

Variabilidad clonal de la fenología reproductiva y producción floral. participación clonal en un huerto semillero de *Pinus nigra* Arnold *salzmannii* (Dunal) Franco.

Francisco J. Lario ¹, Esther Merlo ², Juan L. Peñuelas ³, Luis Gil ¹

¹ Unidad de Anatomía, Fisiología y Genética, ETSIM, Ciudad Universitaria s/n 28040 Madrid, España.

² Centro de Investigaciones Forestales y Ambientales de Lourizán. Lourizán-Iglesia 19, 36153 Pontevedra, España.

³ Centro Nacional de Mejora Forestal "El Serranillo". Ministerio de Medio Ambiente, Apdo. 249, 19080 Guadalajara, España.

Resumen

Se realiza el seguimiento de la fenología reproductiva, y se valora la participación genotípica mediante la floración y la cosecha en un huerto semillero clonal de *Pinus nigra* Arnold *salzmannii* (Dunal) Franco, de la región de procedencia Sistema Ibérico Meridional, situado en Guadalajara. Se encuentran diferencias significativas entre clones para el inicio del estado de receptividad femenina. El solapamiento fenológico (PO_0) es de 0.35 en 1999 y de 0.33 en 2000, indicando cierta estabilidad interanual. Los índices de asimetría sexual encontrados para la plantación muestran un equilibrio en la contribución de genotipos en la cosecha lo que favorecería los altos valores de población efectiva (Ne) relativa al número de genotipos, del 77.0 por ciento para 1999 y del 97.3 por ciento para 2000.

P.C.: fenología, reproducción, participación clonal, solapamiento, asimetría sexual

Summary

Reproductive phenology is studied in a clonal seed orchard of *Pinus nigra* Arnold *salzmannii* (Dunal) Franco, located in Guadalajara, of the provenance "Sistema Ibérico Meridional". Genetic contribution to the seed yield is calculated through flower and seed cone production, and reproductive phenology. Significant differences are found among clones for the beginning of the receptive status. The phenological overlap index (PO_0) is 0.35 in 1999 and 0.33 in 2000, what means interannual stability. The maleness index found for the orchard shows a balanced clonal contribution to the yield. This could help to reach high values for the effective population number (Ne), i.e., proportion of real number of clones contributing to the census number is 77.0 per cent in 1999 and 97.3 per cent in 2000.

K.W.: phenology, reproduction, clonal participation, overlapping, sexual asymetry

Introducción, material y métodos

Los criterios de diseño para la instalación de huertos semilleros son reducir al máximo la autopolinización clonal y favorecer la panmixia para aumentar la variabilidad y calidad genética de la semilla producida. Las condiciones de funcionamiento tras su instalación se valoran a través de distintas metodologías basadas en la participación clonal de producción de estróbilos femeninos y masculinos, en la fenología reproductiva de cada clon y por último en estudios con marcadores moleculares.

Este estudio se realiza en el huerto semillero clonal de *Pinus nigra salzmannii* región de procedencia Sistema Ibérico Meridional, situado en Centro Nacional de Mejora Forestal “El Serranillo”, Guadalajara, España. La plantación se encuentra a 685 m de altitud en la ribera del río Henares. Están representados 64 genotipos reproducidos por injerto, seleccionados dentro del área de procedencia a partir de caracteres fenotípicos superiores, bajo un diseño de 18 bloques completos al azar. El marco de plantación es de 5 x 5 m y ocupa una superficie total de 28.800 m². La edad de los árboles desde el injerto oscila entre 13 y 15 años.

El 20% de los clones se estima como adecuado para conocer la fenología reproductiva. Los clones se seleccionan al azar sobre 5 bloques también elegidos al azar dentro del huerto. El seguimiento de la fenología reproductiva se realiza durante 1999 y 2000. Para ello en cada ramet se identifican, al azar, 10 ramas en la cara sur del árbol, 5 en la parte alta, y 5 en la parte baja de la copa. Sobre estas ramas se realizan observaciones 2 veces por semana, referidas siempre a la yema terminal, y se caracteriza el estado fenológico en el que se encuentran según Matziris (1994) para las flores femeninas, y Pohoski (1977) para las flores masculinas.

Los datos de fenología obtenidos permitirán representar en los fenogramas, para cada fecha, la proporción de ramas señalizadas que alcanzan el estado reproductivo dentro de cada clon.

Las variables inicio, duración y final de los estados fenológicos reproductivos se analizan mediante un ANOVA multifactorial ajustado al modelo

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_k + (\alpha\beta)_{ik} + \delta_j + (\alpha\delta)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

siendo α , β , y δ_j los factores genotipo, bloque y año y $(\alpha\beta)_{ik}, (\alpha\delta)_{ij}$, las interacciones y ε_{ij} el error experimental.

La capacidad de cruzamiento entre todas las posibles parejas de clones viene dada a partir del índice de sincronización fenológica (Askew, 1990) definido por la fórmula:

$$PO_{\mu} = \frac{\sum_{i=1}^n (s_{i\mu} - \Delta_{i\mu})}{\sum_{i=1}^n s_{i\mu}}$$

donde s_{ijk} es el valor más alto que resulta de comparar la participación masculina del clon j y la participación femenina del clon k en la observación del día i ; Δ_{ijk} es la diferencia en valor absoluto de los valores anteriores.

El valor medio de sincronización fenológica para el conjunto de clones en estudio es:

$$PO_{\sigma} = \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^t \frac{PO_{jk}}{(t - (t - 1))} \quad j \neq k \quad t = \text{n}^{\circ} \text{ de clones}$$

La participación clonal en la producción de estróbilos masculinos durante los dos años de estudio se evalúa sobre el global del árbol. En 1999 la contribución femenina vendrá dada por el número de piñas y la contribución masculina se realiza por conteo de estróbilos en cada uno de los árboles en estudio. En el año 2000 la intensidad de floración masculina y femenina se evalúa según la metodología descrita por Kjær y Wellendorf (1997).

La asimetría sexual de la contribución clonal viene dada por el índice de masculinidad descrito por Lloyd (1979)

$$M_i = \frac{P_i}{(C_i + P_i)}$$

siendo p_i la contribución proporcional en la cosecha del clon i a través de la producción de estróbilos masculinos, y c_i la contribución proporcional en la cosecha del clon i a través de la producción de estróbilos femeninos.

La contribución genética G_i de cada clon se calcula según Xie, Woods *et al.* (1994) en base a la producción de estróbilos masculinos y piña en 1999, a la producción de estróbilos masculinos y femeninos en 2000, combinado con la fenología reproductiva en ambos años.

El número de genotipos que contribuiría realmente en la cosecha del huerto semillero vendrá dado por el tamaño de población efectiva basado en la metodología descrita por Kang y Namkoong (1988), y modificado por la contribución genética según la fórmula:

$$N_e = \frac{1}{\sum_{i=1}^t G_i^2}$$

Resultados y discusión

El periodo de receptividad de la flor femenina en el huerto es mayor el primer año de estudio que el segundo. En 1999 tiene una duración de 35 días, del 16 de mayo al 19 de junio. En 2000, la receptividad dura 25 días, del 20 de mayo al 13 de junio. Probablemente las condiciones climatológicas frías y lluviosas del inicio de la primavera provocaron el acortamiento del periodo de receptividad. El estado de suelta de polen dura 21 días en 1999, del 23 de mayo al 12 de junio, y 26 días en el 2000, del 22 de mayo al 16 de junio (Figura 1).

Las curvas de intensidad de receptividad y emisión de polen (Figura 1) muestran que la fenología reproductiva femenina comienza antes que la emisión de polen en ambos años. Tampoco coincide el momento de máximo número de brotes receptivos con el máximo número de brotes soltando polen en ninguno de los dos años. En 1999 se produce un adelantamiento del máximo de estróbilos soltando polen con respecto al máximo de flores receptivas de 8 días. En 2000, el máximo de estróbilos soltando polen se retrasa con

respecto al máximo de receptividad femenina en 4 días. El comienzo de la primavera de 2000 es más lluvioso y fresco que en 1999 lo que es la posible razón de dicho retraso en la emisión de polen. (Fig1).

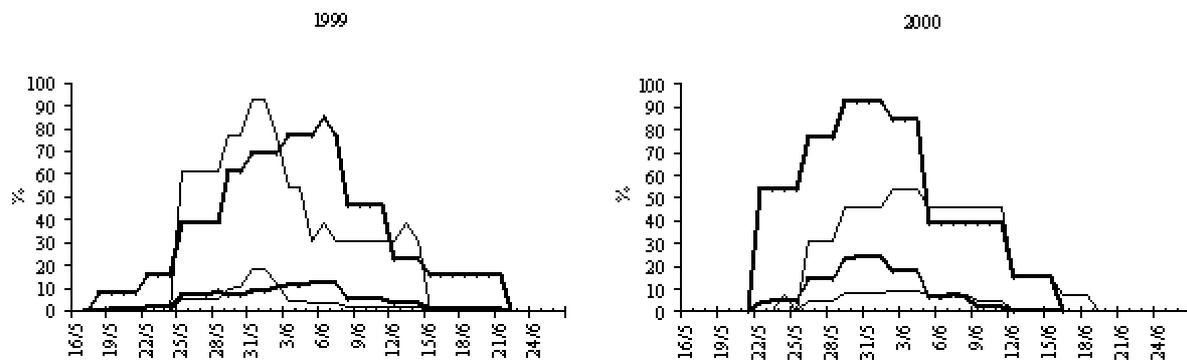


Figura 1.- Porcentaje de brotes con estróbilos femeninos receptivos (—) y estróbilos masculinos soltando polen (- - -) por día, sobre el total de muestreados. Porcentaje de clones participantes en la polinización recibiendo polen (+ + + +) y soltando polen (—) por día sobre el total de muestreados. 1999 y 2000.

El análisis de las variables inicio, fin y duración de fenología reproductiva muestra que existen diferencias significativas entre clones para el inicio del estado de receptividad femenina ($F=4.35$, $p<0.0005$), al igual que en Matziris (1994) para la misma especie. El genotipo explicaría un 29.7 por ciento de la variabilidad. Sin embargo, al contrario que en Matziris (1994), no se encuentra significación genotípica para el estado de inicio de emisión de polen. La falta de significación para la duración de ambos estados, receptividad y emisión de polen es registrada también por Griffin (1982) en *Pinus radiata*.

El fenograma (Fig. 2) referido a estróbilos masculinos y femeninos de los clones en estudio, representa el porcentaje de participación clonal a partir de las ramas de muestreo y muestra el índice de sincronización fenológica para todas las posibles parejas de clones.

El inicio de la receptividad clonal presenta un rango de valores más amplio en 1999 que en 2000. Como consecuencia, en 1999 los dos clones más tempranos comienzan el periodo de receptividad antes de que el huerto comience la emisión de polen. En este año los dos clones más tardíos permanecen receptivos una vez acabada la emisión de polen, perdiendo la posibilidad de ser polinizados. La sincronización de estados de receptividad y suelta de polen en 2000 es mayor (Figura 2). En 2000, el inicio del periodo de receptividad comienza de forma brusca para más del 50% de los clones, probablemente debido al cambio repentino de las condiciones climatológicas. Los clones que más tarde alcanzan el estado receptivo son los mismos para ambos años.

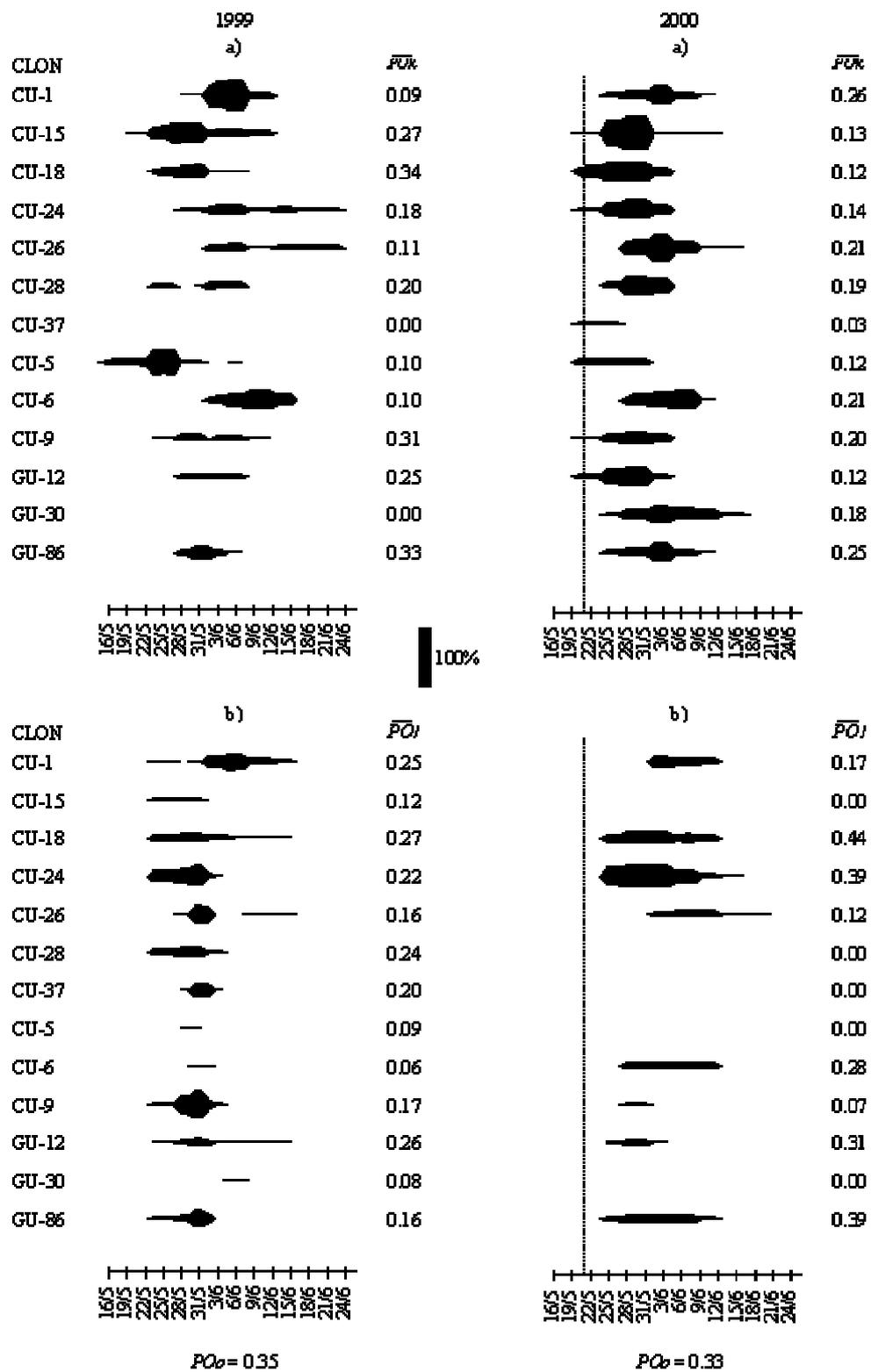


Figura 2.- Receptividad de estróbilos femeninos (a) y emisión de polen de estróbilos masculinos (b) en los clones de estudio en 1999 y 2000. El ancho de banda expresa el tanto por ciento en que participa el clon analizado en la fecha de observación. La línea vertical discontinua indica el inicio de la emisión de polen en el huerto.

Los índices de solapamiento (PO_{θ}) para el conjunto de los genotipos son similares en ambos años de estudio, en 1999 es de 0.35 y en 2000 de 0.33. Por otra parte, los bajos valores de solapamiento encontrados, frente al máximo teórico ($PO_{\theta}=1$) se pueden deber a la poca intensidad diaria de floración masculina y femenina registrada (con máximos de 12.6 y 18.1 por ciento respectivamente), y a la falta de floración femenina en los clones CU-37 y GU-30 en 1999. En 2000, el valor del índice sólo se justifica por la ausencia de floración masculina en el 38 por ciento de los clones del muestreo. No obstante, BURCZYK y CHALUPKA (1997) para *Pinus sylvestris* encuentran valores de 0.42 y 0.41 en sendos años de estudio. En 1999, los clones que presentan mayor índice de solapamiento (PO_k) actuando como femeninos son CU-18 y GU-86, 0.34 y 0.33 respectivamente. Los clones que tienen los mayores índices de solapamiento (PO_j) actuando como masculinos son CU-28, CU-1 y GU-12, 0.24, 0.25 y 0.26, respectivamente. Para el año 2000, los índices de solapamiento clonal femenino más altos los presentan los clones CU-1 y GU-86, 0.26 y 0.25. El clon GU-86 representa un aporte a la cosecha muy importante en ambos años. Los índices de solapamiento clonal masculino más altos en 2000 son GU-86, CU-24 y CU-18 con valores de 0.39, 0.39 y 0.44, respectivamente.

El conjunto del huerto presenta valores de equilibrio entre ambos sexos. El índice de masculinidad (M_i) calculado para 1999 sobre floración masculina y cosecha en peso y número de piñas es de 0.64 y 0.63 respectivamente. Para 2000, y sobre floración masculina y femenina es de 0.50. Lo que indican una alta simetría sexual de los clones.

El tamaño de población efectiva (N_e) para 1999 calculado sobre el número de brotes masculinos y el número de piñas maduras cosechadas en 2000 es 10.0, es decir el 77.0 por ciento de clones, mientras que para el peso de piña madura cosechada en 2000 es de 9.6, un 73.7 por cien. El tamaño de población efectiva para 2000 calculado sobre el número de brotes masculinos y el número de flores femeninas es 12.6, es decir que supondría un 97.3 por cien.

Conclusiones

- La simetría sexual presentada para el conjunto del huerto favorece la elevada participación clonal que se ha registrado en la plantación de estudio.
- Los valores de solapamiento fenológico son similares para los años de estudio, indicando un cierto grado de estabilidad interanual.
- El inicio de la receptividad femenina tiene una componente genética importante.

Agradecimientos

Este trabajo se engloba dentro del convenio de colaboración “Mejora y conservación y conservación de los recursos genéticos del género *Pinus* (1996-1999)” y “Conservación y mejora de recursos genéticos de coníferas (2000-2003)”, establecidos entre el Servicio de Material Genético (D.G.C.N.) y la Unidad Docente Anatomía, Fisiología, y Genética forestal (UPM). Así mismo, los trabajos corresponden al proyecto I+D SC99-028 “Control y aumento

cuantitativo y cualitativo de la producción de semilla en huertos semilleros de especies forestales” financiado por el INIA.

Queremos agradecer al Servicio de Material Genético y al Centro Nacional de Mejora Forestal “El Serranillo”, ambos de la Dirección General de Conservación de la Naturaleza, por la cesión de la plantación de estudio y por la enorme colaboración prestada facilitando todos los trabajos desarrollados. En especial, agradecemos a la dirección y personal de dicho Centro Nacional de Mejora Forestal la ayuda prestada.

Bibliografía

- ASKEW, G. R.; (1990). *Short note: an index of phenological overlap in flowering for clonal conifer seed orchards*. *Silvae Genetica* 39: 3-4.
- BURCZYK, J. & W. CHALUPKA; (1997). *Flowering and cone production variability and its effect on parental balance in a Scots pine clonal seed orchard*. *Ann. Sci. For.* 54: 129-144.
- GRIFFIN; (1982). *Clonal variation in radiata pine seed orchards. 1. Some flowering, cone and seed production traits*. *Aust. For. Res.* 12: 295-302.
- KANG, H. & G. NAMKOONG; (1988). *Inbreeding effective population size under some artificial selection schemes*. *Theor. Appl. Genet.* 75: 333-339.
- KJÆR, E. D. & H. WELLENDORF; (1997). *Variation in flowering and reproductive success in a Danish Picea abies Karst. seed orchard*. *Forest Genetics* 4(4): 181-188.
- LLOYD, D. G.; (1979). *Parental strategies of angiosperm*. *New Zealand Journal Botanic* 17: 595-606.
- MATZIRIS, D. I.; (1994). *Genetic Variation in the Phenology of Flowering in Black Pine*. *Silvae Genetica* 43: 5-6.
- POHOSKI, E.; (1977). *Recolte etconservation du pollen de Pinus pinaster*. Laboratoire d'amélioration desconifères et Domaine de L'Hermitage. INRA. Comunicación interna.
- XIE, G. R., J. WOODS et al. (1994). *Effects of seed orchard inputs on estimating effective population size of seedlots- A computer simulation*. *Silvae Genetica* 43: 2-3.