



PRODUCCIÓN DE CLOROFILA EN *Pinus pseudostrobus* EN ETAPAS JUVENILES BAJO DIFERENTES AMBIENTES DE DESARROLLO

CHLOROPHYLL PRODUCTION IN *Pinus pseudostrobus* JUVENILES UNDER DIFFERENT DEVELOPMENT ENVIRONMENTS

Víctor Hugo Cambrón-Sandoval¹; María Luisa España-Boquera¹; Nahum M. Sánchez-Vargas¹; Cuahtémoc Sáenz-Romero¹; J. Jesús Vargas-Hernández²; Yvonne Herrerías-Diego³

¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, (IIAF-UMSNH), Morelia, Michoacán, MÉXICO.

Correo-e: hugo.cambron@gmail.com (¹Autor para correspondencia), nsanchezv@yahoo.com, csaenzromero@gmail.mx, boquera@zeus.umich.mx.

²Forestal, Colegio de Postgraduados. Carr. México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO.

Correo-e: vargashj@colpos.mx,

³Facultad de Biología Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) Correo-e: ydiego@oikos.unam.mx.

RESUMEN

Limitar la cantidad de radiación reduce la actividad fotosintética, causando estrés y alteraciones morfológicas y fisiológicas en el desarrollo de las plantas. El presente estudio analizó el efecto del estrés causado por dos niveles de competencia en familias de medios hermanos de *Pinus pseudostrobus* Lindl. Alta competencia inter-familiar (ambiente II) y alta competencia intra-familiar (ambiente III), comparado con un ambiente de baja competencia (I). Se cuantificó el contenido de clorofila total, *a*, *b* y la relación entre clorofilas *a/b*, como una indicación del nivel de estrés, en plantas de 10 meses de edad usando el método de Barnes. Las plantas se establecieron en un ensayo de jardín común, con un diseño de parcelas divididas con cuatro bloques y tres plantas por parcela. En la condición I, la clorofila total fue significativamente mayor ($P < 0.05$); no observándose diferencias entre las otras condiciones ($P > 0.05$). Un análisis separado de las clorofilas mostró menor contenido de clorofila *a* en plantas rodeadas de individuos genéticamente similares (ambiente III), que cuando fueron diferentes (ambiente II); al contrario, la clorofila *b* fue mayor en individuos genéticamente similares (ambiente III). En conclusión, la competencia intra-familiar fue mayor que la inter-familiar, suponiendo un mayor nivel de estrés.

Recibido: 14 de septiembre, 2010
Aceptado: 24 de enero, 2011
doi: 10.5154/r.rchscfa.2010.09.077
<http://www.chapingo.mx/revistas>

PALABRAS CLAVE: Clorofila total, clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila *a/b*, competencia, densidad.

ABSTRACT

Limiting the amount of sun radiation reduces photosynthetic activity, causing stress and morphological and/or physiological changes in plant development. This study analyzed the stress effect caused by two levels of competition in *Pinus pseudostrobus* Lindl half-sib families: high inter-family (environment II) and high intra-family (environment III) competition, compared with a low level of competition (environment I). Total chlorophyll, chlorophyll-*a*, and chlorophyll-*b* content, plus the chlorophyll *a/b* ratio, were quantified as an indicator of stress level in 10-month-old plants using the Barnes method. Plants were established in a common garden test under a split-plot design with four replications and three individuals per plot. Total chlorophyll was significantly higher ($P < 0.05$) in environment I; no differences ($P > 0.05$) were observed between the other competition environments. A separate analysis of chlorophylls showed lower chlorophyll-*a* content in plants surrounded by genetically-similar plants (environment III) as opposed to genetically-different ones (environment II); conversely, chlorophyll-*b* content was higher in genetically-similar plants (environment III). In conclusion, intra-genotypic competition was generally stronger than inter-genotypic competition, under high levels of stress.

KEY WORDS: Half-sib families; total chlorophyll, *a* chlorophyll, *b* chlorophyll, *a/b* chlorophyll, competition environment.

INTRODUCCIÓN

El *Pinus pseudostrobus* Lindl., es una de las especies forestales de mayor importancia en México. Debido a sus cualidades forestales, ha sido establecida con éxito fuera de su distribución natural en: Brasil (Ferreira *et al.*, 1972), Sudáfrica, Colombia y Venezuela (Wright y Wessels, 1992), lo que la ha llevado a desarrollar plasticidad para ser competitiva en los nuevos ambientes. La tolerancia a la competencia es la habilidad de las plántulas para sobrevivir y crecer en presencia de otras, las cuales también buscan los mismos recursos, como luz, agua y nutrientes (Noland *et al.*, 2001).

Las plantas tienden a responder de forma morfológica y fisiológica a las condiciones ambientales en las que se desarrollan (Townsend y Hanover, 1972), modificando la velocidad de crecimiento, la producción de estructuras secundarias y la cantidad de pigmentos entre otras características. La clorofila, responsable de la fotosíntesis en que la energía lumínica es transformada en energía química por plantas, algas y algunas bacterias (Vermaas, 1998), se considera una medida indirecta del estado nutricional de la planta, que por la estrecha relación con el nitrógeno total de las hojas, se ha utilizado como un buen estimador de la condición del dosel en bosques de coníferas (Zarco-Tejada *et al.*, 2004).

Los factores exógenos importantes para que se lleve a cabo la transformación lumínica son: energía radiante, humedad, temperatura y estrés hídrico (Kaufmann y Linder, 1996). Las plantas sometidas a cualquier tipo de estrés tienden a perder capacidad fotosintética y disminuir el contenido de clorofila de sus hojas (Carter y Knapp, 2001). En hojas jóvenes de pino bajo condiciones de competencia, disminuye el Ca⁺ y la clorofila total (Carter *et al.*, 1989), esto manifiesta la habilidad de las especies para adaptarse morfológica o fisiológicamente, para capturar y utilizar eficazmente, la escasa luz disponible.

La clorofila total es la suma de las clorofilas *a* y *b*. La clorofila *a*, es el pigmento principal, que transforma la energía lumínica en energía química, la cual se utiliza en el crecimiento de las plantas, por lo que se considera un pigmento activo. Por su parte, la clorofila *b* absorbe la luz en longitudes de onda diferentes que la clorofila *a*; la luz se transfiere después a la clorofila *a*, que la transforma en energía; por esto, a la clorofila *b* se le considera un pigmento accesorio y forma parte de las antenas colectoras (García-Breijo *et al.*, 2006). La disminución en la intensidad de la luz reduce la actividad fotosintética y la concentración de clorofila *b* tiende a ser mayor, afectando la relación de clorofilas *a/b* dentro de la planta (Shafiqur *et al.*, 2000). Una reducción en el espacio de crecimiento, tendría como efecto una disminución en la cantidad de luz, creando diferencias en el desarrollo de los individuos cuando se modifica la densidad de plantación, aunado a

INTRODUCTION

Pinus pseudostrobus Lindl is one of the most important forest species in Mexico. Due to its forest qualities, it has been successfully established outside its natural range in Brazil (Ferreira *et al.*, 1972), South Africa, Colombia and Venezuela (Wright and Wessels, 1992), which has led it to develop plasticity in order to be competitive in new environments. Tolerance to competition is the ability of seedlings to survive and grow in the presence of others, which also seek the same resources, such as light, water and nutrients (Noland *et al.*, 2001).

Plants tend to respond morphologically and physiologically to the environmental conditions in which they develop (Townsend and Hanover, 1972), changing their growth rate, production of secondary structures and amount of pigments, among other characteristics. Chlorophyll, responsible for photosynthesis in which light energy is converted into chemical energy by plants, algae and some bacteria (Vermaas, 1998), is considered to be an indirect measure of a plant's nutritional status. Due to chlorophyll's close relationship with total leaf nitrogen, it has been used as a good estimator of the condition of the canopy in coniferous forests (Zarco-Tejada *et al.*, 2004).

Total chlorophyll is the sum of chlorophylls *a* and *b*. Chlorophyll *a* is the main pigment that converts light energy into chemical energy, which is used in plant growth, for which it is considered an active pigment. For its part, chlorophyll *b* absorbs light at different wavelengths than chlorophyll *a*. The light is then transferred to chlorophyll *a*, which transforms it into energy.

For this reason, chlorophyll *b* is considered an accessory pigment and as part of the light-collecting antenna system (García-Breijo *et al.*, 2006). Decreased light intensity reduces photosynthetic activity and the concentration of chlorophyll *b* tends to be higher, affecting the chlorophyll *a/b* ratio within the plant (Shafiqur *et al.*, 2000). A reduction in the growth space would decrease the amount of light, creating differences in the development of individuals when changing planting density. Coupled with this, the behavior of individuals is often different when they grow next to individuals of a different genotype (intra-family competition), as opposed to when they grow alongside individuals of their own genotype (intra-family competition), (Adams *et al.*, 1973). Against this background, this study compared the effect of intra- and inter-family competition, under high levels of stress, taking as an indicator the variation in total chlorophyll, chlorophyll *a* and chlorophyll *b* content, plus the chlorophyll *a/b* ratio, in *P. pseudostrobus* half-sib families, in a common garden test.

MATERIALS AND METHODS

Establishment of the test

We used *P. pseudostrobus* seeds from 13 mother

esto el comportamiento de los individuos suele ser distinto cuando crecen junto a individuos de diferente genotipo (competencia inter-familiar), que cuando lo hacen junto a individuos de su propio genotipo (competencia intra-familiar), (Adams *et al.*, 1973). En este contexto, en el presente estudio se comparó el efecto de la competencia intra- e inter-familiar, en los niveles de estrés, tomando como indicador la variación en el contenido de clorofila total, clorofilas *a* y *b*, y la relación entre clorofilas *a/b*, en familias de medios hermanos de *P. pseudostrobus*, en un ensayo de jardín común.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento del ensayo

Se utilizaron semillas de *P. pseudostrobus* de 13 árboles madre (familias), en lotes individuales, identificados por separado durante el estudio, que fueron recolectados en bosques naturales de la Comunidad Indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México, entre los 2,100 y los 2,800 m de altura. Las semillas germinaron en condiciones de laboratorio y posteriormente se trasplantaron a contenedores rígidos Copperblocks de 220 cm³ de capacidad, en donde crecieron por tres meses. Después, las plántulas fueron establecidas en un ensayo de jardín común, que consistió en un cajón rectangular de 15.0 m de largo x 1.2 m de ancho x 0.6 m de alto; llenado con capas de 20 cm de espuma volcánica gruesa, 5 cm de tezontle, 10 cm de tierra de encinar y 20 cm de turba de musgo sphagnum, perlita expandida y vermiculita en proporción de 2:1:1 en volumen. El ensayo contaba con un sistema de riego automatizado a través de nebulizadores ubicados cada 1.15 m de distancia a una altura de 1.90 m, con una capacidad de riego de 125 cm³ × minuto. Con periodos de riego de 20 minutos cada tercer día (Sólo en época de estiaje se realizaron riegos diarios).

El ensayo se estableció bajo un diseño de parcelas divididas, con cuatro repeticiones y tres individuos como unidad experimental; las parcelas grandes fueron las condiciones de competencia y las chicas las familias. Se probaron tres condiciones: I) baja competencia inter-familiar, con familias mezcladas, plantadas a un espaciamiento de 0.25 m × 0.12 m; esta condición actuó como referencia de no competencia, ya que permitió el libre desarrollo de las plantas en las primeras etapas de crecimiento; II) alta competencia inter-familiar, con familias mezcladas plantadas a 0.12 m × 0.06 m, y III) alta competencia intra-familiar, con familias plantadas en subparcelas unifamiliares a 0.12 m × 0.06 m.

Las condiciones I y II permitieron evaluar el efecto del nivel de competencia asociada a la densidad de plantación y las condiciones II y III el efecto del tipo de interacción genotípica (inter- vs. intra-familiar). Entre cada condición de competencia se utilizaron fajas de protección de un

trees (families), in individual lots, separately identified during the study, which were collected in natural forests in the indigenous community of Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, Mexico, between 2,100 and 2,800 m high. The seeds germinated in laboratory conditions and were then transplanted into rigid 220 cm³-capacity Copperblock containers, where they grew for three months. Later, the seedlings were established in a common garden test, which consisted of a rectangular box measuring 15.0 m long x 1.2 m wide x 0.6 m high, filled with a 20-cm layer of thick volcanic foam, a 5-cm layer of tezontle, 10 cm of ground oak and 20 cm of sphagnum peat most, expanded perlite and vermiculite in a 2:1:1 ratio by volume. The test had an automatic watering system through nebulizers spaced 1.15 m apart at a height of 1.90 m, with an irrigation capacity of 125 cm³ × minute, and with 20-minute watering periods every other day (daily watering was performed only during the dry season).

The test was established under a split-plot design with four replications and three individuals as the experimental unit. The large parcels were the competition environments and the small ones the families. Three conditions were tested: I) low inter-family competition, with mixed families, planted at a spacing of 0.25 m × 0.12 m; this condition served as a reference for non-competition, as it allowed the free development of plants in the early stages of growth; II) high inter-family competition, with mixed families planted at 0.12 m × 0.06 m; and III) high intra-family competition, with families planted in single-family subplots at 0.12 m × 0.06 m.

Environments I and II allowed us to evaluate the effect of the competition level associated with the planting density, and environments II and III the effect of the type of genotypic interaction (inter- vs. intra-family). Between each competition environment, shelterbelts of a genotype different than the genotypes tested were used, in order to avoid edge effect. Three plants per plot were sampled for analysis; in the intra-family competition plots, with 16 plants, we used three of the central plants surrounded by individuals of the same family, with 117 individuals per experimental unit and 156 individuals per plot, making a total of 468 individuals. Harvesting of the biological samples was carried out from December 1-4, 2008, from 7 to 9:00 am (to avoid strong sunlight). At harvest time, the average height of the plants per competition environment was: 61.84 ± 3.07 cm in the low inter-family competition (I), 48.58 ± 4.12 cm in the high inter-family competition (II), and 47.17 ± 3.79 cm in the high intra-family competition (III).

Variables evaluated

At 10 months after establishing the test, we estimated the total chlorophyll, chlorophyll-*a*, and chlorophyll-*b* content, plus the *a/b* ratio. A leaf sample was taken from the center of each selected plant, in quantities of 100 to 120 mg of fresh matter, which was submitted to a chlorophyll

genotipo diferente a los genotipos probados, para evitar un efecto de borde. Se muestrearon tres plantas por parcela para el análisis; en las parcelas de competencia intra-familiar, con 16 plantas, se usaron tres de las plantas centrales rodeadas por individuos de la misma familia, teniendo 117 individuos por unidad experimental y 156 individuos por parcela, haciendo un total de 468 individuos. La cosecha de las muestras biológicas se realizó del 1º al 4 de diciembre del 2008, colectando las muestras de 7 a 9:00 horas a.m. (para evitar los rayos de sol más fuertes). Al momento de la cosecha el desarrollo en altura promedio por condición de competencia de los individuos, fue de 61.84 ± 3.07 cm en la baja competencia inter-familiar (I), 48.58 ± 4.12 cm en la alta competencia inter-familiar (II) y 47.17 ± 3.79 cm en la alta competencia intra-familiar (III).

Variables evaluadas

A los 10 meses de establecido el ensayo, se estimó el contenido de clorofila total, clorofila *a*, clorofila *b* y la relación *a/b*. Se tomó una muestra de hojas de la parte central de cada planta seleccionada, en cantidades de 100 a 120 mg de materia fresca, la cual se sometió a un proceso de extracción de clorofila, en DMSO (Dimetilsulfoxido), según el método de Barnes *et al.* (1992). Los resultados se expresaron en cantidad de clorofila *a*, *b* y total, por unidad de superficie foliar ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$).

Análisis de datos

Se realizó un análisis de varianza para determinar las posibles diferencias en contenido de clorofilas en los genotipos, según la condición de competencia (procedimiento MIXED) (SAS, 2006). Para ello se utilizó el siguiente modelo, en el que *C* se consideró como efecto fijo.

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + C_j + BC_{ij} + F_k + CF_{jk} + BCF_{ijk} + e_{ijkl}$$

donde: Y_{ijkl} es el valor observado del *l*-ésimo individuo en la *k*-ésima familia, en la *j*-ésima condición de competencia y en el *i*-ésimo bloque; μ es el valor promedio de la población; B_i es el efecto del *i*-ésimo bloque; C_j es el efecto fijo de la *j*-ésima condición de competencia; BC_{ij} es el efecto de la interacción del *i*-ésimo bloque con la *j*-ésima condición de competencia; F_k es el efecto de la *k*-ésima familia; CF_{jk} es el efecto de interacción de la *j*-ésima condición de competencia con la *k*-ésima familia; BCF_{ijk} es la interacción del *i*-ésimo bloque con la *j*-ésima condición de competencia y la *k*-ésima familia y e_{ijkl} es el error dentro de parcela.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clorofila total

El contenido de clorofila total en *Pinus pseudostrobus* (Figura 1) se encontró en la amplitud de $42.3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$

extraction process in DMSO (Dimethylsulfoxide), according to the method proposed by Barnes *et al.* (1992). The results were expressed in amount of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and total chlorophyll, per unit leaf area ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$).

Data analysis

An analysis of variance was performed to determine possible differences in chlorophyll content in the genotypes, according to the competition environment (MIXED procedure) (SAS, 2006). We used the following model, where *C* is considered as a fixed effect.

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + C_j + BC_{ij} + F_k + CF_{jk} + BCF_{ijk} + e_{ijkl}$$

where: Y_{ijkl} is the observed value of the *l*-th individual in the *k*-th family, in the *j*-th competition environment and the *i*-th block; μ is the average of the population; B_i is the effect of the *i*-th block; C_j is the fixed effect of the *j*-th competition environment; BC_{ij} is the effect of the interaction of the *i*-th block with the *j*-th competition environment; F_k is the effect of the *k*-th family; CF_{jk} is the interaction effect of the *j*-th competition environment with the *k*-th family; BCF_{ijk} is the interaction of the *i*-th block with the *j*-th competition environment and the *k*-th family and e_{ijkl} is the plot error.

RESULTS AND DISCUSSION

Total chlorophyll

Total chlorophyll content in *Pinus pseudostrobus* (Figure 1) was found in the range of $42.3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ to $63.1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, which corresponds to the upper range estimated for *Pinus sylvestris*, containing between 26.8 and $56.8 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Zarco-Tejada *et al.*, 2004). Significant differences were also found in total chlorophyll among planting densities ($P \leq 0.05$) (Figure 1). Since the test was established in similar substrate and water availability conditions, the only condition that could affect the amount of pigments was the shade effect, due to the high density. These results are similar to those reported in studies with palm trees, such as *Euterpe edulis* Mart., in which the intensity of light radiation was manipulated. These studies indicate that when the amount of radiation decreases, the amount of pigment also decreases proportionately (Nakazono *et al.*, 2001) and, therefore, growth is lower. In environment III, there was a reduction in the amount of total chlorophyll pigments (-1.9 %), compared to environment II; however, this difference was not significant ($P > 0.05$), since the space conditions within each condition were similar.

Chlorophyll a

Significant differences ($P \leq 0.05$) were found in the amount of chlorophyll *a*, among the competition conditions,

y $63.1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, que corresponde al intervalo superior estimado para *Pinus sylvestris*, con un contenido entre 26.8 y $56.8 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Zarco-Tejada *et al.*, 2004); también se hallaron diferencias significativas en clorofila total entre densidades de plantación ($P \leq 0.05$) (Figura 1). Ya que el ensayo se estableció en similitud de sustrato y cantidad de agua disponible, la única condición que pudo afectar la cantidad de pigmentos fue el efecto de sombra, como consecuencia de la alta densidad. Estos resultados son similares a los reportados en estudios con palmeras, como *Euterpe edulis* Mart., en el que se manipuló la intensidad de la radiación lumínica, aduciendo que cuando la cantidad de radiación disminuye, la cantidad de pigmentos también lo hace en forma proporcional (Nakazono *et al.*, 2001) y, como consecuencia, el crecimiento es menor. Dentro de la condición III se presentó una reducción de la cantidad de pigmentos de clorofila total (-1.9 %), con respecto a la condición II; sin embargo, esta diferencia no fue significativa ($P > 0.05$), ya que las condiciones de espacio dentro de cada condición fueron similares.

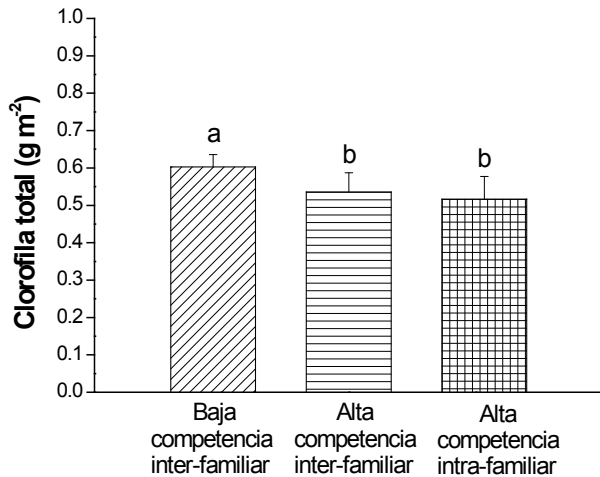


FIGURA 1. Contenido de clorofila total bajo distintas condiciones de competencia. Donde: letras distintas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre ambientes de competencia.

FIGURE 1. Total chlorophyll content under different competition conditions. Where: different letters indicate significant differences ($P \leq 0.05$) among competition environments.

Clorofila a

Se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en la cantidad de clorofila a, entre las condiciones de competencia, tanto por efecto del espaciado (condición I vs. II y I vs. III), como por efecto del arreglo de los genotipos (condiciones II vs. III) (Figura 2). La condición I, en la que las plantas crecieron sin competencia y por lo tanto sin estrés, fue la que presentó mayor contenido de clorofila a (Figura 2). Estos resultados son comparables a los obtenidos por Medina-Cano *et al.* (2006), en estudios realizados con dos variedades de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.), bajo condiciones de sombreado y

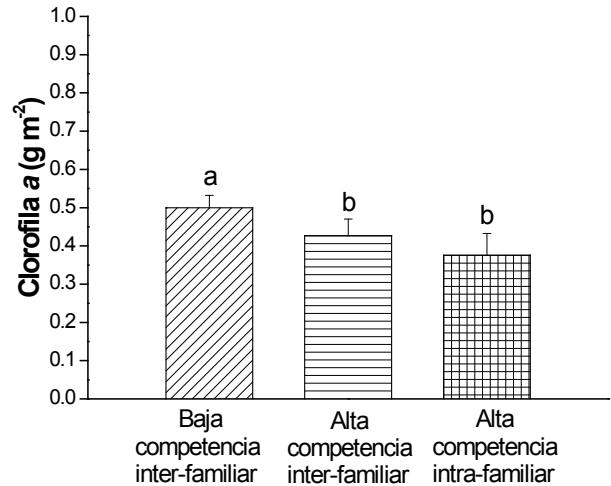


FIGURA 2. Contenido de clorofila a bajo distintas condiciones de competencia.

FIGURE 2. Chlorophyll content under different competition conditions.

both as a result of the spacing (environment I vs. II and I vs. III) and the arrangement of genotypes (environment II vs. III) (Figure 2). Environment I, in which plants grew without competition and therefore without stress, was the one with the highest chlorophyll-a content (Figure 2). These results are comparable to those obtained by Medina-Cano *et al.* (2006) in studies with two varieties of naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) under conditions of shading and sun exposure (as in environments I vs. II and I vs. III), where they observed that chlorophyll-a production was higher in individuals that grew in conditions in which there was a greater amount of solar radiation (+67 %) than in those that grew under shade. In environment III, chlorophyll-a content was lower than in II (Figure 2). This indicates that plants growing in intra-family competition have a higher stress level than plants in inter-family competition.

Chlorophyll b

Chlorophyll-b content was similar between densities (environments I vs. II), but it was significantly different ($P \leq 0.05$) with regard to high intra-family competition (I vs. III and II vs. III) (Figure 3). This result can be explained as a response to the stress due to the pressure of growing with competitively-similar individuals (environment II), which can lead to a more severe stress effect than the shade effect alone (environment II) when they have similar growth rates, nutrient requirements, root growth, etc. This response to density-mediated light variation is consistent with individuals subjected to strong shading or excessive stress which, as a result, produce more chlorophyll b than those grown in optimal light conditions, like those studied by Nakazono *et al.* (2001).

a/b ratio

The chlorophyll a/b ratio varied based on the competi-

exposición solar (como en las condiciones I vs. II y I vs. III), donde observaron que la producción de clorofila *a* fue mayor en individuos que crecieron en condiciones de mayor cantidad de radiación solar (+67 %), que en aquellos que se desarrollaron bajo sombra. En la condición III el contenido de clorofila *a* fue menor que en la II (Figura 2). Esto indica que las plantas que crecen en competencia intra-familiar tienen un nivel de estrés superior al de las plantas en competencia inter-familiar.

Clorofila *b*

El contenido de clorofila *b* fue similar entre densidades (condiciones I vs. II), pero fue significativamente diferente ($P \leq 0.05$) con respecto a la alta competencia intra-familiar (I vs. III y II vs. III) (Figura 3). Este resultado puede ser explicado como una respuesta al estrés debido a la presión de crecer junto a individuos competitivamente similares (condición III), lo cual puede llegar a causar un efecto de estrés más severo que el solo efecto de la sombra (condición II), esto cuando se tienen crecimientos similares, requerimientos de nutrimentos, crecimiento de la raíz, etc. Esta respuesta a la variación de luz mediada por la densidad, coincide con individuos que son sometidos a un fuerte sombreado o un estrés excesivo, produciendo mayor cantidad de clorofila *b* que aquellos que crecen en condiciones óptimas de luz, como los estudiados por Nakazono *et al.* (2001).

Relación *a/b*

La relación entre clorofilas *a/b* varió según la condición de competencia, encontrándose diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre las tres condiciones (Figura 4). Las relaciones fueron de 5.2 a 3.4, valores inferiores a los consignados para acículas jóvenes de *Pinus halepensis* Mill., por López-Donate *et al.* (2000) (de 7.8 a 5.9); sin embargo, esta proporción puede variar de acuerdo a la especie, la época del año, la hora y las condiciones climáticas. Evidentemente, la relación entre clorofilas *a/b*, se deriva de los comportamientos de las clorofilas *a* y *b* por separado: el contenido de clorofila *a* disminuyó de la condición I a la II y de la II a la III, mientras que el de clorofila *b* aumentó, por lo que la relación *a/b* disminuyó de la condición I a la II y de la II a la III. El reajuste en la proporción de los contenidos de los dos pigmentos, de acuerdo al nivel de estrés, se puede entender como una respuesta típica de *plasticidad fotosintética* (Mitchell y Arnott, 1995; Groninger *et al.*, 1996).

Fisiológicamente la plasticidad fotosintética se explica por la activación de los pigmentos accesorios cuando el funcionamiento de los pigmentos activos se ve disminuido, de tal forma que la combinación de ambos facilita la captación de luz y la capacidad fotosintética de la planta en condiciones difíciles. Así, la alta densidad se

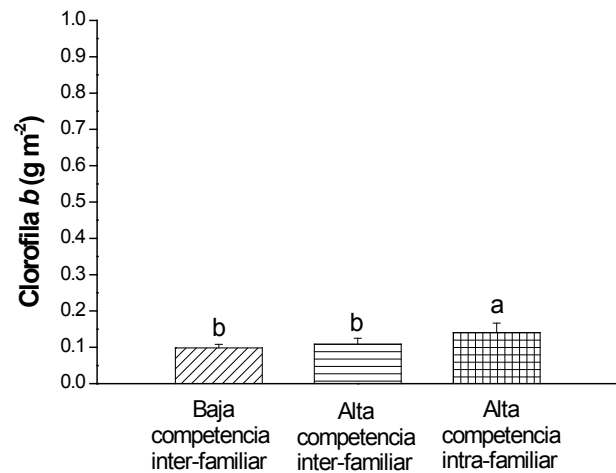


FIGURA 3. Contenido de clorofila *b* bajo distintas condiciones de competencia.

FIGURE 3. Chlorophyll-*b* content under different competition conditions.

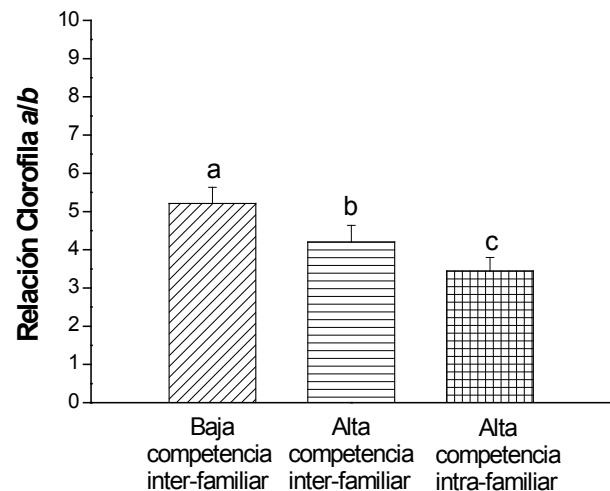


FIGURA 4. Relación de clorofilas *a/b* bajo distintas condiciones de competencia.

FIGURE 4. Chlorophyll *a/b* ratio under different competition conditions.

tion condition, with significant differences ($P \leq 0.05$) being found among the three environments (Figure 4). The ratios were from 5.2 to 3.4, values lower than those reported for young needles of *Pinus halepensis* Mill., by López-Donate *et al.* (2000) (from 7.8 to 5.9). However, this proportion may vary according to species, season, time and weather conditions. Clearly, the chlorophyll *a/b* ratio is derived from the behaviors of chlorophylls *a* and *b* separately: chlorophyll-*a* content decreased from environment I to II and II to III, while that of chlorophyll *b* increased, which is why the *a/b* ratio declined from environment I to II and II to III. The adjustment in the ratio content of the two pigments, according to the stress level, can be understood as a typical response of photosynthetic plasticity (Mitchell and Arnott, 1995;

confirma como una situación de estrés con respecto a un mayor espaciamiento, ya que la baja competencia inter-familiar (condición I) presenta una relación a/b mayor que la alta competencia inter-familiar (condición II) y la alta competencia intra-familiar (condición III). Del mismo modo, la condición III supone una condición de estrés mayor, ya que presenta una relación a/b menor que la condición II. Estudios que nos ayudan a entender la condición de competencia (III) intra-familiar, pueden ser los estudios con clones de *Eucalyptus* (individuos genéticamente iguales), en los cuales se pudo determinar que bajo condiciones de alta densidad (estrés por reducción de espacio), las parcelas monoclonales son más sensibles que las parcelas de medios hermanos (competencia inter-familiar) en variables como la altura y el diámetro (Bouvet *et al.*, 2005). Este tipo de estrés también es causante de una disminución en la cantidad de pigmentos de clorofila (Carter and Knapp, 2001). Por lo cual en nuestro estudio los individuos que se desarrollaron bajo la condición de competencia III, presentaron niveles de estrés superiores a las condiciones de competencia I y II.

Una forma de visualizar este comportamiento es considerando que en la condición III, todos los individuos de cada subparcela, al ser genéticamente similares, presentaban casi la misma altura total, y las hojas muestreadas también estaban, aproximadamente, a la misma altura. Al ser alta la densidad, se tomaron hojas sombreadas, independientemente del genotipo. Sin embargo, en la condición II, cada individuo estaba rodeado de individuos genéticamente diferentes, y por lo tanto de diferentes alturas, lo que implicó que las hojas muestreadas, en el nivel medio de tallo, estuvieran en algunos casos a la luz (genotipos más altos) y en otros a la sombra. Es decir, mientras que en la condición III todas las plantas estaban estresadas (nivel promedio de estrés alto), en la condición II había plantas con menos estrés (con estrés compensado y en promedio menor).

Un comportamiento similar en la relación entre clorofilas se observó en especies de *Euterpe edulis* Mart., (palmera) en las que la menor relación a/b se presentó en individuos con mayor estrés, asociado a una disminución en la cantidad de luz (Nakazono *et al.*, 2001).

CONCLUSIONES

De acuerdo a los contenidos de clorofila total, a , b y la relación de clorofilas a/b , fue posible determinar que la condición de competencia III (plantas rodeadas de individuos genéticamente similares), representa un nivel de estrés mayor en comparación con la condición de competencia II (individuos genéticamente diferentes), basándonos en las menores cantidades de pigmentos de clorofila a y una mayor cantidad de clorofila b en individuos que crecieron bajo esta condición de competencia (III).

Groninger *et al.*, 1996).

Physiologically, photosynthetic plasticity is explained by the activation of the accessory pigments when the operation of the active pigments is diminished, so that the combination of both facilitates light capture and the photosynthetic capacity of the plant in difficult conditions. Thus, high density is confirmed as a stress situation compared to greater spacing, since the low inter-family competition (environment I) has an a/b ratio greater than the high inter-family competition (environment II) and the high intra-family competition (environment III). Similarly, environment III represents a condition of greater stress, as it has a lower a/b ratio than environment II. Studies that help us understand the intra-family competition environment (III) are those with *Eucalyptus* clones (genetically-identical individuals), in which it was found that under high-density conditions (stress due to reduced space), the monoclonal plots are more sensitive than the half-sib plots (inter-family competition) in variables such as height and diameter (Bouvet *et al.*, 2005). This type of stress also causes a decrease in the amount of chlorophyll pigments (Carter and Knapp, 2001). Therefore in our study individuals that developed under competition environment III presented higher stress levels than those in competition environments I and II.

One way to visualize this behavior is by considering that in environment III, all the individuals in each subplot, being genetically similar, had almost the same total height, and the sampled leaves were also roughly at the same height. Due to the high density, shaded leaves, regardless of genotype, were taken. However, in environment II, each individual was surrounded by genetically-different individuals of, as a result, different heights, which meant that the leaves sampled, in the middle of the stem, were in some cases in the light (the tallest genotypes) and in others in the shade. That is, while in environment III all plants were stressed (high average stress level), environment II plants had less stress (stress-compensated and lower average).

A similar behavior in the relationship between chlorophylls was observed in species of *Euterpe edulis* Mart. (palm tree), in which the lowest a/b ratio occurred in individuals with greater stress, associated with a decrease in the amount of light (Nakazono *et al.*, 2001).

CONCLUSIONS

According to the total chlorophyll, chlorophyll a and chlorophyll b content, plus the a/b ratio, it was possible to determine that competition environment III (plants surrounded by genetically-similar individuals) represents a higher stress level compared to competition environment II (genetically-different individuals), based on the lower amounts of chlorophyll- a pigments and a greater amount of chlorophyll b in individuals grown in this competition environment (III).

In general, la competencia intra-familiar representa condiciones de competencia más fuerte que la inter-familiar, suponiendo un mayor nivel de estrés para las plantas con menor cantidad de luz, la cual es bloqueada por individuos contiguos que presentan mejor desarrollo bajo las mismas condiciones de competencia. Sin embargo, sería necesario un estudio más detallado que considere, separadamente, cada genotipo, además de considerar el desarrollo periódico en el crecimiento y la cantidad de radiación dentro de cada condición de competencia.

In general, intra-family competition represents stronger competition conditions than the inter-family one, assuming a higher level of stress for plants with less light, which is blocked by adjacent individuals which have better development under the same competition conditions. However, a more detailed study is needed to consider, separately, each genotype, and to consider the periodic development in the growth and the amount of radiation within each competition environment.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado con fondos de la Coordinación de la Investigación Científica (CIC) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y del proyecto de Fondos Mixtos CONACYT-Gobierno del estado de Michoacán clave 63532; y con beca-CONACYT para el primer autor. Agradecemos a Omar Champo Jiménez su apoyo en la realización de las extracciones de clorofila.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Scientific Research Office (known by the acronym CIC in Spanish) at the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo and the CONACYT-State Government of Michoacán Joint Funds project, key 63532. In addition, the lead author received a CONACYT scholarship. We thank Omar Champo Jiménez for his support in carrying out the chlorophyll extractions.

End of the English Version

LITERATURA CITADA

- ADAMS W. T.; ROBERTS, J., H.; ZOBEL, B., J. 1973. Intergenotypic interactions among families of Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.). *Theoretical and Applied Genetetic* 43: 319-322.
- BARNES, J., D.; BALAGUER, L.; MANRIQUE, E.; ELVIRA, S.; DAVISON, W. 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls-a and chlorophylls-b in lichens and higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 32: 85-100.
- JEAN-MARC B.; VIGNERON, P.; SAYA, A. 2005. Phenotypic plasticity of growth trajectory and ontogenic allometry in response to density for Eucalyptus hybrid clones and families. *Annals of Botany*. 96: 811-821. DOI: 10.1093/aob/mci231
- CARTER, G.; KNAPP, A. 2001. Leaf optical properties in higher plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration. *American Journal of Botany* 88(4): 677-684. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1989.tb01945.x
- CARTER, G.; PALIWAL, K.; PATHRE, U.; GREEN, T.; MITCHELL, R.; GJERSTAD, D. 1989. Effect of competition and leaf age on visible and infrared reflectance in pine foliage. *Plant Cell and Environment* 12(3): 309-315.
- FERREIRA, M.; MASCARENHAS, SOBRINHO, J. 1972. The introduction of Mexican pines into the region of Poços de Caldas. *IPEF Piracicaba* 4: 95-109.
- GARCÍA-BREIJO F., J.; ROSELLÓ, CASELLES, J.; SANTAMARINA-SIURANA, M., P. 2006. Introducción al funcionamiento de las plantas. Editorial: Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 181.
- GRONINGER, J., W.; SEILER, J., R.; PETERSON, J., A.; KREH, R., E. 1996. Growth and photosynthetic responses of four Virginia piedmont tree species to shade. *Tree Physiology* 16: 773-778.
- KAUFMANN, M., R.; LINDER, S. 1996. Tree physiology research in a changing world. *Tree Physiology* 16(1/2): 1-4. DOI: 10.1093/treephys/16.1-2.1
- LÓPEZ-DONATE, J., Á.; OROZCO-BAYO, E.; SÁEZ-MARTÍNEZ, J., J.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, J., J. 2000. Variaciones morfológicas y bioquímicas en la acículas de *Pinus halepensis* Mill. Tras someterse a distintas intensidades de poda. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales* 10: 133-138.
- MEDINA-CANO, C., I.; MARTÍNEZ-BUSTAMANTE, E.; LOBO-ARIAS, M.; LÓPEZ-NÚÑEZ, J., C.; RIAÑO-HERRERA, N., M. 2006. Comportamiento bioquímico y del intercambio gaseoso del Lulo (*Solanum quitoense* Lam.) a plena exposición solar en el bosque húmedo montano bajo del oriente antioqueño Colombiano. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 59(1): 3123-3146.
- MITCHEL, A., K.; ARNOTT, J., T. 1995. Effects of shade on the morphology and physiology of amabilis fir and western hemlock seedlings. *New Forests*. 10: 79-98.
- NAKAZONO, M., E.; DA COSTA, M., C.; FUTATSUGI, K.; SILVEIRA, P., M. 2001. Crescimento inicial de *Euterpe edulis* Mart. em diferentes regimes de luz. *Revista Brasileira de Botânica* 24(2): 173-179.
- NOLAND, T., L.; MOHAMMED, G., H.; WAGNER, R., G. 2001. Morphological characteristics associated with tolerance to competition from herbaceous vegetation for seedlings of jack pine, black spruce and white pine. *New Forests* 21: 199-215. DOI: 10.1023/A:1012091917395
- SAS INSTITUTE, INC. 2006. SAS / STAT Guide for Personal Computers, Version 9.1, Raleigh, North Carolina, USA. 1028 p.
- SHAFIQR, R., K.; ROBIN, R., D.; THOMAS, E., S. 2000. Effects of shade on morphology, chlorophyll concentration and chlorophyll fluorescence of four Pacific Northwest conifer species. *New Forests* 19: 171-186. DOI: 10.1023/A:1006645632023
- TOWNSEND, A., M.; HANOVER, J., W. 1972. Altitudinal variation in photosynthesis, growth, and monoterpene composition of western white pine (*Pinus monticola* Dougl.) seedlings. *Silvae Genetica* 21(3-4): 133-139.
- VERMAAS, F., W. 1998. An introduction to photosynthesis and its applications. *The World & I* 3(1): 158-165.
- WRIGTH, J., A.; WESSELS, A. 1992. Laboratory scale pulping of *Pinus pseudostrabus*, *P. maximinoi* and *P. patula*. Instituto de Pesquisas Florestais (IPEF) International, Piracicaba 2: 39-44.
- ZARCO-TEJADA, P.; MILLER, J.; HARRON, J.; HU, B.; NOLAND, T.; GOEL, N.; MOHAMMED, G.; SAMPSON, P. 2004. Needle chlorophyll content estimation through model inversion using hyperspectral data from boreal conifer forest canopies. *Remote Sensing of Environment* 89(2): 189-199. DOI: 10.1016/j.rse.2002.06.002