropicales. Un detallado análisis de la variación fenológica en especies particulares no ha sido realizado en ninguna especie de encino Mexicano. Nosotros analizamos la variación fenológica de *Quercus magnoliifolia* y *Quercus resinosa* a lo largo de un gradiente altitudinal con el objetivo de comprender la influencia de la temperatura y la precipitación sobre la fenología de yemas apicales y si esta puede ser un bioindicador útil del calentamiento global en latitudes tropicales.

Encontramos que la apertura de la yema, el despliegue de hojas y la expansión de las mismas en *Q. mangnoliifolia* sucede más tarde a bajas altitudes con altas temperatura mientras que en *Q. resinosa* esos mismos eventos fenológicos sucede más tarde a altas altitudes con menor temperatura. Para *Quercus* se encuentra documentado que la fenología foliar tiene una fuerte sensibilidad a la temperatura y que el avance de la apertura de la yema y el despliegue de hoja están en relación al incremento de la misma (Vitasse *et al.* 2009a, b; Wesolowski y Rowiński 2006). El patrón encontrado en *Q. magnoliifolia* es el primer reporte de el avance de la fenología con el incremento de la altitud y la disminución de la temperatura en el género. En otros gradientes, se ha encontrado también que las especies pueden exhibir clinas opuestas, por ejemplo las poblaciones de *Fagus* despliegan

sus hojas más rápidamente a altas altitudes que aquellas poblaciones de baja elevación mientras que la tendencia opuesta ha sido observada en *Fraxinus* y *Quercus* (Vitasse *et al.* 2009). Por otro lado, no encontramos ninguna relación entre los estadios fenológicos estudiados (apertura de la yema, despliegue de la hoja y extensión de la hoja) con la precipitación y los potenciales hídricos del suelo en ninguna de las dos especies. Los resultados muestran clinas contrastantes y sugieren que otras variables además de la temperatura pueden dirigir la fenología de árboles de zonas templadas en latitudes tropicales.

Las diferencias en la fenología foliar entre las poblaciones de altitudes bajas y altas en *Q. magnoliifolia* podrían indicar su plasticidad fenotípica o su adaptación local. Si las respuestas son plásticas, *Q. magnoliifolia* podría adaptarse con relativa facilidad a el aumento de temperaturas pronosticado por el cambio climático, en cambio, si las diferencias fenológicas fueran una adaptación local, el riesgo de la declinación de las poblaciones con emergencia temprana de las hojas sería alto, porque, de acuerdo a los cambios pronosticado, estos sitios experimentarían una mayor temperatura y probablemente una menor disponibilidad de agua en el suelo ocasionando, que el evento fenológico foliar ocurriera fuera de la ventana de las condiciones óptimas para la especie afectando su adaptabilidad. En *Q. resinosa*, con una alta relación con la temperatura su adaptabilidad podría afectarse debido a que al aumentar la temperatura por efecto del cambio climático y considerando un escenario de respuestas fenológicas plásticas, el desarrollo de las hojas sucedería a una tasa más rápida, incrementando el riesgo por un lado de que los eventos fenológicos sucedan cuanto todavía pueden ocurrir heladas o bien, si la tasa de desarrollo foliar aumenta las poblaciones de árboles podría tener hojas

completamente expandidas y con capacidad fotosintética en momentos más calientes y secos las plantas no podría efectuar su actividad metabólica con consecuencias sobre la pérdida rápida de agua por evapotranspiración y ocasionando embolismos que afectarían el desempeño de las plantas. En este mismo sentido, si las diferencias fenológicas fueran una adaptación local, el incremento de la temperatura resultar perjudicial para esta especie porque las condiciones ambientales nuevas sucederían en momentos no adecuados para el desarrollo de las plantas.

En relación al efecto del cambio climático sobre la fenología de *Q. magnoliifolia* podríamos concluir que las respuestas plásticas podría favorecer su adaptación al cambio climático mientras que la adaptación local podría hacer que sus poblaciones declinen mientras que en *Q. resinosa* tanto las posibles respuestas plásticas, como las adaptativas podrían ser perjudiciales para su adaptación si continua el incremento de la temperatura.

El estudio demuestra que los gradientes altitudinales son útiles para entender el efecto de la temperatura sobre la fenología en México. Dados los patrones contrastantes en la fenología foliar, es probable que existe una compleja interacción entre variables ambientales y no ambientales que actúan de manera diferente en cada especie, esto refuerza la idea de que en México es necesario realizar estudios fenológicos multi-especies en tiempo grandes soportados por experimentos de jardín común, pruebas de procedencia y/o trasplantes recíprocos en orden para entender si las repuestas observadas son adaptativas o plásticas y finalmente contribuir al entendimiento de las respuestas evolutivas ante escenarios de cambio climático.

### **Genética-molecular de la fenología de *Quercus***

La base genética de la fenología foliar ha sido bien estudiada en *Quercus*. La heredabilidad ha sido estimada en 0.87 por Jensen (1993) y entre 0.15-0.51 por Scotti-Saintagne *et al* (2004). Se conocen los QTLs que controla este carácter en *Q. robur* y *Q. petraea* (Frewen *et al.* 2000; Scotti –Saintagne *et al.* 2004; Galling 2005; Durand 2010; Derory *et al.* 2010).

El mapeo de QTLs es el principal método para descubrir regiones que son responsables de la variación en caracteres complejos y también pueden ser utilizados para estudios adaptativos en árboles forestales (González-Martínez *et al.* 2006). El mapeo de QTLs es relativamente sencillo, sin embargo depende fuertemente de densos mapas genéticos que usualmente consumen mucho tiempo, son costosos de construir y requieren grandes tamaños de muestra (Paterson 1998). La detección de QTLs es a menudo problemática y tienen una aplicación limitada debido a: 1) la inestabilidad de asociaciones de QTL a través de diferentes ambientes y genotipos; 2) detección preferencial de QTL con grandes efectos fenotipos y por lo tanto subestimación de genes con efectos menores que también controlan el carácter, 3) multiplicidad de efectos epistáticos; y 4) huecos asociados con los métodos estadístico, como la asunción de distribución normal y pruebas múltiples que pueden permitir la detección de falsos positivos (Doerge 2002; Mauricio 2001).

El marcador ideal para estudiar la variación adaptativa debe estar directamente involucrado en el control genético del carácter adaptativo, debe tener identificada la secuencia de DNA, una función conocida y la variación alélica debe ser fácilmente identificable (González-Martínez *et al.* 2006). Esos criterios no son completamente satisfechos para los marcadores tradicionales, sin embargo, nuevos métodos basados se están desarrollando en varias especies forestales. Proyectos de secuencias marcadas

etiquetadas (EST) han otorgado numerosas secuencias de nucleótidos para encinos (Ueno *et al.* 2010) las cuales constituyen herramientas para descubrir genes de interés, estudiar el transcriptoma y desarrollar nuevos marcadores para investigar la genética funcional en poblaciones naturales. Los ESTs representan genes expresados con función conocida y pueden ser considerados como un nuevo tipo de marcador genómico funcional (Andersen *et al.* 2004). Por ejemplo un catalogo de 103, 000 ESTs fue ensamblado en 28, 024 unigenes de los cuales el 18.6% tienen uno o más motivos SSR (Durand *et al.* 2010). Cientos de unigenes y CDNAs para la familia Fagaceae están ahora completos o casi completos a través del sitio web (<http://www.fagaceae.com>). Como parte del proyecto EVOLTREE, el equipo europeo ha obtenido cerca de 145, 000 Sanger ESTs de 20 bibliotecas y librerías de supresión sustracción (SSH) de varios tejidos de encino (yemas, hojas, xilema y raíces), estados de desarrollo de fenología foliar así como de árboles desafiados abióticamente (Ueno *et al.* 2013) y 2 454 lecturas con el objetivo de descubrir los genes expresados entre poblaciones caracterizadas por emergencia de las hojas temprana y tardía en estadios eco y endolantes entre *Q. petraea* y *Q. robur* (Derory *et al.* 2006; Ueno *et al.* 2013). Un conjunto de 454 unigenes Sanger se encuentra bajo construcción y puede proveer un catalogo detallado del transcriptoma del encino y también es una fuente marcadores tipo SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) y secuencias simples repetidas útiles para mapeos de unión y de asociación y para detectar QTLs que afectan caracteres complejos de importancia ecológica. Todos esos recursos se encuentran disponibles a través del portal de *Quercus* en <https://w3.pierroton.inra.fr:8443/QuercusPortal>.

Análisis globales del transcriptoma en seis estadios de desarrollo de yemas foliares en *Quercus petraea* han encontrado 236 transcritos con expresión diferencial durante el

desarrollo foliar, las principales funciones asignadas para esos genes son: rescate celular/defensa, metabolismo, síntesis de proteína, ciclo celular y factores de transcripción, (Derory *et al.* 2006). 10 genes fuertemente sub y sobre-regulados en los 6 estadios de desarrollo foliar fueron utilizados para validar los resultados de expresión por medio de RT-PCR cuantitativa, estos genes son: la proteína abundante de embriogénesis tardía (LEA), galactinos sintasa (GS), proteína dedos de zinc DAG2 (DOF-DAG2), la proteína cinasa asociada a la fase S (SKP), la proteína específica de polen SF21, el inhibidor de  $\alpha$ -amilasa/subtilisina, la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH9) y 3 proteínas hipotéticas (Derory *et al.* 2006). 75 unigenes que muestran expresión diferencial entre el estado eco y endolante en *Q. petraea* están involucrados en una variedad de funciones como son las repuestas de ácido absícico, respuesta a estrés por frío y estrés oxidativo (Ueno *et al.* 2013).

Nosotros intentamos estandarizar un protocolo para evaluar la expresión de 8 de genes candidatos de la fenología (Derory *et al.* 2006) en *Q. magnoliifolia* y *Q. resinosa* a lo largo del gradiente con el objetivo de entender los mecanismos adaptativos a ambientes contrastantes uniendo la variación de la fenología a la variación en la expresión de los genes candidatos. Encontramos que los primers heterólogos amplifican bien en las especies mexicanas tanto a nivel de DNA como sobre moldes de cDNA. Sin embargo las señales para cuantificar su expresión por medio de RT-PCR utilizando a SYBR green como fluoróforo reportero no fueron específicas. Es necesario a partir de la amplificación de cDNA diseñar primers específicos para las especies en cuestión. Con la utilización de primer heterólogos es posible secuenciar y analizar la variación nucleotídica de los genes

candidato en gradientes altitudinales y latitudinales para analizar el efecto de la selección natural en genes funcionales.

Los encinos (*Quercus* spp.) son excelentes especies modelo para estudiar la adaptación de los bosques forestales a ambientes cambiantes. Con la disponibilidad de crecientes cantidades de genes candidatos expresionales y funcionales es ahora posible probar la importancia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) asociando la variación nucleotídica en esos genes con la variación fenotípica en caracteres adaptativos en poblaciones segregantes o naturales (Gailingt *et al.* 2009). La diversidad genética es la base para la capacidad de los árboles para adaptarse a cambios ambientales (Krutovsky y Neale 2005). Debido a que los árboles forestales son continuamente desafiados por condiciones ambientales cambiantes durante su tiempo de vida, la variación genética adaptativa en genes funcionales y la plasticidad fenotípica son esenciales para la adaptación a largo plazo a futuras condiciones estresantes (Gailing *et al.* 2009).

De manera global encontramos que los estudios altitudinales a diferentes escalas nos permitieron demostrar el efecto de la altitud sobre los caracteres funcionales de hoja y tallo y sobre la fenología. Ambos caracteres funciona de manera coordinada, por ejemplo las especies de encino de bajas altitudes tienen una masa folia por área (LMA) menor que las de altas altitudes que reflejan el bajo costo de construcción de las hojas determinando la fenología caducifolia de los árboles en altitudes menores, en contraste de los árboles siempre verdes de altitudes superiores. Determinamos que además de la temperatura, otros filtros ambientales están moldeando las respuestas a nivel de comunidad y de poblaciones, entre estos filtros se encuentran la disponibilidad de agua en el suelo y otros factores no climáticos. A nivel genético aunque no fue posible cuantificar la expresión de genes

asociados a la fenología, la amplificación con primers no específicos abre la posibilidad de estudiar la variación nucleotídica de genes funcionales relevantes, por ejemplo el gen LEA está implicado en las respuesta a estrés por deshidratación constituye un buen candidato para analizar la genética adaptativa a lo largo de todo el gradiente en diferentes especies. Dada la alta diversidad  $\alpha$ ,  $\beta$  y funcional encontrada en un transecto pequeño y considerando el gradiente como un laboratorio vivo en donde suceden importantes procesos evolutivos, alguno ya demostrados como la hibridación (Albarran-Lara *et al.* 2010) u otros probables en relación a la difereciación poblacional en genes funcionales, debo considerarse por lo tanto a el Volcán de Tequila en planes de manejo y conservación ya que constituye un escenario natural valioso para investigaciones ecológicas, evolutivas así como un espacio recreativo que otorga numerosos beneficios ecosistémicos a la sociedad.



## IX. LITERATURA CITADA.

- Ackerly DD, Cornwell WK. (2007). A trait-bassed approach to community assembly partitioning of species trait values into within- and among-community components. *Ecology Letters* 10:135-145.
- Albarrán-Lara AL, Mendoza-Cuenca L, Valencia-Avalos S, González-Rodríguez A, Oyama K. (2010). Leaf asymetry increases with hybridization and introgression between *Quercus magnoliifolia* and *Quercus resinosa* (Fagaceae) through an altitudinal gradient in Mexico. *International Journal of Plant Sciences* 171 (3): 310-322.
- Alberto JF, Derory J, Boury C, Frigerio J-M, Zimmermann N E, Kremer A. (2010). Imprints of natural selection along environmental gradients in phenology-related genes of *Quercus petraea*. *Genetics* 195: 495-512.
- Andersem JR, Lubbersted T. (2003). Functional markers in plants. *Trends in Plant Science* 8: 554-560.
- Austin MP, Smith TM. (1989). A new model for the continuum concept. *Vegetatio* 83: 35-46.
- Badeck F.-W, Bondeau A, Böttcher K, Doktor D, Lucht W, Schaber J, Sitch S. (2004). Responses of spring phenology to climate change. *New Phytologist* 162, 295–309.
- Baruch, Z. (1984). Ordination and classification of vegetation along an altitudinal gradient in the Venezuelan páramos. *Vegetatio* 55, 115-126.
- Beals EW. (1969). Vegetation change along altitudinal gradients. *Science* 165:981-985.
- Becker A, Körner Ch, Brun J-J, Guisan A, Tappeiner, U. (2007). Ecological and land use studies along elevational gradients. *Mountain Research and Development* 27: 58-65.
- Bertin, RI. (2008). Plant phenology and distribution in relation to recent climate change. *Journal of the Torrey Botanical Society* 135(1): 126-146. Doi: dx.doi.org/10.3159/07-RP-035R.1.
- Borchert, R. (1994a). Soil and stem water storage determine phenology and distribution of tropical dry forest trees. *Ecology* 75(5): 1437–1449. <http://www.jstor.org/stable/1937467>
- Borchert, R. (1994b). Water status and development of tropical trees during seasonal drought. *Trees* 8(3): 115–125. doi: 10.1007/BF00196635.
- Borchert, R. (2000). Organismic and environmental controls of bud growth in tropical trees. In *Dormancy in Plants: from whole Plant Behavior to Cellular Control*. Edited by C.D. Viemont and J. Crabbè. CAB International, Wallingford, UK. pp 87–107.
- Borchert R, Robertson K, Schwartz MD, Williams-Linera G. (2005). Phenology of temperate trees in tropical climates. *International Journal of Biometeorology* 50(1): 57–65. doi: 10.1007/s00484-005-0261-7.
- Bresson CC, Vitasse Y, Kremer A, Delzon S. (2011). To what extent is altitudinal variation of functional traits driven by genetic adaptation in European oak and beech? *Tree Physiology* 31: 1164–1174. doi: 10.1093/treephys/tpr084.

- Cassasoli M, Derory J, Morera-Dutrey C, Brendel O, Porth I, Guehl J-M, Villani F, Kremer A. (2006). Comparison of quantitative trait loci for adaptive traits between oaks and chestnut based on an expressed sequence tag consensus map. *Genetics* 172: 533-546.
- Chapin FSIII. (1980). The mineral nutrition of wild plants. *An. Re. Ecol. Syst.* 11: 233-260.
- Chave J, Coomes D, Jansen S, Lewis SL, Swenson NG, Zanne AE. (2009). Towards a worldwide wood economics spectrum. *Ecology Letters* 12: 351-366.
- Choat B, Drayton WM, Brodersen C, Matthews MA, Shackel KA, Wada H, Mcelrone AJ (2010). Measurement of vulnerability to water stress-induced cavitation in grapevine: a comparison of four techniques applied to a long-veined species. *Plant, Cell and Environment* 33: 1502 – 1512.
- Chuine I, Cour P. (1999). Climatic determinants of bud burst seasonality in four temperate-zone tree species. *New Phytologist* 143: 339–349.
- Cochard H, Herbette S, Barigah T, Badel E, Ennajeh M, Vilagrosa A (2010). Does sample length influence the shape of xylem embolism vulnerability curves? A test with the cavitron spinning technique. *Plant Cell Environment* 33: 1543-1552.
- Crawley MJ, Akhteruzzaman M (1988) Individual variation in the phenology of oak trees and its consequences for herbivorous insects. *Functional Ecology* 2: 409-415.
- Davi H, Gillmann M, Ibanez T, Cailleret M, Bontemps A, Fady B, Lefèvre F (2011) Diversity of leaf unfolding dynamics among tree species: New insights from a study along an altitudinal gradient. *Agricultural and Forest Meteorology* 151: 1504-1513.
- Derory, J., Léger, P., Garcia, V., Schaeffer, J., Hauser, M-T., Salin, F., Luschnig, Ch., Plomion, Ch., Glössl, J., Kremer, A. (2006). Transcriptome analysis of bud burst in sessile oak (*Quercus petraea*). *New Phytologist* 170, 723–738.
- Derory J, Scotti-Saintagne C, Bertocchi E, Dantec LL, Graignic N, Jauffres A, Cassasoli M, Chancerel E, Bodénès C, Alberto F, Kremer A. (2010). *Heredity* 104: 438-448.
- Díaz S, Hodgson JG, Thompson K, Cabido M, Cornelissen JHC, Jalili A, Monserratt-Martí G, Grime JP, Zarrinkamar F, Asri Y, Band SR, Basconcelo S, Casto-Díez P, Funes G, Hamzee B, Khoshnevi M, Pérez-Harguideguy N, Pérez-Rantomé MC, Shirvany FA, Vendramini F, Yazdani S, Abbas-Azimi R, Bogaard A, Boustani S, Charles M, Dehghan M, de Torres-Espuny L, Falczuk V, Guerrero-Campo J, Hynd A, Jones G, Kowsary E, Kasemi-Saeed F, Maestro-Martínez M, Romo-Díez A, Shaw S, Siavash B, Vilar-Salvador P, Zark MR. (2004). The plant traits that drive ecosystems: Evidence from three continents. *Journal of Vegetation Science* 15:295-304. doi: 10.1111/j.1654-1103.2004.tb02266.x.
- Díaz S, Lavorel S, de Bello F, Quétier F, Grigulis K, Robson M. (2007). Incorporating plant functional diversity effects in ecosystem service assessments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 20684-20689. doi: 10.1073/pnas.0704716104.

- Díaz S, Cabido M, Zak M, Martínez Carretero E, Aranibar J. (1999). Plant functional traits, ecosystem structure and land-use history along a climatic gradient in central-western Argentina. *Journal of Vegetation Science*: 10, 651–660.
- Díaz S, Cabido M. (2001). Vive la différence: plant functional diversity matters to ecosystem processes. *Trends in Ecology and Evolution* 16 (11): 646-655.
- Ducousso A, Guyon A, Krémer A. (1996). Latitudinal and altitudinal variation of bud burst in western populations of sessile oak (*Quercus petraea* (Matt) Liebl). *Ann. Sci. For.* 53, 775–782.
- Doerge RW. (2002). Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nature Reviews Genetics* 3: 43-52.
- Doi H, Katano I. (2008). Phenological timings of leaf budburst with climate change in Japan. *Agricultural Forest Meteorology* 148:512–516.
- Durand J, Bodénès C, Chancerel E, Frigerio J-M, Vendramin G, Sebastiani F, Buonamici A, Gailing O, Koelewijn H-P, Villani F, Mattioni C, Cherubini M, Goicoechea PG, Herrán A, Ikarán Z, Cabané C, Ueno S, Alberto F, Dumoulin P-Y, Guichoux E, de Duravar A, Kremer A, Plomion Ch. (2010). A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSR markers: oak as a case study. *BMC Genomics* 11:570. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/570>.
- Ennajeh M, Simões F, Khemira H, Cochard H (2011). How is the double-ended pressure sleeve technique for assessing xylem vulnerability to cavitation in woody angiosperms? (2010) *Physiologia Plantarum* 142: 205-210.
- Ferrusquía-Villafranca I (1993) *Geology of Mexico: synopsis*. Pages 3-107. Rammamorthy TP, Bye R, Lot A, Fa J. Eds. *Biological diversity of Mexico: Origins and distribution*. Oxford University Press, New York.
- Freschet GT, Cornelissen JHC, Van LRSP, Aerts R. (2010). Evidence of the ‘plant economics spectrum’ in a subarctic flora. *Journal of Ecology* 98: 362-373.
- Gailing O, Kremer A, Steiner W, Hattmer HH, Finkeldey R. (2005). Results on quantitative trait loci for flushing date in oaks can be transferred to different segregating progenies. *Plant Biology* 7: 516-525.
- Gailing O, Vormann B, Leinemann L, Finkeldey R. (2009). Genetic and genomic approaches to assess adaptive genetic variation in plants: forest trees as a model. *Physiologia Plantarum* 137: 509-519
- Gentry AH. (1988). Changes in plant community diversity and floristic composition on environmental and geographical gradients. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 175: 1-34.
- Givnish TJ. (1999). On the causes of gradients in tropical tree diversity. *Journal of Ecology* 87: 193-210.

- Grime JP, Hunt R. (1975). Relative growth-rate: its range and adaptive significance in a local flora. *Journal of Ecology* 63 (2): 393-422.
- Grime J.P, Thompson K, Hunt R, Hodgson JG, Cornelissen JHC, Rorrison IH, Hendry GAF, Ashenden TW, Askew AP, Band SR, Booth RE, Bossard CC, Campbell BD, Cooper EL, Davison AW, Gupta PL, Hall W, Hand WD, Hannah MA, Hillier SH, Hodgkinson DJ, Jalili A, Liu Z, Mackey JML, Matthews N, Mowforth MA, Neal AM, Reader RJ, Reiling K, Ross-Fraser W, Spencer RE, Sutton F, Tasker DE, Thorpe PC, Whitehouse J (1997) Integrated screening validates primary axis of specialization in plants. *Oikos* 79:259-281.
- Grytnes JA, Vetass OR. (2002). Species richness and altitude: a comparison between null models and interpolated plant species richness along the Himalayan altitudinal gradient, Nepal. *The American Naturalist* 159: 294-304.
- Grytnes JA. (2003). Species-richness patterns of vascular plants along seven altitudinal transects in Norway. *Ecography* 26:291–300.
- González-Villarreal LM. (1986). Contribución al conocimiento del género *Quercus* (Fagacea) en el estado de Jalisco. Universidad de Guadalajara-Instituto de Botánica.
- González-Martínez SC, Krutovsky KV, Neale DB. (2006). Forest-tree population genomics and adaptative evolution. *New Phytologist* 170: 227-238.
- Horvath DP, Anderson JV, Chao WS, Foley ME. (2003). Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends in Plant Science* 8: 534-540.
- INEGI (2013) Handbook of municipal geographic information. Retrieved from: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?e=14>.
- Jensen, JS. (1993). Variation of growth in Danish provenance trials with oak (*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* Mattuschka Liebl). *Annales des Sciences Forestieres* 50: 203-207.
- Jensen JS, Hansen JK. (2008). Geographical variation in phenology of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl and *Q. robur* L. oak grow in a greenhouse. *Scandinavian Journal of Forest Research* 23 (2): 179-188.
- Kramer K. (1995). Phenotypic plasticity of the phenology of seven European tree species in relation to climatic warming. *Plant Cell and Environment* 18, 93–104.
- Kessler M. (2001). Patterns of diversity and range size of selected plant groups along an elevational transect in the Bolivian Andes. *Biodiversity and Conservation* 10:1897–1920.
- Kluge J, Kessler M. (2011). Phylogenetic diversity, trait diversity and niches: species assembly of ferns along a tropical elevational gradient. *Journal of Biogeography* 38: 394–405.
- Knight DM, Soulé ME. (1999). The issue of scale in selecting and designing biological reserves. Pp. 19-37 In: M.E. Soulé and J. Terborgh (eds). *Continental Conservation, scientific foundations of regional reserve networks*. Island Press, Washington, D. C.

- Körner C. (2007). The use of ‘altitude’ in ecological research. *Trends in Ecology and Evolution* 22:569–574. doi:10.1016/j.tree.2007.09.006.
- Kouwenberg LLR, Kürschner WM, McElwain JC. (2007). Stomatal frequency change over altitudinal gradients: prospects for paleoaltimetry. *Rev. Mineral. Geochem.* 66:215–241.
- Kozlowski TT, Pallardy SG. (1997). *Growth control in woody plants*. Elsevier.
- Lavorel S, Grigulis K, McIntyre S, Williams NSG, Garden D, Dorrough J, Sandra Berman S, Fabien Quétier F, Aurélie Thébaud A, Bonis A. (2008). Assessing functional diversity in the field – methodology matters! 2008. *Functional Ecology* 22:134-147.
- Levin), Vol. 3, pp. 109–120. Academic Press, San Diego.
- Lohbeck M, Poorter L, Lebrija-Trejos E, Martínez-Ramos M, Meave JA, Paz H, Pérez-García EA, Romero-Pérez IE, Tauro A, Bongers F (2013) Successional changes in functional composition contrast for dry and wet tropical forest. *Ecology*. <http://dx.doi.org/10.1890/12-1850.1>
- Mauricio R. (2001). Mapping quantitative trait loci in plants: uses and caveats for evolutionary biology. *Nature Reviews Genetics* 2: 370-381.
- Menzel A. (2002). Phenology: its importance to the global change community—an editorial comment. *Climatic Change* 54:379–385.
- Miranda F, Hernández-X E. (1963). Los tipos de vegetación de México y su clasificación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 28:29-178.
- Morin X, Roy J, Sonié L, Chuine I. (2010). Changes in leaf phenology of three European oak species in response to experimental climate change. *New Phytologist* 186, 900–910.
- Ne’Eman G. (1993). Variation in leaf phenology and habitat in *Quercus ithaburensis*, a Mediterranean deciduous tree. *British Ecological Society* 81 (4): 627-634.
- Paterson AH, ed. (1998). *Molecular Dissection of Complex Traits*. New York, USA: CRC PRESS.
- Petchey OL, Gaston KJ. (2006). Functional diversity: back to basics and looking forward. *Ecology Letters* 9:741-758.
- Quang, N. D., Ikeda, S., Harada. (2008). Nucleotide variation in *Quercus crispula* Blume. *Heredity* 101: 166-174.
- Rahbek, C. (1995). The elevational gradient of species richness: a uniform pattern? *Ecography* 18:200–205. doi:10.1111/j.1600-0587.1995.tb00341.x
- Reich PB, Wright IJJ, Cavender-Bares J, Craine M, Oleksyn J, Westoby M, Walters MB. (2003). The evolution of plant functional variation: traits, spectra, and strategies. *International Journal of Plant Sciences* 164: S143–S164.

- Reich PB, Walters MB, Ellsworth DS. (1997). From tropics to tundra: Global convergence in plant functioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (25): 13730-13734.
- Rivera G, Elliott S, Caldas LS, Nicolossi G, Coradin VTR, Borchert R. (2002). Increasing day-length induces spring flushing of tropical dry forest trees in the absence of rain. *Trees* 16(7): 445–456. doi: 10.1007/s00468-002-0185-3.
- Rodríguez P, Soberón J, Arita HT. (2003). El componente beta de la diversidad de mamíferos de México. *Acta Zoológica Mexicana* 89: 241-259.
- Rotzer T, Chmielewski FM. (2001). Phenological maps of Europe. *Clim. Res.* 18, 249–257.
- Rzedowski J. (1978). *Vegetación de México*. Editorial Limusa, México, D.F
- Sarvas R. (1974). Investigations on the annual cycle of development of forest trees. Autumn dormancy and winter dormancy. *Communicationes Instituti Forestali Fenniae.* 84, 1–101.
- Schulze ED, Kelliher FM, Körner C, Lloyd J, Leuning R. (1994). Relationships among maximum stomatal conductance, ecosystem surface conductance, carbon assimilation rate, and plant nitrogen nutritios: A global ecology scaling exercise. *Annal Review of Ecology, Evolution and Systematics* 25: 629-660.
- Scott JM, Norse EA, Arita H, Dobson A, Estes JA, Foster M, Gilbert B, Jensen DN, Knight RL, Mattson D, Soulé ME. (1999). The Issue of scale in selecting and designing biological reserves. *Continental Conservation*. Ed. Michael E Soulé and John Terborgh. Island Press USA 229 pp.
- Scotti-Saintagne C, Bodénès C, Barreneche T, Bertocchi E, Plomion C, Kremer A. (2004). Detection of quantitative trait loci controlling bud burst and height growth in *Quercus robur* L. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1648-1659.
- Stevens GC. (1989). The latitudinal gradient in geographical range: How so many species coexist in the tropics. *American Naturalist* 133:240–256.
- Swenson NG, Enquist BJ. (2007). Ecological and evolutionary determinants of a key plant functional trait: wood density and its community-wide variation across latitude and elevation. *American Journal of Botany* 94: 451–459.
- Tilman D. (2001). Functional diversity. *Encyclopedia of Biodiversity* 3, 109-120.
- Toojiinda T, Baird E, Booth A, Broers L, Hayes P, Powell W, Thomas W, Vivar H, Young G. (1998) Introgression of quantitative trait loci (QTLs) determining stripe rust resistance in barley an example of marker-assisted line development. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 123-131.
- Ueno S, Le Provost G, Léger V, Klopp Ch, Noirot C, Frigerio J-M, Salin F, Salse J, Abrouk M, Murant F, Brendel O, Derory J, Abadie P, Léger P, Cabane C, Barré A, de Daruvar A, Couloux A, Wincker P, Reviron M-P, Kremer A, Plomion Ch. (2010). Bioinformatic analysis of ESTs colleted by Sanger and pyrosequencing methods for a keystone forest tree species: oak. *BMC Genomics* 11:650.

- Ueno S, Klopp Ch, Leplé J Ch, Derory J, Noirot C, Léger V, Prince E, Kremer A, Plomion Ch, Le Provost G. (2013). Transcriptional profiling of bud dormancy induction and release in oak by next-generation sequencing. *BMC Genomics* 14:236. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/236>
- UNESCO [United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization].(2006). Global change in mountain biosphere reserves: Addressing impact on people and the environment. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. Natural Sciences. People, Biodiversity and Ecology. <http://www.unesco.org/mab/ecosyst/mountains/gembr.shtml>.
- van Dongen S, Backeljau T, Matthysen E, Dhondt AA. (1997) Synchronization of hatching date with bud burst of individual of individual host trees (*Quercus robur*) in the winter moth (*Operophtera brumata*) and its fitness consequences. *Journal of Animal Ecology* 66: 113-121.
- Valencia SA. (2004). Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75: 33–53.
- Vázquez JA, Givnish TJ (1998) Altitudinal gradients in tropical forest composition, structure, and diversity in the Sierra de Manantlán. *Journal of Ecology* 86:999–1020. doi: 10.1046/j.1365-2745.1998.00325.x
- Visser ME, Both C. (2005). Shifts in phenology due to global climate change: the need for a yardstick. *Proceedings of Royal Society: Biological Sciences* 272(1581): 2561–2569. doi: 10.1098/rspb.2005.3356.
- Vitasse Y, Delzon S, Caroline CB, Michalet R, Kremer A. (2009a). Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden. *Canadian Journal of Forest Research* 39, 1259–1269.
- Vitasse Y, Delzon S, Dufrière E, Pontailier J-Y, Louvet J-M, Kremer A, Michalet R. (2009b). Leaf phenology sensitivity to temperature in European trees: Do within-species populations exhibit similar responses? *Agricultural Forest Meteorology* 149, 735–744.
- Vorman B, Gailing O, Derory J, Plomion C, Kremer A, Finkeldey R. (2011). Characterisation and natural variation of a dehydrin gene in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. *Plant Biology* 13: 881-887.
- Wesołowski T, Rowiński P. (2006). Timing of bud burst and tree-leaf development in a multispecies temperate forest. *Forest Ecology and Management*. 237, 387–393.
- Westoby M, Falster DS, Moles AT, Vesk PA, and Wright IJ (2002) Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: 125–159.
- Wielgolaski FE. (2001). Phenological modifications in plants by various edaphic factors. *International Journal of Biometeorology* 45, 196–202.

Wright IJ, Reich PB, Westoby M, Ackerly DD, Baruch Z, Bongers F, Cavender-Bares J, Chapin T, Cornelissen JHC, Diemer M, Flexas J, Garnier E, Groom PK, Gulias J, Hikosaka K, Lamont BB, Lee T, Lee W, Lusk C, Midgley J, Navas M-L, Niinemets Ü, Oleksyn J, Osada N, Poorter H, Poot P, Prior L, Pyankov V I, Roumet C, Thomas SC, Tjoelker MG, Veneklaas EJ, Villar R. (2004). The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* 428:621–827.