

FENOLOGIA REPRODUCTIVA DE *Pinus montezumae* Lamb. II. EFECTO DE LA EPOCA DE COLECTA Y DEL METODO DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA VIABILIDAD DE POLEN¹

Jesús Vargas Hernández², Jesús Jasso Mata³ y Abel Muñoz Orozco⁴

RESUMEN

Se colectó polen de cinco árboles de *Pinus montezumae* Lamb. en diferentes fechas durante su maduración y fue almacenado en dos tipos de envase a temperaturas de $4\pm 2^\circ\text{C}$. Cada dos meses se evaluó la germinación cultivando muestras de polen durante 72 horas *in vitro*, en una solución de 10% de sacarosa en agua, a través de un período de 10 meses de almacenamiento. El análisis demostró que existe una amplia variación entre árboles y entre fechas de colecta para cada individuo en la capacidad germinativa del polen. Esta variación también se manifestó en los lotes de polen durante el período de almacenamiento. El polen almacenado en ampollitas selladas al vacío sufrió una reducción inmediata de 30% en su germinación; sin embargo, al final del estudio presentó una mayor viabilidad que el polen almacenado en envases de plástico.

SUMMARY

Pollen grains from five trees of *Pinus montezumae* Lamb. were collected at different times and were stored in two different types of containers and kept at low temperature ($4\pm 2^\circ\text{C}$). Each two months, pollen samples were cultivated *in vitro* during 72 hours in a 10% sucrose solution to evaluate percentage of germination, along a ten months storage period. Statistical analysis of the germination percentage for the fresh pollen showed a large variation among trees and among dates of collection for some trees. This variation was also observed in the pollen lots along the storage period. Pollen lots stored in vacuum sealed ampules, immediately lost 30% of their original germination capability. However at the end of the storage period, they showed a higher viability than the pollen stored in plastic bottles.

INTRODUCCION

La dificultad y el tiempo necesario para la colecta y extracción del polen de coníferas hace problemático el uso de éste en polinizaciones controladas durante

¹/ Investigación financiada parcialmente por CONACYT a través del proyecto PCAFBNA-020444.

²/ Investigador Adjunto del Programa Forestal, C.P.

³/ Investigador del Centro de Genética, C.P.; actualmente realiza estudios doctorales en la Universidad de Yale.

⁴/ Profesor Investigador Titular del Centro de Genética, C.P., 56230 Chapingo, Méx.

el mismo año de colecta. Lo anterior ha planteado a los genetistas forestales la necesidad de mantener reservas adecuadas de polen viable para su uso en los años siguientes.

La importancia de las especies de pino en México y su gran potencial para ser utilizadas en programas de mejoramiento genético, así como la amplia variabilidad natural existente en ellas, justifican el estudio de técnicas apropiadas para el manejo y conservación del polen a mediano y largo plazo. En un trabajo anterior, Jasso *et al.* (1986) hicieron notar la presencia de una amplia variación en la capacidad germinativa del polen entre árboles de una misma población, diferencias que pueden estar asociadas a características genéticas, grado de madurez del polen al momento de la colecta o a condiciones de extracción y almacenamiento.

El objetivo de este trabajo es analizar el efecto de la época de colecta de polen y las condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad del polen de diferentes individuos de *Pinus montezumae* Lamb. durante un período de 10 meses.

REVISION DE LITERATURA

De acuerdo con Sprague y Johnson (1977), la viabilidad inicial del polen en coníferas depende en gran medida del cuidado y las condiciones en que se realiza su colecta y extracción. Aún cuando Duffield (1954) señala que todo el polen maduro y se dispersa en pocos días, Ericksson *et al.* (1973) encontraron diferencias fenológicas entre árboles en la época de maduración; esto dificulta las actividades de colecta, pues estróbilos con polen inmaduro requieren un período de secado y extracción más prolongado, lo que reduce la calidad del mismo (Sprague y Johnson, 1977).

Después de la extracción del polen, el mantenimiento de la calidad inicial depende de las condiciones de almacenamiento. Mergen *et al.* (1955) mencionan que el polen de *Pinus palustris* puede ser almacenado sin problemas durante 4-8 semanas en envases de plástico dentro de un desecador a 4°C. En el almacenamiento a mediano y largo plazo se requiere de un control más estricto de las condiciones ambientales para reducir la actividad metabólica del polen y la presencia de hongos o bacterias (Duffield, 1954).

Fechner y Funsch (1986) indican que el almacenamiento en envases sellados y a

bajas temperaturas permitió mantener una viabilidad aceptable durante 11 años en polen de *Pinus ponderosa* y *Picea pungens*, pero no en el de *Pinus contorta* y *P. flexilis*. Ahlgren y Ahlgren (1978) mencionan que el almacenamiento al vacío y a temperaturas menores de 0°C fue efectivo durante períodos de 8 años para diferentes especies de *Pinus*; sin embargo, Sprague y Johnson (1977) señalan que existe una fuerte variación clonal en la capacidad de almacenamiento de polen al vacío, efecto que no está relacionado con su viabilidad inicial.

Ching y Ching (1964) establecen que a pesar de que el tratamiento de vacío reduce la viabilidad inicial del polen en relación directa a la duración del tratamiento, después de uno o más años el polen almacenado en esa condición conserva una mayor germinación que el polen no tratado. Posteriormente, Livingston y Ching (1967) encuentran diferencias entre lotes de polen en la tolerancia a la duración del período de vacío, que puede estar relacionada con las características genéticas o el tiempo de colecta del polen.

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó con polen colectado en cinco árboles de *Pinus montezumae* Lamb. del área semillera localizada en el Campo Experimental "San Juan Tetla", Puebla, del Instituto de Investigaciones Forestales. Durante los meses de marzo y abril de 1982 se hicieron cuatro colectas de amentos próximos a liberar el polen (25 de marzo, 4, 14 y 28 de abril). La extracción del polen se efectuó con el auxilio de un calentador portátil y un ventilador para reducir el contenido de humedad del aire; más detalles del procedimiento son descritos por Jasso (1982).

Los lotes del polen de cada individuo y cada fecha de colecta fueron envasados por separado. La mitad de cada lote fue colocada en envases de plástico de 10 ml con tapa de presión y éstos se introdujeron en un desecador a una temperatura de $4 \pm 2^\circ\text{C}$; la otra mitad fue colocada en ampollitas de cristal de 10 ml, selladas después de un tratamiento de vacío de 60 minutos, y almacenadas a $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

La evaluación de la capacidad germinativa del polen se realizó en 6 ocasiones a intervalos de dos meses a partir de su extracción. Los granos de polen de cada lote, tomados con la punta de una aguja de disección, fueron cultivados en una solución al 10% de sacarosa puesta en dos porta-objetos de escabado apareados e invertidos entre sí. La prueba de germinación se realizó en condiciones de laborato-

rio a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. El porcentaje de germinación se evaluó a las 72 horas en 5 muestras tomadas al azar de cada lote, con un microscopio óptico (objetivo 10x), para ello se determinó el número total de granos presentes en la muestra y el número de ellos que presentaban un tubo polínico igual o mayor al tamaño inicial del grano. Los datos fueron transformados a grados angulares a fin de que se ajustaran a la distribución normal; posteriormente fueron analizados estadísticamente por árbol, fecha de colecta, tiempo y método de almacenamiento.

RESULTADOS

Germinación inicial del polen

El porcentaje de germinación inicial del polen por árbol y fecha de colecta se presenta en la Figura 1. Se puede observar que el polen del árbol 5 mostró una menor capacidad germinativa, con un promedio en todas las colectas de 33%, mientras que el árbol 4 presentó un promedio de 68%. El análisis estadístico también mostró diferencias altamente significativas entre fechas de colecta dentro de un mismo árbol, al igual que para una misma fecha entre árboles distintos. Aún cuando la mayoría de los individuos produjo polen de mejor calidad en la primera fecha, existen algunos cuya producción óptima ocurre en fechas posteriores. Lo anterior indica la presencia de una fuerte variación genotípica en relación con la época de maduración del polen en cada uno de los árboles.

En la Figura 1 se observa claramente que la segunda fecha de colecta fue la que presentó la menor germinación inicial en cuatro de los individuos estudiados, mientras que en el otro fue la fecha en que el polen manifestó la mayor capacidad germinativa. Este hecho apoya lo anterior e indica la presencia de al menos dos flujos sucesivos de maduración del polen en cada árbol, que pudieran estar relacionados con los cambios en las condiciones ambientales durante ese período de tiempo.

Efecto del tiempo y método de almacenamiento

La duración del almacenamiento (Figura 2) tuvo un efecto importante en la reducción de la viabilidad del polen en todos los árboles. En los primeros dos meses no se presentaron cambios significativos en la calidad del polen; sin embargo, después de cuatro meses se observó una disminución significativa en cuatro de los árboles, mientras que en el árbol 5 la pérdida drástica de calidad ocurrió hasta los seis meses de almacenamiento. A los 10 meses, el polen redujo su viabilidad

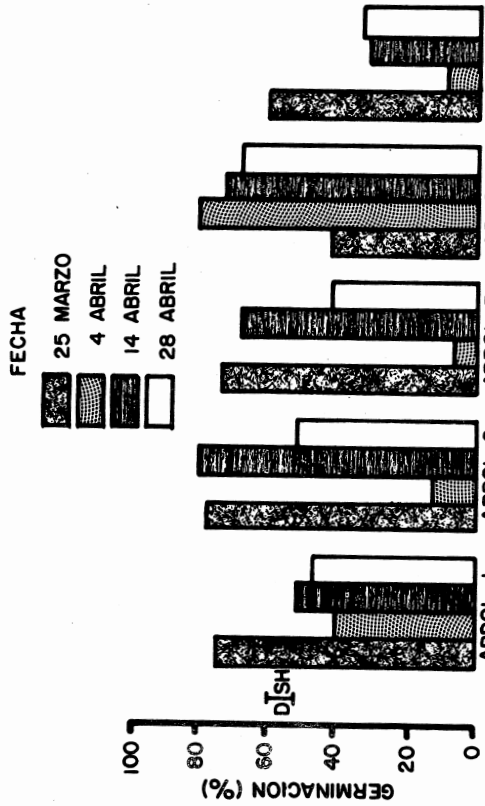
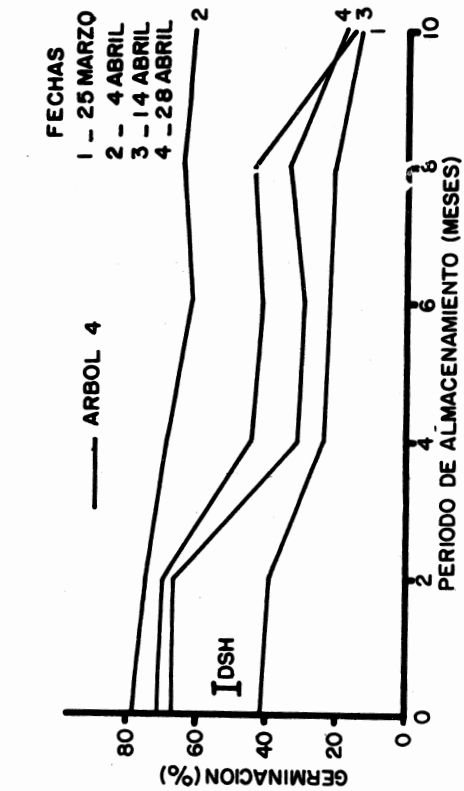


Figura 1. Germinación inicial del polen de 5 árboles de *Pinus montezumae* colectado en diferentes fechas.

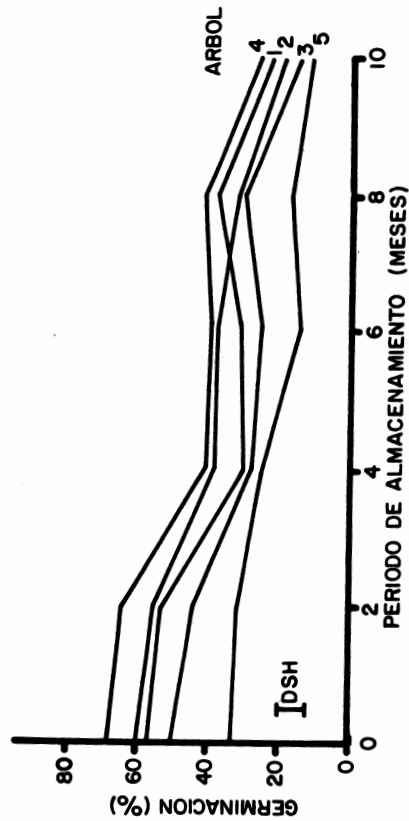


Figura 2. Germinación del polen de cinco árboles de *Pinus montezumae* durante el almacenamiento.

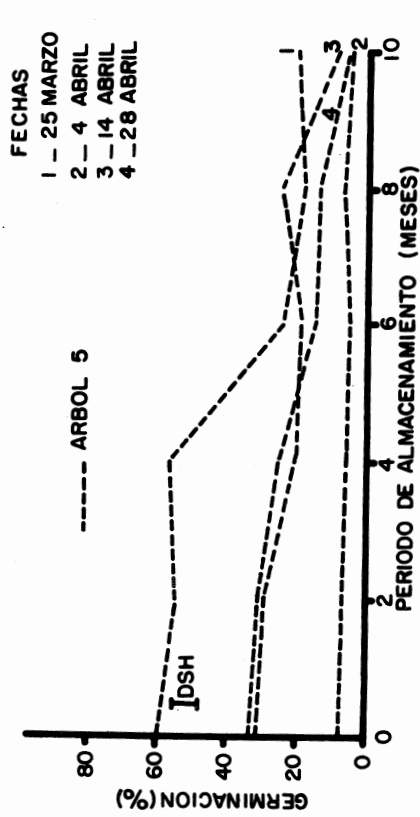


Figura 3. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la germinación del polen de dos árboles de *Pinus montezumae* colectado en diferentes fechas.

inicial a menos de la mitad, con valores que varían de 12% para el árbol 5 a 28% para el árbol 4.

A pesar de lo anterior, no todas las fechas de colecta tuvieron el mismo comportamiento durante el almacenamiento. En la Figura 3 se presenta el porcentaje de germinación para los lotes colectados en diferentes fechas en los árboles con valores extremos de calidad de polen como son el árbol 4 y el 5; con excepción del polen colectado el 4 de abril, todos los lotes muestran reducción en su capacidad germinativa después de 4 meses de almacenamiento. Debido a las diferencias entre árboles, al final del estudio el lote del árbol 4 colectado en la segunda fecha conservó una germinación mayor del 60%, mientras que en el árbol 5 este lote presentó menos del 10%.

El método de almacenamiento fue más importante que la duración en los cambios ocurridos en la capacidad germinativa del polen (Figura 4). En los lotes de polen almacenados al vacío se presentó una reducción significativa en la viabilidad inmediatamente después de realizado el tratamiento, pero se mantuvo sin cambios posteriores durante todo el período de almacenamiento; el polen almacenado en envases de plástico sin vacío conservó un buen porcentaje de germinación durante los primeros 4 meses; sin embargo, al final del período de estudio su germinación potencial fue significativamente menor que en el polen almacenado al vacío.

En la Figura 5 se observa que todos los individuos estudiados presentan un comportamiento similar al señalado anteriormente para cada método de almacenamiento; en todos los lotes, el almacenamiento al vacío fue mejor que en envases de plástico al final del período de almacenamiento. La capacidad germinativa del polen de cada árbol después de 10 meses estuvo relacionada con la viabilidad inicial de los mismos. Sin embargo, también es importante señalar que en el método de almacenamiento sin vacío, los árboles 2, 3 y 5 mostraron una mayor capacidad que los otros para mantener la viabilidad inicial del polen por mayores períodos.

DISCUSION

Sprague y Johnson (1977) indican que el contenido de humedad del polen es el factor crítico en el mantenimiento de la viabilidad durante la conservación a largo plazo del mismo. Sin embargo, muy poca atención se le ha prestado al efecto que sobre el almacenamiento efectivo del polen pueden tener la variación genética o la

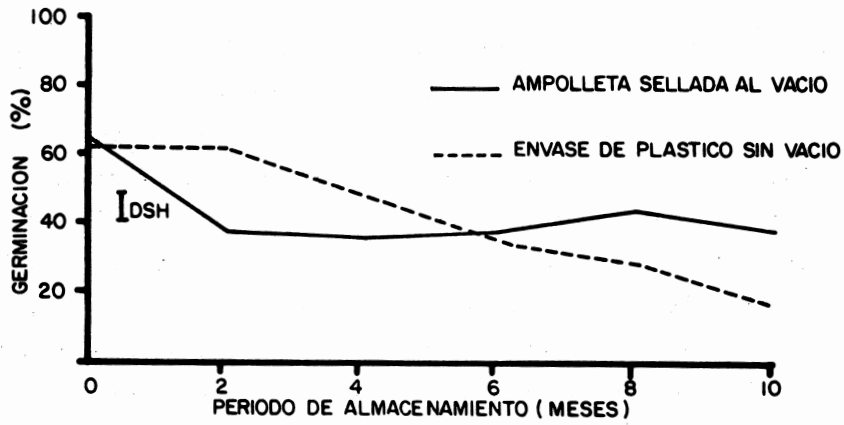


Figura 4. Efecto del método de almacenamiento sobre la germinación del polen durante los primeros diez meses de almacenamiento.

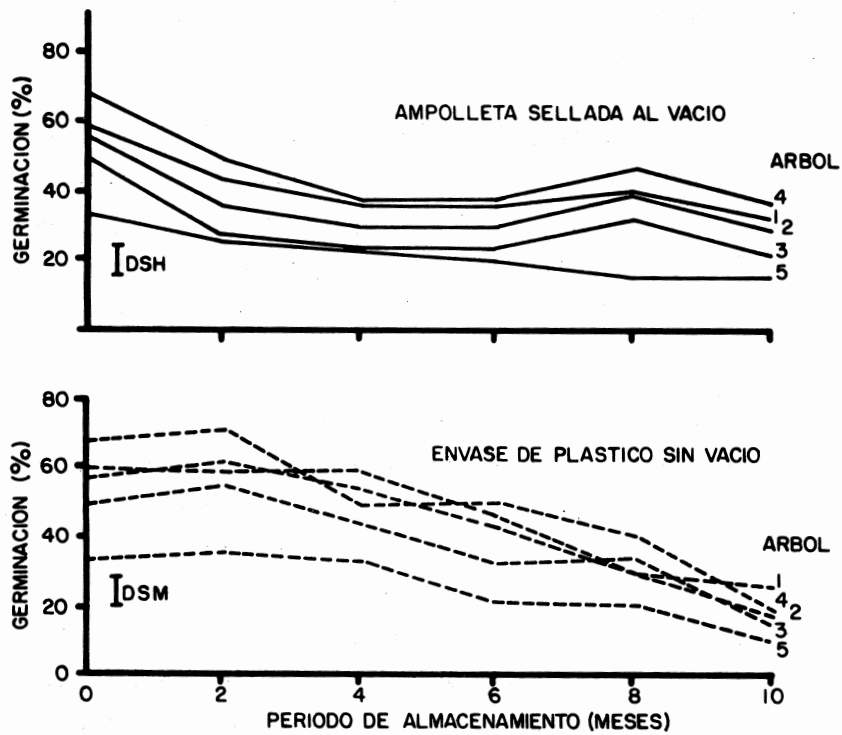


Figura 5. Germinación del polen de 5 árboles bajo dos métodos de almacenamiento.

época de colecta del material, y no se sabe si influyen o no sobre el contenido de humedad inicial del polen.

Los resultados presentados en este trabajo (Figura 1), al igual que en otro realizado anteriormente (Jasso *et al.*, 1986) manifiestan la existencia de una fuerte variación individual en la calidad inicial del polen. Al parecer, las diferencias en la capacidad germinativa inicial se deben tanto a diferencias genotípicas como fenológicas, puesto que la calidad del polen en un mismo individuo varía con la fecha de colecta (Figura 1). Lo anterior indica diferencias entre árboles en el tiempo de maduración del polen, lo cual repercute sobre el tiempo óptimo de colecta y el contenido de humedad inicial. Adams (1982) señala la presencia de una variación clonal similar en otras características del polen de *Pseudotsuga menziesii*, como peso, diámetro y número de granos por amento. Bergmann (1968), Ericksson *et al.* (1973) y Johnson *et al.* (1976) también encuentran una considerable variación clonal en el período de floración y en las características cuantitativas y cualitativas del polen producido.

La variación genética y fenológica en la calidad inicial del polen juega un papel sumamente importante en la estrategia reproductiva de las especies bajo condiciones naturales, al permitir una mayor posibilidad de que ocurran polinizaciones cruzadas; Neale (1983) presenta resultados que manifiestan la importancia de estos aspectos sobre el sistema de apareamiento y la estructura genética de las poblaciones en especies forestales.

Sin embargo, la variación individual en la calidad inicial del polen también tiene repercusiones importantes sobre el éxito de la conservación del polen a largo plazo (Figuras 2 y 5); Sprague y Johnson (1977) presentan resultados similares a éstos y señalan que bajo condiciones semejantes de almacenamiento, el polen de mayor calidad inicial tiene por lo general mayores posibilidades de conservar un mejor porcentaje de germinación al final del período. Debido a lo anterior, al momento de hacer mezclas de polen en trabajos de polinización masiva, al realizar estudios de competencia del polen o al pretender mantener una variación genética adecuada en huertos semilleros, se debe tomar en cuenta el efecto ocasionado por las diferencias en potencial germinativo presentes entre lotes de polen.

Ahlgren y Ahlgren (1978) muestran que la eficiencia del método de conservación del polen de coníferas en envases sellados al vacío y mantenidos a bajas temperatu-

ras se debe en gran medida a que se reduce considerablemente el contenido de humedad y la actividad metabólica del polen; sin embargo, la duración del tratamiento de vacío es importante, pues una eliminación excesiva de la humedad puede tener efectos negativos al deshidratar el polen (Ching y Ching, 1964). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que posiblemente el tratamiento de vacío de 60 minutos fue excesivo para el polen de *Pinus montezumae*, puesto que la capacidad germinativa se redujo inmediatamente en mayor grado que en el polen no tratado. A pesar de ello, a largo plazo, el polen almacenado al vacío conservó un mayor potencial germinativo que el polen almacenado únicamente a bajas temperaturas (Figura 4).

Por otro lado, en las Figuras 4 y 5 se observa que a los 8 meses de almacenamiento se presenta un ligero aumento en la germinación de los lotes mantenidos al vacío, debido posiblemente a una mayor hidratación de las muestras durante la realización del ensayo de germinación. Esto parece indicar que el daño por deshidratación excesiva puede ser reversible y que posiblemente se recupere la capacidad germinativa inicial mediante su rehidratación con alta humedad relativa antes del ensayo o utilización del polen. Los trabajos realizados por Ching y Ching (1964) y Livingston y Ching (1967) muestran resultados similares a los de este estudio; de acuerdo con ellos, las diferencias en el comportamiento individual de los lotes de polen durante el almacenamiento pueden estar relacionadas con las diferencias fenológicas de los árboles y con diferencias en la tolerancia a la deshidratación y en la capacidad de rehidratación posterior.

Para definir con precisión cual es la verdadera causa que origina la variación en el comportamiento del polen durante el almacenamiento se necesita realizar un estudio más detallado de los factores señalados anteriormente; sin embargo, cualquiera que sea, en este trabajo se pone de manifiesto que dentro de los programas de conservación y manejo de polen se debe tomar en cuenta la variación genética y fenológica en la producción de polen.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos, permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. Se presentó una amplia variación genética y fenológica en la producción de polen dentro de la misma población, por lo que la obtención de polen de óptima

calidad ocurrió en diferente fecha para cada individuo.

2. La conservación de polen de *Pinus montezumae* en envases de plástico a bajas temperaturas fue apropiada únicamente durante períodos cortos de almacenamiento. Después de 10 meses el polen mantuvo sólo un tercio de la capacidad germinativa inicial, por lo que este método puede aconsejarse únicamente cuando el polen va a ser utilizado en el mismo ciclo de floración.

3. En el método de almacenamiento en ampollitas selladas al vacío se presentó una reducción inmediata en la viabilidad del polen; sin embargo, al final del período de estudio estos lotes conservaron un porcentaje de germinación significativamente mayor que el resto.

4. Se presentaron diferencias entre lotes de polen en el comportamiento durante el almacenamiento, que pueden estar relacionadas con la fecha de colecta y con diferencias en la tolerancia a la deshidratación del polen.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen en forma amplia el apoyo y las facilidades proporcionadas por el Centro de Investigaciones Forestales de la Región Central del Instituto de Investigaciones Forestales, durante la colecta del material utilizado en el presente estudio.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, W.T. 1982. Clonal variation in pollen-related characteristics of Douglas-fir. *Can. J. For. Res.* 12: 403-408.
- Ahlgren, C.E. and I.F. Ahlgren. 1978. Viability and fertility of vacuum dried pollen of 5-needle pine species. *Forest Science* 24: 100-102.
- Bergmann, A. 1968. Variation in flowering and its effect on seed cost. N.C. State University. School of Forest Resources. Tech. Report No. 38.
- Ching, T.M. and K.K. Ching. 1964. Freeze-drying pine pollen. *Plant Physiol.* 39: 705-709.
- Duffield, J.W. 1954. Studies on extraction, storage and testing of pine pollen. *Silvae Genetica* 3: 39-45.
- Ericksson, G., A. Johnsson and D. Lindgren. 1973. Flowering in a clone trial of *Picea abies* Karst. *Stud. For. Suec.* 110.

- Fechner, G.H. and R.W. Funsch. 1966. Germination of blue spruce and ponderosa pine pollen after eleven years of storage at 0° to 4°C. *Silvae Genetica* 15: 164-166.
- Jasso M., J. 1982. Ensayo preliminar de selección y cruzamientos en una población natural de *Pinus montezumae* Lamb. Tesis Profesional. UACH. Chapingo, Méx.
- _____, J. Vargas H. y A. Muñoz O. 1986. Fenología reproductiva de *Pinus montezumae* Lamb.: I. Germinación de polen en diferentes soluciones nutritivas y períodos de almacenamiento. *Agrociencia*. (En revisión).
- Johnsson, A., I. Ekberg and G. Ericksson. 1976. Flowering in a seed orchard of *Pinus silvestris* L. *Stud. For. Suec.* 135.
- Livingston, G.K. and K.K. Ching. 1967. The longevity and fertility of freeze-dried Douglas-fir pollen. *Silvae Genetica* 16: 98-101.
- Mergen, F., H. Rossoll and K.B. Pomeroy. 1955. How to control the pollination of slash and longleaf pine. U.S.D.A. For. Serv. Southeast For. Exp. Sta. Research Paper 58. 14 p.
- Neale, D.B. 1983. Population genetic structure on the Douglas-fir shelterwood regeneration system in southwest Oregon. Ph.D. Dissertation. O.S.U. Unpublished. 96 p.
- Sprague, J.R. and V.W. Johnson. 1977. Extraction and storage of loblolly pine (*Pinus taeda*) pollen. 14 th. Suth. For. Tree Improv. Conf. Proc. 20-27.

Próximamente se enviarán a los socios de la SOMEFI, el Número 5 de la revista GERMEN, con el siguiente contenido:

LA ORGANIZACION DE GRUPOS INTERDISCIPLINARIOS DE INVESTIGACION.
James H. Anderson

PRESUPUESTACION PARA LA INVESTIGACION INTERDISCIPLINARIA.
R. J. Aldrich

EL MANTENIMIENTO DE LA INTEGRIDAD PROFESIONAL EN EL ESFUERZO DE INVESTIGACION EN GRUPOS INTERDISCIPLINARIOS.
Roger L. Mitchell

REDUCCIONES PRESUPUESTALES: Un desafío administrativo.
J. F. Kelly

LAS REDUCCIONES PRESUPUESTALES: Un reto administrativo.
J. P. Mahlstede

IMPRESO EN TALLERES GRAFICOS
UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO
CHAPINGO, MEX.