

# Populations of *Pinus radiata* D. Don differ in low-temperature tolerance and growth rate

## Poblaciones de *Pinus radiata* D. Don difieren en la tolerancia a bajas temperaturas y en la tasa de crecimiento

Gardenia de Jesus-Reyes<sup>1</sup>; J. Jesús Vargas-Hernández<sup>1\*</sup>; Nicacio Cruz-Huerta<sup>2</sup>; Javier López-Upton<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Postgrado en Ciencias Forestales. Carretera México- Texcoco km 36.5, Montecillo. C. P. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

<sup>2</sup>Colegio de Postgraduados, Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal. Carretera México- Texcoco km 36.5, Montecillo. C. P. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

\*Corresponding author: [vargashj@colpos.mx](mailto:vargashj@colpos.mx); tel.: 595 952 0200 ext. 1469.

### Abstract

**Introduction:** In *Pinus radiata* D. Don, one of the most widely planted pines globally, frost damages plantations at the seedling stage.

**Objective:** To determine differences in growth and tolerance to low temperatures of native populations (Guadalupe and Cedros islands) of *P. radiata* in greenhouse and outdoors conditions, under different levels of soil moisture.

**Materials and methods:** Low-temperature tolerance was determined through the damage index (DI) in freezing tests at -12 °C during 4 h. In each environment (greenhouse and outdoors) two soil moisture treatments were defined (irrigation and drought). The DI was evaluated with the method of electrical conductivity in primary needles during winter and spring. The absolute growth rate (AGR) of the terminal shoot was obtained by measuring the total height of the seedlings.

**Results and discussion:** Average DI of 50 and 64 % were obtained in winter and spring, respectively. In greenhouse, DI was different ( $P \leq 0.05$ ) between populations, being higher in Guadalupe (>59 %) than in Cedros (<42 %), both in winter and spring. Outdoors, Cedros (64.1 %) had a higher DI than Guadalupe (36.5 %) only during winter. DI was similar in both favorable soil moisture and drought conditions. The Guadalupe population presented higher AGRs in both environments and moisture conditions.

**Conclusion:** The population of Guadalupe is more sensitive to low temperatures with greater variation in DI, due to its growth dynamics. Differences between populations are useful in the genetic improvement of the species.

**Keywords:** Damage index; water stress; Cedros Island; Guadalupe Island; absolute growth rate.

### Resumen

**Introducción:** En *Pinus radiata* D. Don, uno de los pinos más plantados globalmente, las heladas dañan a las plantaciones en etapa de plántula.

**Objetivo:** Determinar las diferencias en crecimiento y tolerancia a bajas temperaturas de poblaciones nativas (islas Guadalupe y Cedros) de *P. radiata* en condiciones de invernadero e intemperie, bajo niveles distintos de humedad del suelo.

**Materiales y métodos:** La tolerancia a bajas temperaturas se determinó mediante el índice de daño (ID) en pruebas de congelamiento a -12 °C durante 4 h. En cada ambiente (invernadero e intemperie) se definieron dos tratamientos de humedad (riego y sequía). El ID se evaluó con el método de conductividad eléctrica en hojas primarias durante el invierno y primavera. La tasa absoluta de crecimiento (TAC) del brote terminal se obtuvo a través de la medición de altura total de las plantas.

**Resultados y discusión:** En invierno y primavera se obtuvo ID promedio de 50 y 64 %, respectivamente. En invernadero, el ID fue diferente ( $P \leq 0.05$ ) entre las poblaciones, siendo mayor en Guadalupe (>59 %) que en Cedros (<42 %), tanto en invierno como en primavera. En intemperie, Cedros (64.1 %) tuvo mayor ID que Guadalupe (36.5 %) solo durante el invierno. El ID fue similar tanto en el tratamiento de humedad favorable como en la sequía. La población de Guadalupe presentó TAC mayor en ambos ambientes y condiciones de humedad.

**Conclusión:** La población de Guadalupe es más sensible a las bajas temperaturas con mayor variación en el ID, debido a su dinámica de crecimiento. Las diferencias entre poblaciones son útiles en el mejoramiento genético de la especie.

**Palabras clave:** Índice de daño; estrés hídrico; isla Cedros; isla Guadalupe; tasa absoluta de crecimiento.

## Introduction

*Pinus radiata* D. Don has great global economic importance, as it is one of the most planted pines (4.1 million ha approximately), mainly in the southern hemisphere (New Zealand, Chile, Australia, Argentina and South Africa) (Rogers, Matheson, Vargas-Hernández, & Guerra-Santos, 2006). The species is located in a reduced geographical area, with a climate influenced by the cold currents of the Pacific Ocean (McDonald & Laacke, 1990). *Pinus radiata* has five native populations; three are on the west coast of California (Hoeksema, Vargas-Hernandez, Rogers, Luna-Mendoza, & Thompson, 2012) and the other two are on the Mexican islands of Guadalupe and Cedros in the state of Baja California (Rogers, 2002). These two populations have a Mediterranean climate, with extreme temperatures due to their altitude of over 290 m (Rogers, Vargas-Hernandez, Matheson, & Guerra, 2005), although their origin is drastically different; Cedros Island has a continental origin, geologically similar to the Sierra Vizcaino (Rogers et al., 2005), and Guadalupe Island is part of an archipelago of volcanic origin, formed seven million years ago, which has never had contact with the continent (Ledig, Vargas-Hernández, & Johnsen, 1998). This causes populations to differ from each other in several adaptive traits (Millar, 1999) such as growth rate and salinity tolerance (Burdon, 2001), but their level of cold tolerance is unknown (Mead, 2013).

Low temperatures and drought represent the most important environmental constraints on plant distribution (Harrison et al., 2010) and productivity (Anjum et al., 2011). Both environmental variables change with altitude (Viveros-Viveros et al., 2009), latitude, longitude (Robson, Rasztoivits, Aphalo, Alia, & Aranda, 2013) and with time of year (Charra-Vaskou, Charrier, Wortemann, & Beikircher, 2012). The negative effects that these factors have on the growth, productivity, and survival of individuals promote evolutionary adaptation and population differentiation (Blödner, Skroppa, Johnsen, & Polle, 2005; Larcher, 2005; Palacio, Milla, & Montserrat-Martí, 2005).

In *P. radiata*, early (autumn) and late (spring) frosts damage the meristematic tissues and juvenile foliage of seedlings (Greer, Robinson, Hall, Klages, & Donnison, 1998). In these periods, resistance to low temperatures varies widely, due to phenological differences in shoot growth (Neuner, 2014). Bachofen, Wohlgemuth, Ghazoul, and Moser (2016) found that cold resistance did not differ among populations of *P. sylvestris* L., *P. nigra* Arnold, and *P. halepensis* Mill., but did decline from winter to spring (February to May); in addition, drought-adapted populations of *P. sylvestris* and *P. nigra* were frost-resistant during the most sensitive phase (spring).

## Introducción

*Pinus radiata* D. Don tiene gran importancia económica global, ya que es uno de los pinos más plantados (4.1 millones de ha aproximadamente), principalmente en el hemisferio sur (Nueva Zelanda, Chile, Australia, Argentina y Sudáfrica) (Rogers, Matheson, Vargas-Hernández, & Guerra-Santos, 2006). La especie se localiza en un área geográfica reducida, con clima influenciado por las corrientes frías del océano Pacífico (McDonald & Laacke, 1990). *Pinus radiata* tiene cinco poblaciones nativas; tres de ellas están en la costa oeste de California (Hoeksema, Vargas-Hernandez, Rogers, Luna-Mendoza, & Thompson, 2012) y las otras dos en las islas mexicanas Guadalupe y Cedros del estado de Baja California (Rogers, 2002). Estas dos poblaciones son de clima mediterráneo, con temperaturas extremas por su altitud superior a los 290 m (Rogers, Vargas-Hernández, Matheson, & Guerra, 2005), aunque su origen es drásticamente diferente; isla Cedros tiene origen continental, geológicamente similar a la sierra Vizcaíno (Rogers et al., 2005), y la isla Guadalupe es parte de un archipiélago de origen volcánico, formado hace siete millones de años, el cual nunca ha tenido contacto con el continente (Ledig, Vargas-Hernández, & Johnsen, 1998). Esto hace que las poblaciones difieran entre sí en varias características adaptativas (Millar, 1999) como la tasa de crecimiento y la tolerancia a la salinidad (Burdon, 2001), pero se desconoce su nivel de tolerancia al frío (Mead, 2013).

Las bajas temperaturas y la sequía representan las restricciones ambientales más importantes en la distribución de las plantas (Harrison et al., 2010) y su productividad (Anjum et al., 2011). Ambas variables ambientales cambian con la altitud (Viveros-Viveros et al., 2009), latitud, longitud (Robson, Rasztoivits, Aphalo, Alia, & Aranda, 2013) y con la época del año (Charra-Vaskou, Charrier, Wortemann, & Beikircher, 2012). Los efectos negativos que tienen dichos factores sobre el crecimiento, productividad y supervivencia de los individuos promueven la adaptación evolutiva y la diferenciación de poblaciones (Blödner, Skroppa, Johnsen, & Polle, 2005; Larcher, 2005; Palacio, Milla, & Montserrat-Martí, 2005).

En *P. radiata*, las heladas tempranas (en otoño) y tardías (en primavera) dañan los tejidos meristemáticos y el follaje juvenil de las plántulas (Greer, Robinson, Hall, Klages, & Donnison, 1998). En estos periodos, la resistencia a bajas temperaturas varía ampliamente, debido a las diferencias fenológicas en el crecimiento del brote (Neuner, 2014). Bachofen, Wohlgemuth, Ghazoul, y Moser (2016) encontraron que la resistencia al frío no difirió entre poblaciones de *P. sylvestris* L., *P. nigra* Arnold y *P. halepensis* Mill., pero sí disminuyó de invierno a primavera (febrero a mayo); además,

Despite the temperature increase expected in the coming decades (Intergovernmental Panel on Climate Change [IPCC], 2013), climate models reveal the persistence of irregular cold extremes in winter (Kodra, Steinhäuser, & Ganguly, 2011). These abrupt changes in temperature often exceed the threshold of tolerance, inducing short- and long-term damage (Man, Lu, & Dang, 2017a; Williams, Henry, & Sinclair, 2015). Plants are more prone to freeze damage with these unexpected fluctuations (Kalcsits, Silim, & Tanino, 2009; Matusick, Ruthrof, Brouwers, & Hardy, 2014), due to phenological asynchrony with the environment (Ensminger, Hüner, & Busch, 2009; Man, Lu, & Dang, 2017b). Unusual fluctuations in temperature and humidity can generate severe stress conditions, to which natural populations are not adapted, causing negative effects on growth and survival. In this sense, the objective of the present study was to determine the differences in growth and tolerance to low temperatures in primary leaves of *P. radiata* seedlings from Cedros and Guadalupe islands, growing in two environments (greenhouse and outdoor) and different humidity conditions.

## Materials and methods

### Germplasm selection

*P. radiata* germplasm from two native populations on Cedros Island and Guadalupe Island, both in the state of Baja California, Mexico, was used. Two subpopulations were included from each population, spatially separated by latitude and altitude (Table 1).

The seed was sown in 200 mL containers, in a substrate of bark, perlite and tepezil (50:30:10) and 5 g·L<sup>-1</sup> of controlled-release fertilizer (Multicote®) with irrigation at field capacity. After six months, seedlings of homogeneous size were selected from each subpopulation for the experiment: 29.8 ± 2.3 cm in height for seedlings from Guadalupe population, and 22.4 ± 2.1 cm in height from Cedros.

las poblaciones de *P. sylvestris* y *P. nigra*, adaptadas a la sequía, resistieron a las heladas durante la fase más sensible (primavera).

A pesar del aumento de temperatura previsto en las próximas décadas (Intergovernmental Panel on Climate Change [IPCC], 2013), los modelos climáticos revelan la persistencia de fríos extremos irregulares en invierno (Kodra, Steinhäuser, & Ganguly, 2011). Estos cambios bruscos en temperatura con frecuencia rebasan el umbral de tolerancia, induciendo daños a corto y largo plazo (Man, Lu, & Dang, 2017a; Williams, Henry, & Sinclair, 2015). Las plantas son más propensas a sufrir daños por congelamiento con estas fluctuaciones inesperadas (Kalcsits, Silim, & Tanino, 2009; Matusick, Ruthrof, Brouwers, & Hardy, 2014), debido a la asincronía fenológica con el ambiente (Ensminger, Hüner, & Busch, 2009; Man, Lu, & Dang, 2017b). Las fluctuaciones inusuales en temperatura y humedad pueden generar condiciones severas de estrés, a las que no están adaptadas las poblaciones naturales, ocasionando efectos negativos en el crecimiento y supervivencia. En este sentido, el objetivo del presente estudio fue determinar las diferencias en crecimiento y tolerancia a bajas temperaturas en hojas primarias de plantas de *P. radiata* de las islas Cedros y Guadalupe, creciendo en dos ambientes (invernadero e intemperie) y condiciones distintas de humedad.

## Materiales y métodos

### Selección del germoplasma

Se utilizó germoplasma de *P. radiata* de dos poblaciones nativas en isla Cedros e isla Guadalupe, ambas del estado de Baja California, México. De cada población se incluyeron dos subpoblaciones separadas espacialmente por latitud y altitud (Cuadro 1).

La semilla se sembró en contenedores de 200 mL, en un sustrato de corteza, perlita y tepezil (50:30:10) y 5 g·L<sup>-1</sup> de fertilizante de liberación controlada

**Table 1. Geographical location of *Pinus radiata* seed sources and mean annual temperature (MAT) and precipitation (MAP) conditions on the islands.**

**Cuadro 1. Ubicación geográfica de las fuentes de semilla de *Pinus radiata* y condiciones de temperatura (TMA) y precipitación (PMA) media anual en las islas.**

| Population / Población                    | MAT <sup>1</sup> (°C) / TMA <sup>1</sup> (°C) | MAP <sup>1</sup> (mm) / PMA <sup>1</sup> (mm) | Subpopulation / Subpoblación | Latitude (N) / Latitud (N) | Length (W) / Longitud (O) | Altitude (m) / Altitud (m) |
|---|---|---|------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Cedros Island (C) / Isla Cedros (C)       | 19.9  | 85  | C <sub>1</sub>               | 28° 10.741'                | 115° 12.570'              | 519                        |
|   |   |   | C <sub>2</sub>               | 28° 15.314'                | 115° 12.883'              | 496                        |
| Guadalupe Island (G) / Isla Guadalupe (G) | 17.7  | 130   | G <sub>1</sub>               | 29° 09.357'                | 118° 18.387'              | 988                        |
|   |   |   | G <sub>2</sub>               | 29° 09.600'                | 118° 17.527'              | 710                        |

<sup>1</sup>González-Abraham, Garcillán, and Ezcurra (2010).

## Establishment of the experiment

The experiment was set up in the nursery of the Posgrado en Ciencias Forestales from Colegio de Postgraduados, Montecillo campus, in two growth environments: individual containers (greenhouse) and growth beds (outdoor). During the period December 2018 to March 2019, the average temperature was 4.7 °C higher and with less diurnal fluctuation in the greenhouse (14.8 °C with average minimum of 6.3 °C and average maximum of 24.4 °C) than outdoors (10.1 °C with average minimum of 0.4 °C and average maximum of 22.8 °C). The average relative humidity in the greenhouse was 63.3 % with an average diurnal variation of 28.8 to 98.3 %, and outdoors it was 57.3 % with an average variation of 24.6 to 93.1 %. In the greenhouse, on October 26, 2018, 96 seedlings from each subpopulation were transplanted into 10 cm diameter and 100 cm long PVC pipes containing a substrate of local agricultural soil, sand and tepezil in a 50:30:20 ratio. Outdoors, on 22 November 2018, 80 seedlings from each subpopulation were transplanted at 20 cm x 15 cm between rows and seedlings in growth beds with local agricultural soil. Two moisture treatments ( $S_0$  and  $S_1$ ) were defined in each environment based on the substrate retention curve. At the  $S_0$  level, the moisture content was maintained between 76 and 100 % of its usable moisture (40 to 47 % moisture in containers and 26 to 30 % moisture in growth beds), while at the  $S_1$  level, the moisture content in containers was maintained between 10 and 25 % of the usable moisture, and without irrigation in the growth beds, preventing the entry of water during the rainy season. In each environment a 2 x 4 factorial split-plot design was used. In the large plots the moisture treatments ( $S_0$  and  $S_1$ ) were established, and in the small ones, the subpopulations with four replications. Each experimental unit was represented by 12 seedlings in the greenhouse and 10 seedlings in the growth beds.

## Assessment of temperature damage

Based on preliminary tests (January 2019) to determine leaf type and stem position, it was decided to use three primary needles close to the apex per seedling in a sample of six seedlings randomly chosen at per experimental unit. The same seedlings were used in all tests. The needles were washed with distilled water and cut into 10-mm sections, discarding the tip and base. Each sample was separated into two parts with similar fresh weight, measured on an analytical balance (Chyo Balance Corp, precision 0.1 mg), and placed in test tubes; one part was subjected to freezing ( $F_1$ ) and the other was used as reference or control ( $F_0$ ).

The first cold-exposure test was done during the winter (6 February 2019) and the second was done in the spring

(Multicote®) con riego a capacidad de campo. A los seis meses se seleccionaron plantas de tamaño homogéneo de cada una de las subpoblaciones para el experimento: 29.8 ± 2.3 cm de altura en plantas de la población Guadalupe, y 22.4 ± 2.1 cm de altura en Cedros.

## Establecimiento del experimento

El experimento se estableció en el vivero del Posgrado en Ciencias Forestales del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo, en dos ambientes de crecimiento: contenedores individuales (invernadero) y camas de crecimiento (intemperie). Durante el periodo diciembre 2018 a marzo del 2019, la temperatura promedio fue 4.7 °C mayor y con menor fluctuación diaria en el invernadero (14.8 °C con mínima promedio de 6.3 °C y máxima promedio de 24.4 °C) con respecto a la intemperie (10.1 °C con mínima promedio de 0.4 °C y máxima promedio de 22.8 °C). La humedad relativa promedio en el invernadero fue de 63.3 % con variación diaria promedio de 28.8 a 98.3 %, y a la intemperie fue de 57.3 % con variación promedio de 24.6 a 93.1 %. En el invernadero, el 26 octubre de 2018, 96 plantas de cada subpoblación se trasplantaron a tubos de PVC de 10 cm de diámetro y 100 cm de longitud que contenían un sustrato de suelo agrícola local, arena y tepezil en proporción 50:30:20. En intemperie, el 22 noviembre de 2018, 80 plantas de cada subpoblación se trasplantaron a 20 cm x 15 cm entre hileras y plantas en camas de crecimiento con suelo agrícola local. En cada ambiente se definieron dos tratamientos de humedad ( $S_0$  y  $S_1$ ) con base en la curva de retención de los sustratos. En el nivel  $S_0$ , el contenido de humedad se mantuvo entre 76 y 100 % de su humedad aprovechable (40 a 47 % de humedad en contenedores y 26 a 30 % de humedad en camas de crecimiento), mientras que en el nivel  $S_1$ , el contenido de humedad en los contenedores se mantuvo entre 10 y 25 % de la humedad aprovechable, y sin riego en las camas de crecimiento, evitando el ingreso de agua durante la temporada de lluvias. En cada ambiente se utilizó un diseño en parcelas divididas con arreglo factorial 2 x 4. En las parcelas grandes se establecieron los tratamientos de humedad ( $S_0$  y  $S_1$ ), y en las pequeñas, las subpoblaciones con cuatro repeticiones. Cada unidad experimental estuvo representada por 12 plantas en invernadero y 10 plantas en las camas de crecimiento.

## Evaluación del daño por temperatura

Con base en pruebas preliminares (enero 2019) para determinar el tipo de hoja y su posición en el tallo, se decidió utilizar tres hojas primarias cercanas al ápice por planta, en una muestra de seis plantas elegidas al azar por unidad experimental. En todas las pruebas se utilizaron las mismas plantas. Las acículas se lavaron con agua destilada y se cortaron en secciones de 10 mm, descartando la punta y la base. Cada muestra se

(24 April 2019). On each occasion, the tubes with the  $F_i$  fraction were placed in racks inside a freezing chamber (model M1212, Manufacturas Ind. Universo, México), with automatic temperature control, and the tubes with the  $F_c$  fraction were kept at room temperature (22 to 23 °C). The  $F_i$  fractions were subjected to a routine of gradual temperature decrease in the chamber, starting with a stabilization at 4 °C for one hour and then a decrease of 2 °C per hour, during 8 h, until reaching -12 °C. The samples were kept at this temperature for 4 h and then allowed to rest until they reached 4 °C again, to start the evaluation.

The damage caused to the needles was determined with the electrical conductivity, which measures the concentration of electrolytes released by the seedling tissues after exposure to freezing temperatures (Climent, Costa e Silva, Chambel, Pardos, & Almeida, 2009). After subjecting the  $F_i$  fraction to freezing, 10 mL of deionized water was added to the two fractions ( $F_i$  and  $F_c$ ) and left to stand for 24 h at room temperature. The electrical conductivity ( $C_i$ ) was measured with a LAQUAtwin conductivity meter model EC-33. The samples were then sterilized in an autoclave at 120 °C for 15 minutes to kill the tissue and measure the total electrical conductivity ( $C_2$ ) 12 hours later. Three conductivity readings were taken for each sample every 20 minutes and the average of these was used in the damage calculations. With the electrical conductivity data standardized to a mass of 100 mg of tissue, the relative conductivity ( $R = 100 \cdot C_i / C_2$ ) of each fraction ( $R_i$  and  $R_c$ ) was calculated. The cell damage index (CDI) for each sample was calculated as  $CDI = 100 \cdot (R_i - R_c) / (100 - R_c)$ .

### Evaluation of terminal shoot growth

The absolute growth rate (AGR,  $\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$ ) of the terminal shoot was obtained by measuring the total height of the seedlings every two weeks, from 26 October in the greenhouse and from 22 November in the growth beds (outdoors), up to 8 May under both conditions. The AGR for each seedling (Arias et al., 2019) was calculated with the formula  $AGR = (A_2 - A_1) / (T_2 - T_1)$ , where  $A_1$  and  $A_2$  are the initial and final seedling height (mm), respectively, at the initial ( $T_1$ ) and final ( $T_2$ ) time of each measurement period.

### Statistical analysis

The data were subjected to an analysis of variance with the MIXED procedure in SAS 9.0 (SAS Institute, 2003), to assess the effects of soil moisture treatment and of populations and subpopulations in each environment separately, using the statistical model:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + S_j + B_i * S_j + P_k + S_j * P_k + \text{Sub}_i(P_k) + S_j * \text{Sub}_i(P_k) + E_{ijkl}$$

separó en dos partes con un peso fresco similar, medido en una balanza analítica (Chyo Balance Corp, precisión 0.1 mg), y se colocaron en tubos de ensayo; una parte se sometió a congelamiento ( $F_i$ ) y otra parte se utilizó como referencia o control ( $F_c$ ).

La primera prueba de exposición al frío se hizo durante el invierno (6 de febrero del 2019) y la segunda se realizó en primavera (24 de abril del 2019). En cada ocasión, los tubos con la fracción  $F_i$  se colocaron en gradillas dentro de una cámara de congelamiento (modelo M1212, Manufacturas Ind. Universo, México), con control automático de temperatura, y los tubos con la fracción  $F_c$  se mantuvieron a temperatura ambiente (22 a 23 °C). Las fracciones  $F_i$  se sometieron a una rutina de descenso gradual de temperatura en la cámara, iniciando con una estabilización a 4 °C durante una hora y después un descenso de 2 °C por hora, durante 8 h, hasta alcanzar -12 °C. Las muestras se mantuvieron a esta temperatura por 4 h y, posteriormente, se dejaron reposar hasta alcanzar nuevamente 4 °C, para iniciar la evaluación.

El daño ocasionado en las hojas se determinó con la conductividad eléctrica que mide la concentración de electrolitos liberados por los tejidos vegetales después de exponerse a temperaturas de congelamiento (Climent, Costa e Silva, Chambel, Pardos, & Almeida, 2009). Después de someter la fracción  $F_i$  al congelamiento, se agregaron 10 mL de agua desionizada a las dos fracciones ( $F_i$  y  $F_c$ ) y se dejaron reposar durante 24 h a temperatura ambiente. La conductividad eléctrica ( $C_i$ ) se midió con un conductímetro LAQUAtwin modelo EC-33. Después, las muestras se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 15 min, para matar el tejido y medir la conductividad eléctrica total ( $C_2$ ) 12 h después. A cada muestra se realizaron tres lecturas de conductividad cada 20 min y se utilizó el promedio de estas en los cálculos del daño ocasionado. Con los datos de conductividad eléctrica estandarizados a una masa de 100 mg de tejido, se calculó la conductividad relativa ( $R = 100 \cdot C_i / C_2$ ) de cada fracción ( $R_i$  y  $R_c$ ). El índice de daño celular (ID) para cada muestra se calculó como  $ID = 100 \cdot (R_i - R_c) / (100 - R_c)$ .

### Evaluación del crecimiento del brote terminal

La tasa absoluta de crecimiento (TAC,  $\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$ ) del brote terminal se obtuvo a través de la medición de altura total de las plantas cada dos semanas, a partir del 26 de octubre en el invernadero y del 22 de noviembre en las camas de crecimiento (intemperie), hasta el 8 de mayo en ambas condiciones. La TAC para cada planta (Arias et al., 2019) se calculó con la fórmula  $TAC = (A_2 - A_1) / (T_2 - T_1)$ , donde  $A_1$  y  $A_2$  son la altura inicial y final de la planta (mm), respectivamente, al tiempo inicial ( $T_1$ ) y final ( $T_2$ ) de cada periodo de medición.

where,

$Y_{ijkl}$  = value of the ijkl-th observation

$\mu$  = overall average

$B_i$  = block effect

$S_j$  = effect of moisture treatment

$B_i * S_j$  = effect of interaction block x moisture treatment

$P_k$  = population effect

$S_j * P_k$  = effect of interaction moisture treatment x population

$Sub_l(P_k)$  = effect of subpopulation within population

$S_j * Sub_l(P_k)$  = effect of interaction moisture treatment x subpopulation within population

$E_{ijkl}$  = experimental error.

Pearson's correlation between DI and AGR was estimated with the average DI values per subpopulation in each moisture treatment ( $n = 8$ ) and period for each environment, and the average AGR data during the measurement periods. In addition, for each moisture treatment ( $n = 16$ ), a correlation analysis between the DI and the AGR was performed with the average values per subpopulation, including the two growth environments and the two evaluation periods.

## Results and discussion

### Low-temperature damage

In winter an average DI of 50 % was obtained, while in spring it was 64 %. The DI caused by low temperatures in the tissues was similar both in favorable humidity and in drought conditions; however, significant differences ( $P < 0.05$ ) between populations were found, except in spring for the seedlings growing outdoors. At subpopulation level, only outdoor seedlings showed significant differences ( $P < 0.01$ ) during winter. In the same way, the interaction of humidity treatment\*population was significant only in spring inside the greenhouse ( $P = 0.02$ ).

Under natural conditions, *P. radiata* populations are exposed to extreme minimum temperatures of  $-5$  °C with 300 frost-free days per year (McDonald & Laacke, 1990); however, in studies conducted outside their natural environment, the foliage of seedlings under two years of age suffers deterioration when exposed to temperatures between  $-3$  and  $-6$  °C in summer and between  $-12$  and  $-14$  °C in winter (Burdon, 2001). In this study, DI in primary needles of 10 and 12-month-old seedlings was 50 and 64 %, during winter and spring, respectively, with a lethal temperature ( $TL_{50}$ ) close to  $-12$  °C. Climent et al. (2009) report a  $TL_{50}$  between  $-9$  and  $-12$  °C in 18-month-old seedlings of the same species.

### Differences between populations and subpopulations

Figure 1 shows the DI in the assessed *P. radiata* populations and subpopulations. In the greenhouse,

## Análisis estadístico

Los datos se sometieron a un análisis de varianza con el procedimiento MIXED en SAS 9.0 (SAS Institute, 2003), para evaluar los efectos del tratamiento de humedad y de las poblaciones y subpoblaciones en cada ambiente por separado, con el modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + S_j + B_i * S_j + P_k + S_j * P_k + Sub_l(P_k) + S_j * Sub_l(P_k) + E_{ijkl}$$

donde,

$Y_{ijkl}$  = valor de la ijkl-ésima observación

$\mu$  = media general

$B_i$  = efecto del bloque

$S_j$  = efecto del tratamiento de humedad

$B_i * S_j$  = efecto de la interacción bloque x tratamiento de humedad

$P_k$  = efecto de población

$S_j * P_k$  = efecto de la interacción tratamiento de humedad x población

$Sub_l(P_k)$  = efecto de subpoblación dentro de población

$S_j * Sub_l(P_k)$  = efecto de la interacción tratamiento de humedad x subpoblación dentro de población

$E_{ijkl}$  = error experimental.

La correlación de Pearson entre ID y TAC se estimó con los valores promedio de ID por subpoblación en cada tratamiento de humedad ( $n = 8$ ) y periodo por cada ambiente, y los datos promedio de TAC durante los periodos de medición. Asimismo, para cada tratamiento de humedad ( $n = 16$ ), se hizo un análisis de correlación entre ID y TAC con los valores promedio por subpoblación, incluyendo los dos ambientes de crecimiento y los dos periodos de evaluación.

## Resultados y discusión

### Daño por bajas temperaturas

En invierno se obtuvo un ID promedio de 50 %, mientras que en primavera fue 64 %. El ID ocasionado por las bajas temperaturas en los tejidos fue similar tanto en el tratamiento de humedad favorable como en la sequía; sin embargo, entre poblaciones sí se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), excepto en primavera para las plantas con crecimiento en intemperie. A nivel de subpoblaciones, solo las plantas en intemperie, durante el invierno, mostraron diferencias significativas ( $P < 0.01$ ). De la misma manera, la interacción tratamiento de humedad\* población fue significativa solo en primavera dentro del invernadero ( $P = 0.02$ ).

En condiciones naturales, las poblaciones de *P. radiata* están expuestas a temperaturas mínimas extremas de  $-5$  °C con 300 días sin heladas al año (McDonald & Laacke, 1990); sin embargo, en estudios realizados fuera

the Guadalupe island population presented higher DI in winter (59.9 %) and spring (75.0 %) than Cedros island (41.4 and 37.5 % in winter and spring, respectively); however, outdoors, higher DI was found in Cedros (64.1 %) than in Guadalupe (36.5 %) in winter, while in spring they presented similar DI. In both conditions (inside and outside the greenhouse), DI changed more from winter to spring in Guadalupe, which implies that this population has a higher seasonal or phenological sensitivity to low temperatures than Cedros.

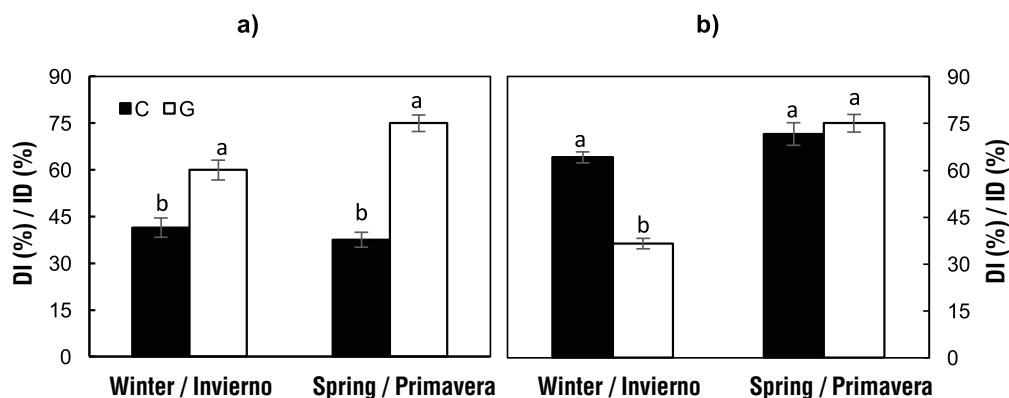
Larcher (2005) notes that differences in DI between ecotypes and between assessment periods are due to differences in physiological cold acclimatization capacity; that is, differences in carbohydrate metabolism, membrane characteristics and proteins associated with the freezing process (Pearce, 2001; Roden, Canny, Huang, & Ball, 2009). These include specific proteins that inhibit ice formation (anti-freeze proteins), reduce the rate of freezing, or protect the cellular protoplasm from the effects of temperature drop and dehydration, such as dehydrins (Ambroise et al., 2020; Larcher, 2005; Sharma & Deswal, 2014). Geographic origin has been shown to influence phenology, affecting the physiological condition of plants (Aldrete, Mexal, & Burr, 2008) and the synthesis of those molecules (Kreyling et al., 2012; Larcher, 2005). Several studies show that the two islands differ in ecological conditions, so they are considered two ecoregions (González-Abraham et al., 2010). In general, the environment on Guadalupe is more favorable in relative humidity because of the abundance of fog (Oberbauer, 2006; Perry, 2009), level of aridity and frequency of extreme temperatures (Hoeksema et al., 2012). These conditions, in addition to the geographical isolation, have differentiated the populations, to the extent that they are considered distinct varieties (Ledig

de su ambiente natural, el follaje de plántulas menores de dos años sufre deterioro al exponerse a temperaturas entre  $-3$  y  $-6$  °C en verano y entre  $-12$  y  $-14$  °C en invierno (Burdon, 2001). En este estudio, el ID en hojas primarias de plantas de 10 y 12 meses de edad fue de 50 y 64 %, durante el invierno y primavera, respectivamente, con una temperatura letal ( $TL_{50}$ ) cercana a  $-12$  °C. Climent et al. (2009) señalan una  $TL_{50}$  entre  $-9$  y  $-12$  °C en plantas de 18 meses de la misma especie.

#### Diferencias entre poblaciones y subpoblaciones

La Figura 1 muestra el ID en las poblaciones y subpoblaciones evaluadas de *P. radiata*. En el invernadero, la población de isla Guadalupe presentó mayor ID en invierno (59.9 %) y primavera (75.0 %) que la de isla Cedros (41.4 y 37.5 % en invierno y primavera, respectivamente); sin embargo, a la intemperie se encontró mayor ID en Cedros (64.1 %) que en Guadalupe (36.5 %) en invierno, mientras que en primavera presentaron ID similar. En las dos condiciones (dentro y fuera del invernadero), el ID cambió más de invierno a primavera en isla Guadalupe, lo cual implica que esta población tiene mayor sensibilidad estacional o fenológica a las bajas temperaturas que la de Cedros.

Larcher (2005) señala que las diferencias de ID entre ecotipos y entre periodos de evaluación se deben a diferencias en la capacidad fisiológica de aclimatación al frío; es decir, a diferencias en el metabolismo de los carbohidratos, las características de las membranas y las proteínas asociadas al proceso de congelamiento (Pearce, 2001; Roden, Canny, Huang, & Ball, 2009). Entre estas se incluyen proteínas específicas que inhiben la formación de hielo (proteínas anticongelantes), reducen la velocidad de congelamiento o protegen al protoplasma celular de los efectos del descenso de



**Figure 1.** Damage index (DI; mean  $\pm$  standard error) caused by low temperatures ( $-12$  °C, 4 h) on primary needles of *Pinus radiata* seedlings from Cedros (C) and Guadalupe (G) islands growing in greenhouse (a) and outdoors (b). Pairs of bars with different letters indicate statistically different DIs between populations ( $P = 0.05$ ).

**Figura 1.** Índice de daño (ID; media  $\pm$  error estándar) ocasionado por bajas temperaturas ( $-12$  °C, 4 h) en hojas primarias de plantas de *Pinus radiata* de las islas Cedros (C) y Guadalupe (G) creciendo en invernadero (a) y a la intemperie (b). Pares de barras con letras distintas indican ID estadísticamente diferente entre poblaciones ( $P = 0.05$ ).

et al., 1998; Rogers et al., 2006). In field trials, the population of Guadalupe shows greater growth and productivity than that of Cedros (Burdon, Bannister, & Low, 1992).

According to Table 2, subpopulations showed similar behavior within each population, with the exception of G<sub>2</sub> outdoors, which had a lower DI than G<sub>1</sub> in winter. In general, there is no evidence of adaptive differentiation between the subpopulations sampled on each island, despite differences in elevation, probably because there is still enough gene flow between them (Rogers, 2004). These results contrast with those described by Viveros-Viveros et al. (2009) in *P. hartwegii* Lindl. and Sáenz-Romero and Tapia-Olivares (2008) in *P. devoniana* Lindl. who found differences in DI associated with elevation of the site of origin.

### Effect of soil moisture

Figure 2 shows that soil moisture treatment affected populations differently in tolerance to low temperature damage. In the greenhouse, during the spring, the differences in damage between populations were more evident in drought than in favorable humidity conditions; moisture restriction increased slightly the DI in Guadalupe, but reduced it in Cedros. In winter, differences in the DI between populations were similar in the two moisture treatments. In seedlings exposed to weather during winter and spring, the differences in the DI between populations were not significant, regardless of the moisture treatment.

Tolerance to frost and drought have much in common; in both, the basis of tolerance lies in the ability of the protoplasm to resist the dehydrating effect of direct or indirect water deprivation (Larcher, 2000). One of the metabolic processes involved includes the synthesis or accumulation of molecules involved in the osmotic adjustment, such as soluble sugars, proline and betaine

temperatura y la deshidratación, como las deshidrinas (Ambroise et al., 2020; Larcher, 2005; Sharma & Deswal, 2014). Se ha demostrado que el origen geográfico influye en la fenología, afectando la condición fisiológica de las plantas (Aldrete, Mexal, & Burr, 2008) y la síntesis de dichas moléculas (Kreyling et al., 2012; Larcher, 2005). Varios estudios muestran que las dos islas difieren en condiciones ecológicas, por lo que se consideran dos ecorregiones (González-Abraham et al., 2010). En general, el ambiente en isla Guadalupe es más favorable en humedad relativa por la abundancia de niebla (Oberbauer, 2006; Perry, 2009), nivel de aridez y frecuencia de temperaturas extremas (Hoeksema et al., 2012). Estas condiciones, además del aislamiento geográfico, han diferenciado las poblaciones, al grado de considerarse variedades distintas (Ledig et al., 1998; Rogers et al., 2006). En ensayos de campo, la población de Guadalupe presenta mayor crecimiento y productividad que la de Cedros (Burdon, Bannister, & Low, 1992).

De acuerdo con el Cuadro 2, las subpoblaciones mostraron un comportamiento similar en cada población, con excepción de G<sub>2</sub> fuera del invernadero, la cual presentó menor ID que G<sub>1</sub> en invierno. En general, no hay evidencias de una diferenciación adaptativa entre las subpoblaciones muestreadas en cada isla, a pesar de las diferencias en elevación, debido probablemente a que todavía existe suficiente flujo genético entre ellas (Rogers, 2004). Estos resultados contrastan con los descritos por Viveros-Viveros et al. (2009) en *P. hartwegii* Lindl. y Sáenz-Romero y Tapia-Olivares (2008) en *P. devoniana* Lindl., quienes encontraron diferencias en ID asociadas a la elevación del sitio de origen.

### Efecto de la humedad del suelo

La Figura 2 muestra que el tratamiento de humedad del suelo afectó de manera diferente a las poblaciones en la tolerancia al daño por bajas temperaturas. En invernadero, durante la primavera, las diferencias

**Table 2. Damage index caused by low temperature (-12 °C, 4 h) in primary needles of seedlings from two subpopulations of *Pinus radiata* from Cedros and Guadalupe Islands.**

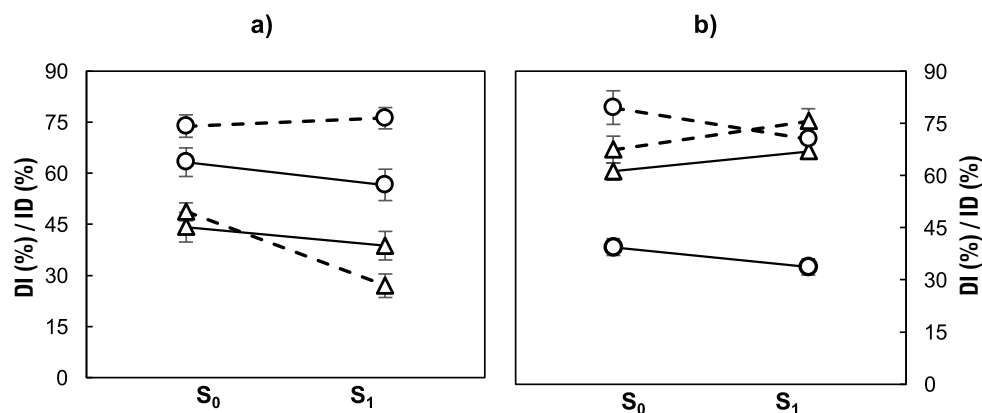
**Cuadro 2. Índice de daño ocasionado por baja temperatura (-12 °C, 4 h) en hojas primarias de plantas de dos subpoblaciones de *Pinus radiata* de las Islas Cedros y Guadalupe.**

| Population/<br>Población            | Subpopulation/<br>Subpoblación | Greenhouse/Invernadero |                  | Outdoor/Intemperie |                  |
|-------------------------------------|--------------------------------|------------------------|------------------|--------------------|------------------|
|                                     |                                | Winter/Invierno        | Spring/Primavera | Winter/Invierno    | Spring/Primavera |
| Cedros Island/<br>Isla Cedros       | C <sub>1</sub>                 | 37.3 ± 8.5 a           | 30.6 ± 5.2 a     | 64.8 ± 4.7 a       | 70.0 ± 9.7 a     |
|                                     | C <sub>2</sub>                 | 45.6 ± 8.7 a           | 44.7 ± 4.2 a     | 63.5 ± 4.8 a       | 73.3 ± 8.8 a     |
| Guadalupe Island/<br>Isla Guadalupe | G <sub>1</sub>                 | 57.5 ± 8.6 a           | 80.6 ± 6.8 a     | 49.8 ± 5.0 a       | 78.3 ± 9.6 a     |
|                                     | G <sub>2</sub>                 | 62.3 ± 9.0 a           | 68.9 ± 7.6 a     | 24.3 ± 4.3 a       | 71.9 ± 10.3 a    |

Mean ± standard error. Equal letters indicate that there are no significant differences between subpopulations ( $P = 0.05$ ).

Mean ± error estándar. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre subpoblaciones ( $P = 0.05$ ).





**Figure 2.** Soil moisture (S<sub>0</sub> = irrigation; S<sub>1</sub> = drought) and average damage index (DI) of *Pinus radiata* populations in winter (–) and spring (– –) in seedlings from Cedros (△) and Guadalupe (○) islands, growing in greenhouse (a) and outdoors (b).

**Figura 2.** Humedad del suelo (S<sub>0</sub> = riego; S<sub>1</sub> = sequía) e índice de daño (ID) promedio de las poblaciones de *Pinus radiata* en invierno (–) y primavera (– –) en plantas de las islas Cedros (△) y Guadalupe (○), creciendo en invernadero (a) y a la intemperie (b).

(Ambroise et al., 2020; Arias, Bucci, Scholz, & Goldstein, 2015; Larcher, 2005). It is conceivable that such mechanisms are activated by exposure to severe short-term droughts; therefore, a pre-frost season drought could trigger low-temperature adaptation mechanisms with less damage (Kreyling et al., 2012; Walter, Jentsch, Beierkuhnlein, & Kreyling, 2013). In the greenhouse, this effect was recorded in the two populations during the winter and in Cedar population in spring; while outdoors it only occurred in Guadalupe, regardless of the period assessed. Studies in *Quercus robur* L. (Čehulić et al., 2019; Thomas & Ahlers, 1999) and in *Q. petraea* (Matt.) Liebl. (Thomas & Ahlers, 1999) point out that drought can increase frost susceptibility by modifying growth dynamics.

### Absolute growth rate

For most measurement intervals, differences in AGR were significant ( $P \leq 0.05$ ) between treatments, between populations, and in the interaction of these factors under the two environmental conditions (Table 3). Differences between subpopulations were also found during some periods of growth in greenhouse, but not outdoors.

The seedlings in S<sub>0</sub> (irrigation) maintained a higher AGR than in S<sub>1</sub> (drought) inside and outside the greenhouse, but the growth dynamics were different in both conditions, as shown in Figure 3. In the greenhouse there were several growth cycles; from day 82 after transplanting (DAT) the effect of moisture was noted with accelerated growth at S<sub>0</sub>, while at S<sub>1</sub>, growth was reactivated until after 112 DAT, then at 142 DAT it reached a AGR similar to that of S<sub>0</sub> (2.5 mm·d<sup>-1</sup>) and, again, fell to values of 0.5 mm·d<sup>-1</sup> at 164 DAT.

de daño entre poblaciones fueron *más evidentes* en sequía que en condiciones favorables de humedad; la restricción de humedad aumentó ligeramente el ID en Guadalupe, pero lo redujo en Cedros. En el invierno, las diferencias del ID entre las poblaciones fueron similares en los dos tratamientos de humedad. En las plantas expuestas a la intemperie durante el invierno y primavera, las diferencias del ID entre poblaciones no fueron significativas, independientemente del tratamiento de humedad.

La tolerancia a las heladas y a la sequía tienen mucho en común; en ambas, la base de la tolerancia radica en la capacidad del protoplasma para resistir el efecto deshidratante de la privación directa o indirecta de agua (Larcher, 2000). Uno de los procesos metabólicos involucrados incluye la síntesis o acumulación de moléculas involucradas en el ajuste osmótico, como azúcares solubles, prolina y betaínas (Ambroise et al., 2020; Arias, Bucci, Scholz, & Goldstein, 2015; Larcher, 2005). Es concebible que dichos mecanismos se activen por la exposición a sequías severas de corta duración; por lo tanto, una sequía previa a la temporada de heladas podría desencadenar los mecanismos de adaptación a bajas temperaturas, con un menor daño (Kreyling et al., 2012; Walter, Jentsch, Beierkuhnlein, & Kreyling, 2013). En el invernadero, dicho efecto se registró en las dos poblaciones durante el invierno y en la población de Cedros en la primavera; mientras que a la intemperie solo sucedió en Guadalupe, independientemente del periodo evaluado. Estudios en *Quercus robur* L. (Čehulić et al., 2019; Thomas & Ahlers, 1999) y en *Q. petraea* (Matt.) Liebl. (Thomas & Ahlers, 1999) señalan que la sequía puede aumentar la susceptibilidad a heladas al modificar la dinámica de crecimiento.

**Table 3. Level of significance in each measurement interval ( $I_n$ ) of the absolute growth rate ( $\text{mm}\cdot\text{d}^{-1}$ ) in shoot length of two *Pinus radiata* populations. The seedlings were subjected to two moisture treatments in greenhouse and outdoors.**

**Cuadro 3. Nivel de significancia en cada intervalo de medición ( $I_n$ ) de la tasa absoluta de crecimiento ( $\text{mm}\cdot\text{d}^{-1}$ ) en longitud del tallo de dos poblaciones de *Pinus radiata*. Las plantas fueron sometidas a dos tratamientos de humedad en invernadero y a la intemperie.**

| Setting/<br>Ambiente       | Factor   | GL | DF | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $I_4$ | $I_5$ | $I_6$ | $I_7$ | $I_8$ | $I_9$ | $I_{10}$ | $I_{11}$ |
|----------------------------|----------|----|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|----------|
| Greenhouse/<br>Invernadero | T        | 1  | 3  | *     | **    | ns    | ns    | *     | **    | **    | *     | ns    | *        | *        |
|                            | P        | 1  | 18 | **    | **    | **    | **    | **    | **    | *     | *     | **    | *        | *        |
|                            | TxP      | 1  | 18 | *     | *     | *     | ns    | **    | *     | *     | *     | ns    | **       | *        |
|                            | $S_p$    | 2  | 18 | ns    | ns    | ns    | *     | *     | ns    | *     | *     | ns    | ns       | *        |
|                            | Tx $S_p$ | 2  | 18 | ns    | ns    | ns    | ns    | ns    | ns    | ns    | ns    | ns    | *        | ns       |
| Outdoor/<br>Intemperie     | T        | 1  | 3  | -     | -     | *     | *     | *     | **    | **    | **    | **    | **       | *        |
|                            | P        | 1  | 18 | -     | -     | **    | *     | *     | **    | **    | **    | *     | *        | *        |
|                            | TxP      | 1  | 18 | -     | -     | ns    | ns    | *     | *     | *     | *     | *     | *        | *        |
|                            | $S_p$    | 2  | 18 | -     | -     | ns    | ns    | ns    | *     | ns    | ns    | ns    | ns       | ns       |
|                            | Tx $S_p$ | 2  | 18 | -     | -     | ns    | ns    | ns    | ns    | ns    | ns    | *     | ns       | ns       |

T = moisture treatment, P = population, SP = subpopulation within population; GL = degrees of freedom of the numerator (factor); DF = degrees of freedom of the denominator (error);  $I_n$  = two-week interval from 26 October 2018 to 08 May 2019. \*significant with  $P = 0.05$  \*\*significant with  $P = 0.01$ ; ns = not significant.

T = tratamiento de humedad, P = población,  $S_p$  = subpoblación dentro de población; GL = grados de libertad del numerador (factor); DF = grados de libertad del denominador (error);  $I_n$  = intervalo de dos semanas a partir del 26 de octubre del 2018 al 08 de mayo del 2019. \*significativo con  $P = 0.05$  \*\*significativo con  $P = 0.01$ ; ns = no significativo.

Outdoors, plants in  $S_1$  maintained a slow growth phase ( $\text{AGR} < 1.0 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ ) during the whole experiment, while in  $S_0$  they presented a low AGR only during the first part of winter, since at 89 DAT they reactivated growth until reaching a maximum AGR of  $2.5 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$  at 133 DAT.

*P. radiata* is a polycyclic species that has evolved in a Mediterranean climate influenced by coastal humidity; in the juvenile stage, the species is adapted to grow all year round when the climate is suitable (Mead, 2013), but its growth dynamics is very sensitive to changes in soil moisture (Figure 3) and air temperature. In greenhouse, shoot growth never stopped and terminal bud formation was not observed, as it is in most temperate-cold pine species (Jansons, Matisons, Libiete-Zālite, Baders, & Rieksts-Riekstiņš, 2013; Mead, 2013).

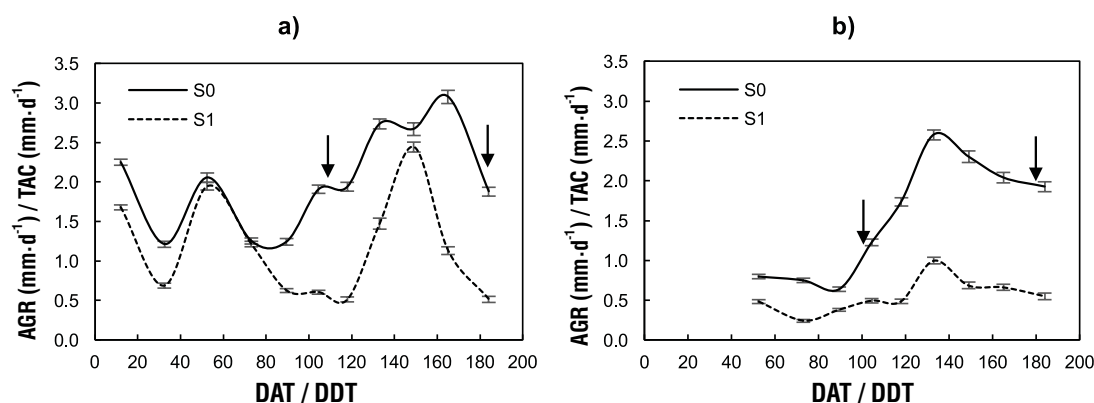
The different dynamics of shoot growth in seedlings and outside the greenhouse show sensitivity to changing environmental conditions. Outdoor seedlings were more exposed to low temperatures during winter (average minimum of  $0.4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). This phenological variability in the shoot growth pattern, in response to changes in humidity and temperature, shows the complexity of cold tolerance in *P. radiata*, compared with other monocyclic growth pines such as *P. pseudostrobus* Lindl., *P. montezumae* Lamb. and *P. hartwegii* (Viveros-Viveros, Saenz-Romero, Lopez-Upton, & Vargas-Hernandez, 2007). Climent et al. (2009) and Bachofen et al. (2016) mention that it is more complex to interpret frost damage in pines of Mediterranean coastal climate, with multiple growth

### Tasa absoluta de crecimiento

En la mayoría de los intervalos de medición, las diferencias en la TAC fueron significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre tratamientos, entre poblaciones y en la interacción de estos factores en las dos condiciones ambientales (Cuadro 3). Entre subpoblaciones también se encontraron diferencias durante algunos periodos de crecimiento en invernadero, pero no en intemperie.

Las plantas en  $S_0$  (riego) mantuvieron una TAC mayor que en  $S_1$  (sequía) dentro y fuera del invernadero, pero la dinámica de crecimiento fue distinta en ambas condiciones, tal como se observa en la Figura 3. En el invernadero se presentaron varios ciclos de crecimiento; a partir del día 82 después del trasplante (DDT) se notó el efecto de la humedad con un crecimiento acelerado en  $S_0$ , mientras que en  $S_1$ , el crecimiento se reactivó hasta después de 112 DDT, luego a los 142 DDT alcanzó una TAC similar a la de  $S_0$  ( $2.5 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ ) y, nuevamente, descendió a valores de  $0.5 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$  a los 164 DDT. A la intemperie, las plantas en  $S_1$  mantuvieron una fase de crecimiento lento ( $\text{TAC} < 1.0 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ ) durante todo el experimento, mientras que en  $S_0$  presentaron una TAC baja solo la primera parte del invierno, ya que a los 89 DDT reactivaron el crecimiento hasta alcanzar una TAC máxima de  $2.5 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$  a los 133 DDT.

*Pinus radiata* es una especie policíclica que ha evolucionado en un clima mediterráneo con influencia de la humedad costera; en la etapa juvenil, la especie



**Figure 3.** Absolute growth rate (AGR) of shoot length in greenhouse (a) and outdoors (b) by moisture treatment (S<sub>0</sub> = irrigation; S<sub>1</sub> = drought). DAT: Days after transplanting in greenhouse; (↓) dates when damage index was determined.

**Figura 3.** Tasa absoluta de crecimiento (TAC) de la longitud del tallo en invernadero (a) y a la intemperie (b) por tratamiento de humedad (S<sub>0</sub> = riego; S<sub>1</sub> = sequía). DDT: Días después del trasplante en invernadero; (↓) fechas en que se determinó el índice de daño.

cycles and more sensitive to humidity and temperature fluctuations, such as *P. radiata*, than in species of continental alpine origin.

The Guadalupe population had higher AGR than Cedros in both environments, but the differences and the maximum peaks (2.6 mm·d<sup>-1</sup> outdoors and 3.2 mm·d<sup>-1</sup> in greenhouse) were greater in greenhouse (Figures 4a and 4b). Only Cedros subpopulations differed in AGR, especially in greenhouse (Figures 4c and 4d), since in Guadalupe subpopulations AGR was similar between them in both environments (Figures 4e and 4f). The differences in AGRs between populations can be attributed to genetic differences associated with the ecological conditions of the islands. Burdon et al. (1992) point out that, at the age of 12, the Cedros population had a lower rate of height growth than the Guadalupe population.

#### Relationship between DI and AGR

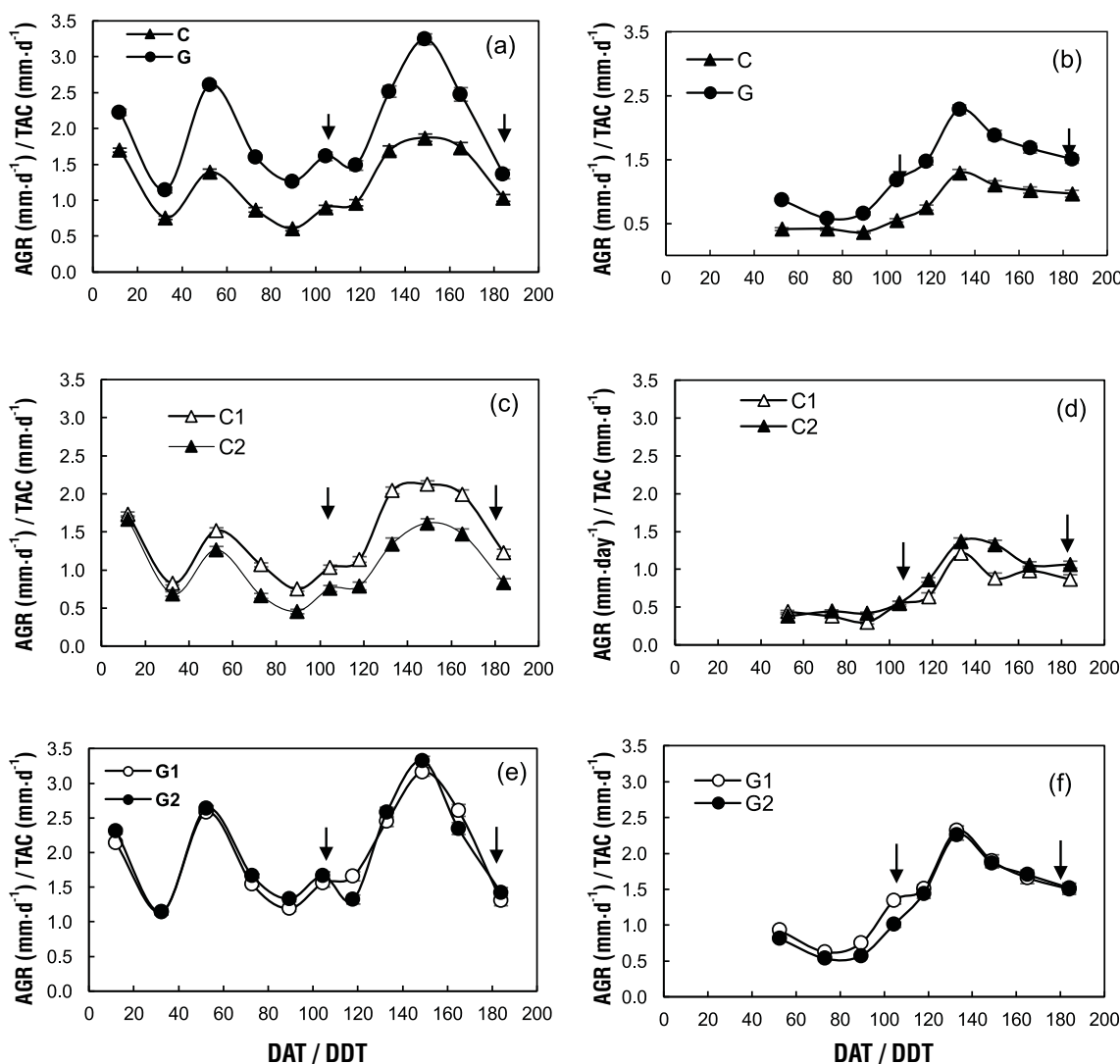
According to Figure 5, the correlation of DI with AGR was positive, but relatively low ( $r < 0.50$ ). The highest correlations were obtained in winter ( $r \geq 0.46$ ), regardless of the growing environment; in contrast, in spring, the correlation was lower ( $0.25 \leq r \leq 0.28$ ). Although the AGR was not clearly related to DI, the positive sign of the correlation indicates that seedlings with higher meristemic activity are more susceptible to low-temperature damage, as has been demonstrated in other conifers (Floistad & Granhus, 2010; Sogaard, Granhus, & Johnsen, 2009). The positive relationship between DI and AGR was more evident in favorable wet conditions than in dry conditions.

When the correlation analysis was done for each moisture treatment ( $n = 16$ ), the correlation was higher

está adaptada para crecer todo el año cuando el clima es adecuado (Mead, 2013), pero su dinámica de crecimiento es muy sensible a los cambios en humedad del suelo (Figura 3) y temperatura del aire. En invernadero, el crecimiento del brote nunca cesó y no se observó la formación de una yema terminal, como ocurre en la mayoría de las especies de pino de clima templado-frío (Jansons, Matisons, Libiete-Zālite, Baders, & Rieksts-Riekstiņš, 2013; Mead, 2013).

La diferente dinámica de crecimiento del brote en las plantas dentro y fuera del invernadero muestra sensibilidad al cambio de las condiciones ambientales. Las plantas a la intemperie estuvieron más expuestas a bajas temperaturas durante el invierno (mínima promedio de 0.4 °C). Esta variabilidad fenológica en el patrón de crecimiento del brote, ante los cambios en humedad y temperatura, muestran la complejidad de la tolerancia de *P. radiata* al frío, en comparación con otros pinos de crecimiento monocíclico como *P. pseudostrobus* Lindl., *P. montezumae* Lamb. y *P. hartwegii* (Viveros-Viveros, Sáenz-Romero, López-Upton, & Vargas-Hernández, 2007). Climent et al. (2009) y Bachofen et al. (2016) mencionan que es más complejo interpretar el daño por heladas en pinos de clima mediterráneo costero, con múltiples ciclos de crecimiento y más sensibles a las fluctuaciones de humedad y temperatura, como *P. radiata*, que en especies de origen continental alpino.

La población de Guadalupe presentó una TAC mayor que la de Cedros en los dos ambientes, pero las diferencias y los picos máximos (2.6 mm·d<sup>-1</sup> en intemperie y 3.2 mm·d<sup>-1</sup> en invernadero) fueron mayores en invernadero (Figuras 4a y 4b). Solo en las subpoblaciones de Cedros se encontraron diferencias en TAC, especialmente en invernadero (Figuras 4c



**Figure 4.** Absolute growth rate (AGR; mm·d<sup>-1</sup>) of shoot length of *Pinus radiata* of populations (a, b) and subpopulations (c, d, e, f) from Cedros (C) and Guadalupe (G) islands, under greenhouse (a, c, e) and outdoor (b, d, f) conditions. DAT: Days after greenhouse transplanting; (↓) dates when damage index was determined.

**Figura 4.** Tasa absoluta de crecimiento (TAC; mm·d<sup>-1</sup>) de la longitud del tallo de *Pinus radiata* de las poblaciones (a, b) y subpoblaciones (c, d, e, f) nativas de las islas Cedros (C) y Guadalupe (G) en condiciones de invernadero (a, c, e) e intemperie (b, d, f). DDT: Días después del trasplante en invernadero; (↓) fechas en que se determinó el índice de daño.

at  $S_0$  than at  $S_1$  (Figure 6). The correlation increases ( $r = 0.77$ ) if only data from Guadalupe subpopulations are considered ( $n = 8$ ) or if the data from the two Cedros subpopulations in winter ( $n = 14$ ) are excluded, because their seedlings practically did not grow in this period. Drought drastically reduced the AGR and altered the relationship between DI and AGR. This explains, in part, the differences observed in DI between populations regarding the rate and seasonal dynamics of shoot growth inside and outside the greenhouse. The Cedros stock has lower intrinsic AGR than Guadalupe and also shows higher tolerance to frost damage, results that are consistent with previous information (Mead, 2013). The greater sensitivity of Guadalupe population to the effect

and 4d), ya que en las de Guadalupe, la TAC fue similar entre ellas, en los dos ambientes (Figuras 4e y 4f). Las diferencias en TAC entre poblaciones pueden atribuirse a diferencias genéticas asociadas a las condiciones ecológicas de las islas. Burdon et al. (1992) señalan que, a los 12 años, la población de Cedros presentó menor tasa de crecimiento en altura que la de Guadalupe.

#### Relación entre ID y TAC

Acorde con la Figura 5, la correlación de ID con TAC fue positiva, pero relativamente baja ( $r < 0.50$ ). Las correlaciones más altas se obtuvieron en invierno ( $r \geq 0.46$ ), independientemente del ambiente de crecimiento;

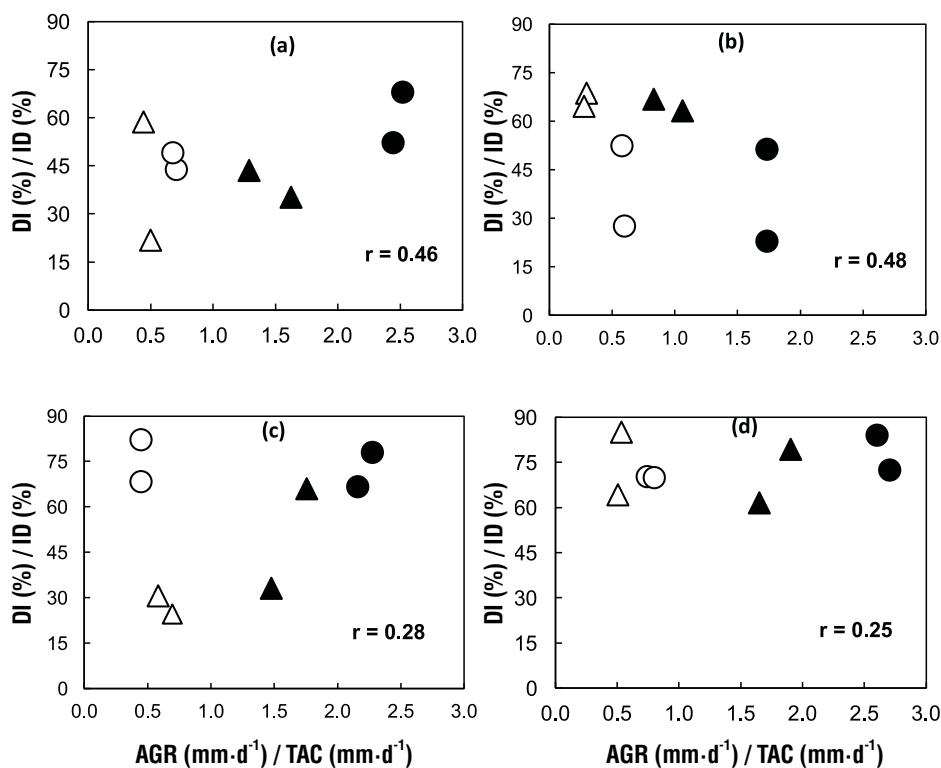


Figure 5. Correlation between the damage index (DI) in primary needles and the absolute growth rate (AGR) in winter (a and b) and spring (c and d) in *Pinus radiata* seedlings from the Cedros (triangles) and Guadalupe (circles) islands with favorable soil moisture (black) and drought (white), under greenhouse (a and c) and (b and d) outdoor conditions.

Figura 5. Correlación entre el índice de daño (ID) en hojas primarias y la tasa absoluta de crecimiento (TAC) en invierno (a y b) y primavera (c y d) en plantas de *Pinus radiata* de las islas Cedros (triángulos) y Guadalupe (círculos) con humedad del suelo favorable (negro) y sequía (blanco), en condiciones de invernadero (a y c) y a la intemperie (b y d).

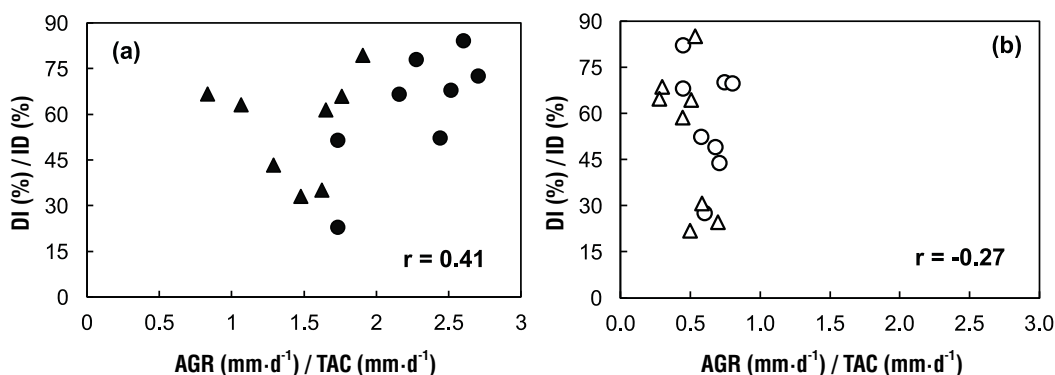


Figure 6. Correlation between damage index (DI) in primary needles and absolute growth rate (AGR) in *Pinus radiata* seedlings from Cedros Island (triangles) and Guadalupe Island (circles) with favorable soil moisture (a) and drought (b).

Figura 6. Correlación entre el índice de daño (ID) en hojas primarias y la tasa absoluta de crecimiento (TAC) en plantas de *Pinus radiata* de isla Cedros (triángulos) e isla Guadalupe (círculos) con humedad del suelo favorable (a) y sequía (b).

of soil moisture in DI (Figure 2) and in the shoot growth dynamics (Figure 5) implies that there are important differences between populations in the response and adaptation mechanisms to water stress, as a result of local adaptation processes on the islands where they have evolved.

en cambio en primavera, la correlación fue más baja ( $0.25 \leq r \leq 0.28$ ). A pesar de que la TAC no tuvo relación clara con el ID, el signo positivo de la correlación indica que las plantas con mayor actividad meristemática son más susceptibles a daños por bajas temperaturas, tal como se ha demostrado en otras coníferas (Fløistad & Granhus,

## Conclusions

The populations of *Pinus radiata* on Cedros and Guadalupe Islands differ markedly in their tolerance to low temperatures and in the rate and dynamics of shoot growth inside and outside the greenhouse. The population of Guadalupe island is more sensitive in the damage index (DI) as a function of the environment, due to the changes in its growth dynamics when conditions change. The population of Cedros island had a lower growth rate and lower DI, due to its adaptation to the more adverse environment in which it has evolved. There is a positive relationship between DI and absolute growth rate, especially in favorable soil moisture conditions. The differences in productivity and tolerance to low temperatures of these populations are very useful in the domestication of *P. radiata* in the current context of climate change, so the efforts of *in situ* conservation of these genetic resources become more relevant.

## Acknowledgements

To the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the financial support granted to Gardenia de Jesús-Reyes during her Master of Science program at the Colegio de Postgraduados.

### Ed of English version

## References / Referencias

- Aldrete, A., Mexal, J. G., & Burr, K. E. (2008). Seedling cold hardiness, bud set, and bud break in nine provenances of *Pinus greggii* Engelm. *Forest Ecology and Management*, 255(11), 3672–3676. doi: 10.1016/j.foreco.2008.02.054
- Ambroise, V., Legay, S., Guerriero, G., Hausman, J.-F., Cuypers, A., & Sergeant, K. (2020). The roots of plant frost hardiness and tolerance. *Plant Cell Physiology*, 61(1), 3–20. doi: 10.1093/pcp/pcz196
- Anjum, S. A., Xie, X. Y., Wang, L. C., Saleem, M. F., Man, C., & Lei, W. (2011). Morphological, physiological, and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6(9), 2026–2032. doi: 10.5897/AJAR10.027
- Arias, N. S., Bucci, S. J., Scholz, F. G., & Goldstein, G. (2015). Freezing avoidance by supercooling in *Olea europaea* cultivars: the role of apoplastic water, solute content and cell wall rigidity. *Plant, Cell and Environment*, 38(10), 2061–2070. doi: 10.1111/pce.12529
- Arias, R. C., Reyes, J. J., Ray, J. V., Benítez, D. G., Hernández, L. G., & Ledea, J. L. (2019). Indicadores morfométricos en nuevas variedades megatérmicas de *Cenchrus purpureus* tolerantes al estrés hídrico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 22(1), 115–125. Retrieved from <http://www.revista.ccauady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/2784/1223>

2010; Sogaard, Granhus, & Johnsen, 2009). La relación positiva entre ID y TAC fue más evidente en condiciones favorables de humedad que en condiciones de sequía.

Cuando el análisis de correlación se hizo por cada tratamiento de humedad ( $n = 16$ ), la correlación fue mayor en  $S_0$  que en  $S_1$  (Figura 6). La correlación aumenta ( $r = 0.77$ ) si se consideran solo los datos de las subpoblaciones de Guadalupe ( $n = 8$ ) o si se excluyen los datos de las dos subpoblaciones de Cedros en invierno ( $n = 14$ ), debido a que sus plantas prácticamente no crecieron en este periodo. La sequía redujo drásticamente la TAC y alteró la relación entre ID y TAC. Esto explica, en parte, las diferencias observadas en ID entre las poblaciones con respecto a la tasa y dinámica estacional de crecimiento del brote dentro y fuera del invernadero. La población Cedros tiene una TAC intrínseca menor que Guadalupe y también muestra una mayor tolerancia a daños por heladas, resultados que coinciden con información previa (Mead, 2013). La mayor sensibilidad de la población Guadalupe al efecto de la humedad del suelo en ID (Figura 2) y en la dinámica de crecimiento del brote (Figura 5) implica que hay diferencias importantes entre poblaciones en los mecanismos de respuesta y adaptación al estrés hídrico, como resultado de los procesos de adaptación local en las islas donde han evolucionado.

## Conclusiones

Las poblaciones de *Pinus radiata* en isla Cedros e isla Guadalupe difieren notoriamente en la tolerancia a bajas temperaturas y en la tasa y dinámica de crecimiento del brote dentro y fuera del invernadero. La población de isla Guadalupe es más sensible en el índice de daño (ID) en función del ambiente, debido a los cambios en su dinámica de crecimiento cuando las condiciones se modifican. La población de isla Cedros tuvo menor tasa de crecimiento y menor ID, debido a su adaptación al ambiente más adverso en que ha evolucionado. Existe relación positiva entre ID y la tasa absoluta de crecimiento, especialmente en condiciones favorables de humedad del suelo. Las diferencias en productividad y tolerancia a bajas temperaturas de estas poblaciones son de gran utilidad en la domesticación de *P. radiata* en el contexto actual de cambio climático, por lo que los esfuerzos de conservación *in situ* de estos recursos genéticos adquieren mayor relevancia.

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de apoyo económico otorgado a Gardenia de Jesús-Reyes durante su programa de Maestría en Ciencias en el Colegio de Postgraduados.

Fin de la versión en español

- Bachofen, C., Wohlgemuth, T., Ghazoul, J., & Moser, B. (2016). Cold temperature extremes during spring do not limit the range shift of Mediterranean pines into regions with intermittent frost. *Functional Ecology*, 30(6), 856–865. doi: 10.1111/1365-2435.12581
- Blödner, C., Skroppa, T., Johnsen, O., & Polle, A. (2005). Freezing tolerance in two Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) progenies is physiologically correlated with drought tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 162(5), 549–558. doi: 10.1016/j.jplph.2004.09.005
- Burdon, R. D. (2001). *Pinus radiata*. In F. T. Last. (Ed.), *Ecosystems of the world. Tree crop ecosystems* (vol. 19, pp. 99–161). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Burdon, R. D., Bannister, M. H., & Low, C. B. (1992). Genetic survey of *Pinus radiata*. 2: Population comparisons for growth rate, disease resistance, and morphology. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 22(2/3), 138–159. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/288957107\\_Genetic\\_survey\\_of\\_Pinus\\_radiata\\_2\\_Population\\_comparisons\\_for\\_growth\\_rate\\_disease\\_resistance\\_and\\_morphology](https://www.researchgate.net/publication/288957107_Genetic_survey_of_Pinus_radiata_2_Population_comparisons_for_growth_rate_disease_resistance_and_morphology)
- Čehulić, I., Sever, K., Bogdan, I., Jazbec, A., Škvorc, Ž., & Bogdan, S. (2019). Drought impact on leaf phenology and spring frost susceptibility in a *Quercus robur* L. provenance trial. *Forests*, 10(1), 50. doi: 10.3390/f10010050
- Charra-Vaskou, K., Charrier, G., Wortemann, R., & Beikircher, B. (2012). Drought and frost resistance of trees: A comparison of four species at different sites and altitudes. *Annals of Forest Science*, 69(3), 325–333. doi: 10.1007/s13595-011-0160-5
- Climent, J., Costa e Silva, F., Chambel, M. R., Pardos, M., & Almeida, M. H. (2009). Freezing injury in primary and secondary needles of Mediterranean pine species of contrasting ecological niches. *Annals of Forest Science*, 66(4), 407–407. doi: 10.1051/forest/2009016
- Ensminger, I., Hüner, N. P. A., & Busch, F. (2009). Conifer cold hardiness, climate change and the likely effects of warmer temperatures on photosynthesis. In L. V. Gusta, M. E. Wisniewski, & K. K. Tanino (Eds.), *Plant cold hardiness. From the laboratory to the field* (pp. 249–261). London, UK: CAB International.
- Floistad, I. S., & Granhus, A. (2010). Bud break and spring frost hardiness in *Picea abies* seedlings in response to photoperiod and temperature treatments. *Canadian Journal of Forest Research*, 40(5), 968–976. doi: 10.1139/X10-050
- González-Abraham, C. E., Garcillán, P. P., & Ezcurra, E. (2010). Ecorregiones de la península de Baja California: una síntesis. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 87, 69–82. doi: 10.17129/botsoci.302
- Greer, D. H., Robinson, L. A., Hall, A. J., Klages, K., & Donnison, H. (1998). Frost hardening of *Pinus radiata* seedlings: effects of temperature on relative growth rate, carbon balance and carbohydrate concentration. *Tree Physiology*, 20(2), 107–114. doi: 10.1093/treephys/20.2.107
- Harrison, S. P., Prentice, I. C., Barboni, D., Kohfeld, K. E., Ni, J., & Sutra, J.-P. (2010). Ecophysiological and bioclimatic foundations for a global plant functional classification. *Journal of Vegetation Science*, 21(2), 300–317. doi: 10.1111/j.1654-1103.2009.01144.x
- Hoeksema, J. D., Vargas-Hernández, J. J., Rogers, D. L., Luna-Mendoza, L., & Thompson, J. N. (2012). Geographic divergence in a species-rich symbiosis: interactions between Monterey pines and ectomycorrhizal fungi. *Ecology*, 93(10), 2274–2285. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/233786825\\_Geographic\\_divergence\\_in\\_a\\_species-rich\\_symbiosis\\_Interactions\\_between\\_Monterey\\_pines\\_and\\_ectomycorrhizal\\_fungi](https://www.researchgate.net/publication/233786825_Geographic_divergence_in_a_species-rich_symbiosis_Interactions_between_Monterey_pines_and_ectomycorrhizal_fungi)
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). (2013). *Climate Change 2013: The physical science basis. Working group I contribution to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. In T. F. Stocker, D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, ...P. M. Midgley (Eds.). Cambridge, UK and New York, USA: Cambridge University Press.
- Jansons, A., Matisons, R., Libiete-Zālīte, Z., Baders, E., & Rieksts-Riekstiņš, J. (2013). Relationships of height growth of Lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia*) and Scots pine (*Pinus sylvestris*) with climatic factors in Zvirgzde, Latvia. *Baltic Forestry*, 19(2), 236–244. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/286021721\\_Relationships\\_of\\_Height\\_Growth\\_of\\_Lodgepole\\_Pine\\_Pinus\\_contorta\\_var\\_latifolia\\_and\\_Scots\\_Pine\\_Pinus\\_sylvestris\\_with\\_Climatic\\_Factors\\_in\\_Zvirgzde\\_Laivia](https://www.researchgate.net/publication/286021721_Relationships_of_Height_Growth_of_Lodgepole_Pine_Pinus_contorta_var_latifolia_and_Scots_Pine_Pinus_sylvestris_with_Climatic_Factors_in_Zvirgzde_Laivia)
- Kalcsits, L., Silim, S., & Tanino, K. (2009). The influence of temperature on dormancy induction and plant survival in woody plants In L. V. Gusta, M. E. Wisniewski, & K. K. Tanino (Eds.), *Plant cold hardiness. From the laboratory to the field* (pp. 249–261). London, UK: CAB International.
- Kodra, E., Steinhäuser, K., & Ganguly, A. R. (2011). Persisting cold extremes under 21st-century warming scenarios. *Geophysical Research Letters*, 38(8), 1–5. doi: 10.1029/2011GL047103
- Kreyling, J., Wiesenberger, G. L. B., Thiel, D., Wohlfart, C., Huber, G., Walter, J., & Beierkuhnlein, C. (2012). Cold hardiness of *Pinus nigra* Arnold as influenced by geographic origin, warming, and extreme summer drought. *Environmental and Experimental Botany*, 78, 99–108. doi: 10.1016/j.envexpbot.2011.12.026
- Larcher, W. (2000). Temperature stress and survival ability of Mediterranean sclerophyllous plants. *Plant Biosystems*, 134(3), 279–295. doi: 10.1080/11263500012331350455
- Larcher, W. (2005). Climatic constraints drive the evolution of low temperature resistance in woody plants. *Journal of Agricultural Meteorology*, 61(4), 189–202. doi: 10.2480/agrmet.61.189
- Ledig, T., Vargas-Hernández, J. J., & Johnsen, K. H. (1998). The conservation of forest genetic resources: case histories from Canada, Mexico, and the United States. *Journal of Forestry*, 96(1), 32–41. doi: 10.1093/jof/96.1.32
- Man, R., Lu, P., & Dang, Q.-L. (2017a). Cold hardiness of white spruce, black spruce, jack pine, and lodgepole pine needles during dehardening. *Canadian Journal of Forest Research*, 47(8), 1116–1122. doi: 10.1139/cjfr-2017-0119
- Man, R., Lu, P., & Dang, Q.-L. (2017b). Insufficient chilling effects vary among boreal tree species and chilling duration. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1354. doi: 10.3389/fpls.2017.011354

- Matusick, G., Ruthrof, K. X., Brouwers, N. C., & Hardy, G. St. J. (2014). Topography influences the distribution of autumn frost damage on trees in a Mediterranean-type *Eucalyptus* forest. *Trees*, 28, 1449–1462. doi: 10.1007/s00468-014-1048-4
- McDonald, P. M., & Laacke, R. J. (1990). *Pinus radiata* D. Don Monterey Pine. In R. M. Burns & B. H. Honkala (Eds.), *The silvics of North America. Conifers* (vol. 1, pp. 433–441). Washington, DC, USA: US Forest Service.
- Mead, D. J. (2013). *Sustainable management of Pinus radiata plantations*. Rome: FAO doi: 10.13140/2.1.5173.0885
- Millar, C. I. (1999). Evolution and biogeography of *Pinus radiata*, with a proposed revision of its Quaternary history. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 29(3), 335–365. Retrieved from [https://www.fs.fed.us/psw/publications/millar/captured/psw\\_1999\\_millar011.pdf](https://www.fs.fed.us/psw/publications/millar/captured/psw_1999_millar011.pdf)
- Neuner, G. (2014). Frost resistance in alpine woody plants. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1–13. doi: 10.3389/fpls.2014.00654
- Oberbauer, T. A. (2006). La vegetación de Isla Guadalupe, entonces y ahora. *Gaceta Ecológica*, 81, 47–58. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/539/53908104.pdf>
- Palacio, S., Milla, R., & Montserrat-Martí, G. (2005). A phenological hypothesis on the thermophilous distribution of *Pistacia lentiscus* L. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 200(6), 527–534. doi: 10.1016/j.flora.2005.06.004
- Pearce, R. (2001). Plant freezing and damage. *Annals of Botany*, 87(4), 417–424. doi: 10.1006/anbo.2000.1352
- Perry, J. P. (2009). *The pines of México and Central America*. Portland, Oregon: Timber Press.
- Robson, T. M., Rasztoivits, E., Aphalo, P. J., Alia, R., & Aranda, I. (2013). Flushing phenology and fitness of European beech (*Fagus sylvatica* L.) provenances from a trial in La Rioja, Spain, segregate according to their climate of origin. *Agricultural and Forest Meteorology*, 180, 76–85. doi: 10.1016/j.agrformet.2013.05.008
- Roden, J. S., Canny, M. J., Huang, C. X., & Ball, M. C. (2009). Frost tolerance and ice formation in *Pinus radiata* needles: ice management by the endodermis and transfusion tissues. *Functional Plant Biology*, 36(2), 180–189. doi:10.1071/fp08247
- Rogers, D. L. (2002). *In situ genetic conservation of Monterey pine (Pinus radiata D. Don): Information and recommendations*. USA: Division of Agriculture and Natural Resources, Genetic Resources Conservation Program.
- Rogers, D. L. (2004). *In situ genetic conservation of a naturally restricted and commercially widespread species, Pinus radiata*. *Forest Ecology and Management*, 197(1-3), 311–322. doi: 10.1016/j.foreco.2004.05.022
- Rogers, D. L., Matheson, A. C., Vargas-Hernández, J. J., & Guerra-Santos, J. J. (2006). Genetic conservation of insular populations of Monterey pine (*Pinus radiata* D. Don). *Biodiversity & Conservation*, 15(2), 779–798. doi: 10.1007/s10531-004-1066-4
- Rogers, D. L., Vargas-Hernández, J. J., Matheson, A. C., & Guerra, S. J. J. (2005). Conserving the pines of Guadalupe and Cedros Islands, Mexico: an international collaboration. In A. Romero & S. E. West (Eds.), *Environmental issues in Latin America and the Caribbean* (pp. 31–54). Dordrecht, The Netherlands: Springer. doi: 10.1007/1-4020-3774-0\_2
- Sáenz-Romero, C., & Tapia-Olivares, B. L. (2008). Genetic variation in frost damage and seed zone delineation within an altitudinal transect of *Pinus devoniana* (*P. michoacana*) in Mexico. *Silvae Genetica*, 57(1-6), 165–170. doi: 10.1515/sg-2008-0025
- SAS Institute. (2003). *The SAS System for Windows 9.0*. Cary, NC, USA: Author.
- Sharma, B., & Deswal, R. (2014). Antifreeze proteins in plants: an overview with an insight into the detection techniques including nanobiotechnology. *Journal of Proteins and Proteomics*, 5(2), 89–107. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/268742011\\_Antifreeze\\_Proteins\\_in\\_Plants\\_An\\_overview\\_with\\_an\\_insight\\_into\\_the\\_detection\\_techniques\\_including\\_nanobiotechnology](https://www.researchgate.net/publication/268742011_Antifreeze_Proteins_in_Plants_An_overview_with_an_insight_into_the_detection_techniques_including_nanobiotechnology)
- Sogaard, G., Granhus, A., & Johnsen, O. (2009). Effect of frost nights and day and night temperature during dormancy induction on frost hardiness, tolerance to cold storage and bud burst in seedlings of Norway spruce. *Trees*, 23, 1295–1307. doi: 10.1007/s00468-009-0371-7
- Thomas, F. M., & Ahlers, U. (1999). Effects of excess nitrogen on frost hardiness and freezing injury of above-ground tissue in young oaks (*Quercus petraea* and *Q. robur*). *New Phytologist*, 144(1), 73–83. doi: 10.1046/j.1469-8137.1999.00501.x
- Viveros-Viveros, H., Sáenz-Romero, C., López-Upton, J., & Vargas-Hernández, J. J. (2007). Growth and frost damage variation among *Pinus pseudostrobus*, *P. montezumae* and *P. hartwegii* tested in Michoacán, México. *Forest Ecology and Management*, 253(1), 81–88. doi: 10.1016/j.foreco.2007.07.005
- Viveros-Viveros, H., Sáenz-Romero, C., Vargas-Hernández, J. J., López-Upton, J., Ramírez-Valverde, G., & Santacruz-Varela, A. (2009). Altitudinal genetic variation in *Pinus hartwegii* Lindl. I: Height growth, shoot phenology, and frost damage in seedlings. *Forest Ecology and Management*, 257(3), 836–842. doi: 10.1016/j.foreco.2008.10.021
- Walter, J., Jentsch, A., Beierkuhnlein, C., & Kreyling, J. (2013). Ecological stress memory and cross stress tolerance in plants in the face of climate extremes. *Environmental and Experimental Botany*, 94, 3–8. doi: 10.1016/j.envexpbot.2012.02.009
- Williams, C. M., Henry, H. A., & Sinclair, B. J. (2015). Cold truths: how winter drives responses of terrestrial organisms to climate change. *Biological Reviews*, 90(1), 214–235. doi: 10.1111/brv.12105