

RELACIÓN ENTRE LOS REQUERIMIENTOS DE FRÍO DURANTE ESTRATIFICACIÓN DE SEMILLAS PARA GERMINAR Y LA BROTAÇÃO DE PLÁNTULAS DE MANZANO

RELATIONSHIP BETWEEN CHILLING REQUIREMENTS DURING SEED STRATIFICATION FOR GERMINATION AND SPROUTING OF APPLE SEEDLINGS

Alejandro Facundo Barrientos-Priego^{1*}, Jorge Rodríguez-Alcázar², José Molina-Galán² y María Teresa B. Colinas-León¹

¹Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México C.P. 56230. E-mail: abarrien@taurus1.chapingo.mx, Tel y Fax (01) 5954-8336. ²Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México C.P. 56230. Tel. y Fax: (01) 951-1584. E-mail: jornal@colpos.colpos.mx.

* Autor responsable

RESUMEN

Se estudió la relación entre los requerimientos de estratificación de la semilla para germinar y la brotación de yemas de segregantes con el fin de examinar la posibilidad de realizar selección temprana en manzano (*Malus domestica* Borkh.) a nivel de germinación de semilla, para requerimientos de frío. Para esto se utilizaron 943 segregantes provenientes de cruces o polinización libre de 'Dorsett Golden', 'Anna', 'Aguanueva II' y 'Dulcina'. Se obtuvieron dos correlaciones altamente significativas entre días a germinación de la semilla y media de días a brotación de los árboles ($r=0.85^{**}$) y entre días a germinación de semilla individual y días a brotación de árbol individual ($r = 0.51^{**}$).

Palabras clave adicionales: *Malus domestica* Borkh., bajo requerimiento de frío, preselección, mejoramiento genético, 'Dorsett Golden', 'Aguanueva II', 'Anna', 'Dulcina'.

SUMMARY

The purpose of this research was to investigate the relationship between the chilling stratification requirements of apple (*Malus domestica* Borkh.) seed during germination and the corresponding seedling chilling requirement for bud-break. A total of 943 seedlings resulting from crosses and open pollination of 'Dorsett Golden', 'Anna', 'Aguanueva II' and 'Dulcina' were used in this study. Two highly significant correlations were found between days for seed germination and mean of days for seedling bud-break ($r = 0.85^{**}$) and between days required to individual seed germination and days for individual seedling bud-break ($r = 0.51^{**}$).

Additional index words: *Malus domestica* Borkh., low chilling requirement, pre-selection, plant breeding, 'Dorsett Golden', 'Aguanueva II', 'Anna', 'Dulcina'.

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas a que se enfrenta el genotecnista de frutales, es que en ocasiones la fase juvenil de estas

plantas llega a ser muy larga; esto trae como consecuencia que los programas de mejoramiento genético no tengan avances rápidos y se incrementa el costo de manutención de los huertos de evaluación. Por lo anterior, se han establecido técnicas con el fin de realizar selección temprana en árboles jóvenes de manzano (*Malus domestica* Borkh.), como en los casos de resistencia a roña (*Venturia inaequalis* [Cke.] Wint.) (Shay y Hough, 1952), cenicienta (*Podosphaera leucotricha* [Ell. & Ev.] Salm.) (Schander, 1958) y pudrición de la raíz causada por *Phytophthora cactorum* (Leb. and Conn.) Schroet. (Watkins y Werts, 1971). También se ha aprovechado la correlación entre algunos caracteres para realizar selección; por ejemplo, se ha encontrado que a mayor área foliar, mayor peso del fruto, y cuando sea más ancha la lámina foliar en relación con su largo, más achatado es el fruto (Loewel *et al.*, 1957). La relación que existe entre la brotación de los árboles juveniles y maduros (Tydeman, 1964) se ha aprovechado para seleccionar árboles de floración tardía (Schmidt, 1940; Tydeman, 1958) y de bajo requerimiento de frío en manzano (Oppenheimer y Slor, 1970).

En manzano los progenitores influyen en la duración del período de letargo de la semilla (Abramov, 1952; Abramov, 1955; Vondráček, 1961) o en su requerimiento de frío para germinar (Pastenak y Powell, 1980; Hauagge y Cummins, 1986; Robles y Rodríguez, 1989). Esto hace suponer que se puede realizar selección temprana durante la germinación, como la selección de semillas de manzano con largos períodos de letargo para identificar árboles con un largo período de reposo (Nesterov, 1960). Existe entonces la posibilidad de que las semillas de bajo

RELACIÓN ENTRE LOS REQUERIMIENTOS DE FRÍO PARA GERMINACIÓN Y BROTAÇÃO

requerimiento de frío (germinación rápida) correspondan con árboles de bajos requerimientos de frío, en manzano.

El objetivo de este estudio fue investigar la relación entre los tiempos necesarios para la germinación y para la brotación de la plántula, con el propósito de realizar selección temprana de fenotipos con bajos requerimientos de frío en manzano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Campo Experimental del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Edo. de México, que se encuentra localizado a una altitud de 2241 msnm y en las coordenadas 19° 29' L.N. y 98° 53' L.O. Según García (1980), el clima de la zona es C(wo)(W)b(i)g, o sea, subhúmedo con lluvias en verano, con 645 mm de precipitación media anual y porcentaje de lluvia invernal menor que 5 % del total. El verano es fresco y largo con temperatura del mes más frío (enero) entre 3 y 18 °C y la temperatura del mes más caliente (mayo) entre 6.5 y 22 °C, con una media anual de 16.5 °C (Muratalla, 1986).

Para este estudio se utilizaron plantas originadas de semilla derivadas del trabajo de Robles y Rodríguez (1989), quienes hicieron cruzamientos entre cultivares así como colecta de semillas producidas por polinización libre, como se indica en el Cuadro 1. El procedimiento que se siguió para acondicionar las semillas para su germinación fue: lavado; preparación de bolsas de polietileno con agrolita y benlate (benomyl) a razón de 1.0 g litro⁻¹ de agua, dejando únicamente la cantidad retenida por la agrolita; cerrado de la bolsa y colocación de las mismas en refrigeración constante a 4 °C \pm 1 por 140 días que equivalió a 3360 unidades frío. El número de semillas germinadas se registró cada cinco días. Las semillas se consideraron germinadas cuando la radícula alcanzó un mínimo de 2 mm de longitud. En total se germinaron 983 semillas, a las que se registró el número de días a germinación.

Las plántulas segregantes de manzano fueron establecidas en Montecillo, Edo. de México, a 2 m entre hileras y 30 cm entre plantas, en marzo de 1988, con hileras orientadas norte-sur.

La brotación de segregantes se registró tres veces por semana, del 10 de enero al 30 de mayo de 1989, considerando la brotación como el resultado de las combinaciones de su requerimiento de frío y su respectivo requerimiento de calor (Young y Werner, 1985). Con base en la observación de Chandler (1960), de que el factor o facto-

res que inducen al reposo de las yemas primero se desarrollan en las de la base y no así en las de la parte apical del vástago de manzano, se consideró como planta brotada cuando todas las yemas de la mitad inferior de la planta se encontraban brotadas, y como yema brotada a la que presentaba dos hojas expandidas. Se inició la evaluación con 883 segregantes, pero en el transcurso de la toma de datos se perdieron 63 plantas por motivos ajenos a este trabajo. Se registró el número de días a germinación de cada segregante.

Cuadro 1. Origen de semillas híbridas y de polinización libre de manzano, así como el número de días requeridos para su germinación y número de plántulas obtenidas.

Origen	Número de semillas que derivaron plántulas	Intervalo de días a germinación a 4 °C
'Aguanueva II' x 'Dorsett Golden'	25	95-130
'Aguanueva II' x 'Dulcina'	24	106-130
'Dulcina' x 'Anna'	59	85-135
'Dulcina' x 'Aguanueva II'	14	85-130
'Dulcina' polinización libre	78	120-135
'Aguanueva II' polinización libre	26	80-130
'Aguanueva II' x 'Anna'	763	70-140
Total	983 ¹	

¹durante la evaluación se perdieron 63 plantas del total

Con el fin de tener una idea de los requerimientos de frío de los segregantes durante el invierno de 1988-1989 se estimó la acumulación de frío. Se estimó 440.8 horas frío, calculada mediante la relación entre las horas frío que requieren cultivares de durazno (*Prunus persica* [L.] Batsch.) de conocido requerimiento de frío y las 280 unidades frío (UF) registradas en un biofenómetro Modelo TA-45 (Omnicdata International, Inc. USA), con el modelo Utah (Richardson *et al.*, 1974). La acumulación de frío se comenzó a registrar el 9 de noviembre y se concluyó el 24 de febrero, ya que de acuerdo con el modelo Utah, entre 2.5 y 9.1 °C se acumula una unidad frío, con temperaturas inferiores se acumula menos frío hasta el punto de no acumular nada (<1.4° C), y las temperaturas superiores se restan a la acumulación de frío. Este modelo es de los pocos que consideran la substracción de UF a la acumulación de frío por altas y bajas temperaturas, lo cual se ha demostrado experimentalmente que ocurre en frutales.

Sin embargo, las lecturas del biofenómetro y un termógrafo con el modelo Utah, dieron lecturas de 278 y 664.4 unidades frío, respectivamente. Esos valores que no fueron reales al darle un seguimiento a la brotación de duraznos de conocido requerimiento de frío, por lo que aquí se establecieron otros modelos que rindieron buena

precisión y se validaron en manzano (datos no publicados).

El análisis estadístico de los datos consistió en obtener las correlaciones y regresiones entre las siguientes variables:

1. Días a germinación de semilla individual y días a brotación de árbol individual.
2. Días a germinación de semilla y media de días a brotación de árboles.
3. Días a germinación de semilla y porcentaje de árboles brotados.

Dichos análisis se realizaron con la información obtenida a los 80 y 127 días después del primer árbol brotado. En la primera variable se utilizaron 347 y 605 individuos que habían brotado a los 80 y 127 días, respectivamente, y se realizó la toma de datos individualmente. Para la segunda variable se utilizaron 11 y 13 grupos a los 80 y 127 días, respectivamente, en los que los días a germinación de las semillas se evaluaron cada 5 días, de modo que las plantas correspondientes en campo se agruparon y se les determinó la media de días a brotación para cada grupo. Para la tercera variable, a los 80 y 127 días, se utilizaron los 13 grupos en cada caso.

Con la segunda y tercera variable se probaron los modelos lineal, cuadrático y cúbico, con el fin de elegir el de mejor ajuste.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las correlaciones entre días a germinación de las semillas y la brotación de los árboles a los 127 días fueron altamente significativas ($P \leq 0.01$), no obstante que se excluyeron en este análisis los árboles no brotados (34.3 %) (Cuadro 2). Tal exclusión se debió a que en esos árboles no se contaba con los días a brotación. Al respecto se puede indicar que la brotación de los segregantes fue muy variable, ya que se observó una gama de 127 días, la cual es amplia comparada con la de los 50 días (Oppenheimer y Slor, 1969), 25 a 35 días (Cummins y Aldwinckle, 1983) y 10 a 15 días (Zagaja *et al.*, 1988) reportadas para manzano. Dicha amplitud de brotación en manzano está gobernada por el requerimiento de frío y de calor de cada individuo (Young y Werner, 1985), lo que da como resultado diferentes combinaciones de brotación entre individuos. Las correlaciones entre días a germinación de las semillas y porcentaje de árboles brotados fueron altas ($r = -0.90$ y $r = -0.92$) y negativas ($P \leq 0.01$); para estas correlaciones se incluyó el total de árboles (920 árboles); en este caso, los individuos correspondientes a cada fecha de germinación se agruparon en 13 grupos, y en cada uno se determinó el porcentaje de árboles brotados. Para días a germinación de semilla individual y días a brotación de árbol individual, en la primera fecha se encontró un valor bajo de 'r' ($r = 0.14$) pero altamente significativo ($P \leq 0.01$); esta correlación se obtuvo con sólo 37.7 % de los árboles brotados. En cambio, en la segunda fecha, que se realizó con 65.7 % de los árboles, se obtuvo un coeficiente de correlación más alto en magnitud ($r = 0.51$).

Cuadro 2. Relación entre días a germinación en estratificación de la semilla y brotación de yemas en manzano. Montecillo, Edo. de México.

Variables	Número de observaciones	Coefficiente de correlación (r) a los 80 días [†]	Número de observaciones	Coefficiente de correlación (r) a los 127 días [‡]
Días a germinación de la semilla y media de días a brotación de los árboles ^{§§}	11	0.45 n.s.	13	0.85 **
Días a germinación de semilla individual y días a brotación de árbol individual ^{§§}	347	0.14 **	605	0.51 **
Días a germinación de la semilla y porcentaje de árboles con brotación	13	-0.90 **	13	-0.92 **

[†]Días a partir del primer árbol brotado (18 de enero al 7 de abril, 1989).

[‡]Días a partir del primer árbol brotado (18 de enero al 23 de mayo, 1989).

^{§§}Solamente se consideraron los árboles brotados.

n.s.: no significativo.

**Altamente significativo ($P \leq 0.01$)

RELACIÓN ENTRE LOS REQUERIMIENTOS DE FRÍO PARA GERMINACIÓN Y BROTAÇÃO

Cuadro 3. Estadísticos de datos de germinación-brotación de manzano ajustados a modelos de regresión.

Variables	Modelo	Coefficiente de determinación (R^2)	Coefficiente de variación (%)	Probabilidad	Sumatoria de residuos al cuadrado
	Lineal	0.72	20.7	0.0002	1598.8
Días a germinación de la semilla y media de días a brotación de los árboles el 7 de abril	Cuadrático	0.87	14.5	0.0058	718.1
	Cúbico	0.91	13.0	0.1007	523.6
	Lineal	0.82	28.5	0.0001	2473.57
Días a germinación de la semilla y porcentaje de árboles brotados el 7 de abril	Cuadrático	0.88	23.9	0.0038	1578.97
	Cúbico	0.90	22.7	0.5770	1281.61
	Lineal	0.83	12.6	0.0001	1012.39
Días a germinación de la semilla y porcentaje de árboles brotados el 23 de mayo	Cuadrático	0.94	8.0	0.0021	376.15
	Cúbico	0.94	8.3	0.5700	362.67

De acuerdo con lo anterior, existe una relación muy estrecha entre germinación de la semilla y días a brotación del árbol derivada de ésta, ya sea cuando se consideran individualmente o cuando se consideran los días a brotación de árboles agrupados. En un estudio con almendro (*Prunus dulcis* [Mill.] D. A. Webb), Kester *et al.* (1977) indicaron que los coeficientes de correlación entre el requerimiento de frío de la semilla y la fecha de foliación de la plántula derivada de la misma, fueron significativos (foliación tardía $r = 0.529^{**}$ y foliación temprana $r = 0.496^{**}$) cuando se calculó para familias; y fue baja cuando se calculó en forma individual ($r = 0.154^{**}$); estos investigadores concluyeron que no existe relación entre estos caracteres, en el que el intervalo de germinación de las semillas fue de únicamente entre 0 y 18 días y el de brotación fue de 0 a 9 días. En contraste, en este estudio se registró un intervalo de 0 a 70 días de germinación y de 0 a 126 días en brotación de las progenies. En otro estudio con durazno (*Prunus persica* Bastch.), Rodríguez-Alcázar y Sherman (1985) también encontraron una correlación significativa ($r = 0.21^{**}$) entre el requerimiento de frío de la semilla individual y el requerimiento de frío de la resultante plántula en campo; concluyeron que no es posible realizar selección a nivel de semilla para identificar árboles por su requerimiento de frío, en el intervalo de 300 a 400 horas frío, el cual para germinación es pequeño (0 a 27 días); sin embargo, al incluir un cultivar de alto requerimiento de frío (más de 1000 horas frío) en el análisis, se incrementó el coeficiente de correlación.

Del análisis de regresión los modelos que se ajustaron de acuerdo con los diferentes estadísticos obtenidos fue el cuadrático (Cuadro 3), que también dio un buen ajuste gráfico (Figuras 1, 2 y 3).

Los resultados muestran que se puede identificar más de 50% de los grupos de árboles brotados si provienen éstos de semillas que germinen antes de 112 días en estratificación (Figura 2). Si se separan las semillas germinadas antes de los 105 días en estratificación, se obtiene una media de 50 días a brotación de los grupos (Figura 1). Lo anterior podría ser muy útil en el mejoramiento genético hacia bajo requerimiento de frío, ya que podría evitar el establecimiento y mantenimiento de segregantes de alto requerimiento de frío para aumentar el número de segregantes de bajo requerimiento de frío, y así incrementar la posibilidad de obtener mayor número de segregantes en la selección final. Sin embargo, existen varios factores que afectan la germinación de la semilla como: estado de madurez del fruto (Sanada *et al.*, 1980), las condiciones del clima durante fructificación (Abramov, 1955) y el tamaño de la semilla (Schander, 1955).

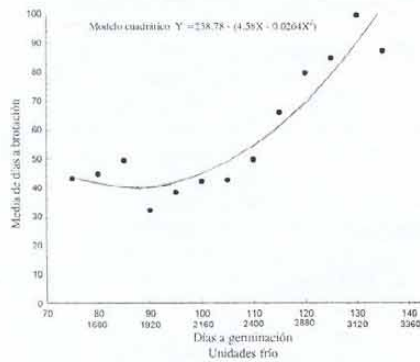


Figura 1. Relación entre días a germinación y la media de días a brotación de segregantes de varias familias de manzano, el 23 de mayo de 1989, en Montecillo, Edo. de México.

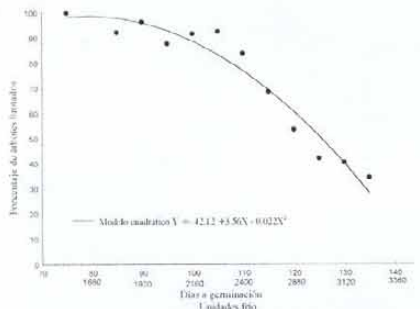


Figura 2. Relación entre días a germinación y porcentaje de árboles brotados en segregantes de varias familias de manzano, el 7 de abril de 1989, en Montecillo, Edo. de México.

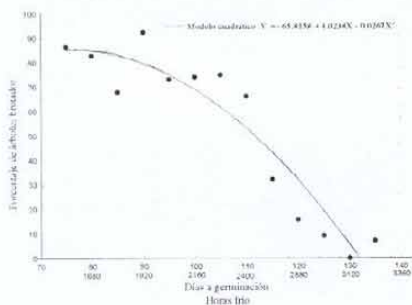


Figura 3. Relación entre días a germinación y porcentaje de árboles brotados en segregantes de varias familias de manzano, el 23 de mayo de 1989, en Montecillo, Edo. de México.

CONCLUSIONES

Existe una relación muy estrecha entre el tiempo necesario en estratificación de la semilla para germinar y la brotación de grupos de árboles derivados de la misma, por lo que existe la posibilidad de su utilización como un índice de preselección para bajo requerimiento de frío en manzano.

BIBLIOGRAFÍA

- Abramov, N. A. 1952. The effect of pollination on the date of germination of apple seeds. *Agrobiologia* 5: 11-115.
- Abramov, N. A. 1955. The influence of some biological factors on the duration of the dormant period in apple and pear seeds. *Izv. Akad. Nauk. S.S.S.R. Ser. Biol.* 1: 53-66.
- Cummins, J. N. and H. S. Aldwinckle. 1983. Breeding apple rootstocks. *Plant Breeding Reviews* 1: 294-394.
- Chandler, W. H. 1960. Some studies of rest on apple trees. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 76: 1-10.
- García, E. 1973. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Universidad Autónoma de México, D.F. México. 246 p.
- Hauagge, D. E., and J. N. Cummins. 1986. Apple seed dormancy in controlled crosses. *HortScience* 21: 158.
- Kester, D. E., P. Raddi, and R. Asay. 1977. Correlations of chilling requirements for germination, blooming and leafing within and among seedling populations of almond. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 102: 145-148.
- Loewel, E. L., H. Schander, and W. Hildebrandt. 1957. Untersuchungen zur entwicklung von frühselektionsmethodem für die apfelzüchtung. 1. Über bezihugen zwischen blatt und fruchmerkmalen beim apfel. *Züchter* 27: 15-32.
- Muratalla L., A. 1986. Comportamiento de 19 especies de manzano (*Malus* spp.) injertados con el cultivar Elba en Montecillo, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Fruticultura. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 69 p.
- Nesterov, J. S. 1960. Preliminary selection of fruit-tree seedlings according to the length of resting period. *Vestn. sel'skhozhojzajstv. Nauk.* 5: 67-72.
- Oppenheimer, Ch. and E. Slor. 1970. Breeding of apples for subtropical climate. Division of Subtropical Horticulture, The Volcani Center, Institute of Agricultural Research 1960-1969. Bet-Dagan, Israel. pp: 181-184.
- Pastenak, G. and L. E. Powell. 1980. Chilling requirements of apple seeds from cultivars having low and high chilling requirements for shoot growth. *HortScience* 15: 408.
- Richardson, E. A., S. D. Seeley, and D. R. Walker. 1974. A model for estimating the completion of rest of 'Redhaven' and 'Elberta' peach tress. *HortScience* 9: 331-332.
- Robles, M. M. y J. Rodríguez. 1989. Relación de los requerimientos de frío de yema y de estratificación para germinación de semillas en siete cultivares de manzana. III Congreso Nacional de Horticultura. Oaxtepec, Mor. Programa y Memoria de Resúmenes. p. 18.
- Rodríguez-Alcázar, J. and W. B. Sherman. 1985. Relationships between parental, seed, and seedling chilling requirement in peach and nectarine. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110: 627-630.
- Sanada, T., T. Yoshida, and T. Haniuda. 1980. Studies on the method of seed storage in apple breeding. II. Effective method for breaking dormancy of dry stored seed. *Bull. Fruit Tree Res. Sta., Ser. C., Morioka* 7: 15-31.

RELACIÓN ENTRE LOS REQUERIMIENTOS DE FRÍO PARA GERMINACIÓN Y BROTAÇÃO

- Schander, H. 1955. On the causes of differences in weight in the seeds of pome fruits. I. the relationship between seed and fruit. Z. Pflanzenz. 34: 255-306.
- Schander, H. 1958. Investigations on the development of early selection methods for apple breeding. II. Early selection for resistance to powdery mildew (*P. leucotricha* Salm.), the susceptibility of apple varieties and the inheritance of susceptibility. Züchter 12: 281-289.
- Schmidt, M. 1940. Late leafing-out and late flowering as an aim in apple breeding. Züchter 12: 281-289.
- Shay, J. R. and L. F. Hough. 1952. Evaluation of apple scab resistance in selections of *Malus*. Amer. J. Bot. 39: 288-297.
- Tydeman, H. M. 1958. The breeding of late flowering apple varieties. Rep. E. Malling Res. Sta. for 1957: 68-73.
- Tydeman, H. M. 1964. The relation between time of leaf break and flowering in apple seedlings. Rep. E. Malling Res. Sta. for 1963: 70-72.
- Vondrák, J. 1961. Rychlost klicení semen, doba rasení, ukocení vegetace a vzájemné vztahy techovlastností u potomstva různých jablonových odrůd. Rostlinná Vyroba 7: 1127-1150.
- Watkins, R. and J. M. Werts. 1971. Pre-selection for *Phytophthora cactorum* (Leb. and Conn.) Schroet. resistance in apple seedlings. Ann. Appl. Biol. 67: 153-156.
- Young, E. D.J. and Werner. 1985. Chill unit and growing degree hour requirements for vegetative bud break in six apple rootstocks. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110(3): 411-413.
- Zagaja, S. W., A. T. Czynczyk, Jakubowski, and B. Omiecinska. 1988. Breeding and evaluating apple rootstocks for Northern Europe. HortScience 23: 109-112.