

# VARIABILIDAD CLONAL ANTE LA ESTIMULACIÓN DE LA FLORACIÓN MEDIANTE GIBERELINA A<sub>4/7</sub> EN UN HUERTO SEMILLERO DE *Pinus sylvestris* L.

**AUTORES:** J. A. Rodríguez<sup>1</sup>, S. Martín<sup>2</sup>, L. Gil<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Unidad de Anatomía, Fisiología y Genética Forestal. ETSI Montes, UPM. ETSI Montes. Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, España

<sup>2</sup> Servicio Material Genético. DGCN. Gran vía de San Francisco, 4. 28005 Madrid, España

## RESUMEN

En el presente trabajo se analizan los resultados de un ensayo de inducción floral mediante giberelina A<sub>4/7</sub> realizado en un huerto semillero de *Pinus sylvestris* en distintas fechas de 1997 y 1998.

Se comparan las floraciones de 1998 y 1999, con un incremento del número de ápices reproductores, tanto masculinos como femeninos. La influencia de la aplicación hormonal varía en función de la fecha de aplicación, del genotipo y de las condiciones climáticas del año.

La floración femenina de 1999 aumenta hasta un 249 % (aplicación del 13 de agosto de 1998) en un año en que la floración natural es escasa; frente al 41,9 % en 1998 (aplicación del 8 de agosto de 1997), año en que la floración natural es más elevada. La floración masculina se triplica en ambos años, como resultado de las primeras aplicaciones (mayo-junio).

Palabras clave: *Pinus sylvestris*, giberelina, inducción floral, variación clonal, huerto semillero.

## SUMMARY

A flower induction test by gibberellin A<sub>4/7</sub> has been carried out during 1997 and 1998 in a *Pinus sylvestris* seed orchard.

It is compared the 1998 and 1999 flowerings. The treatment shows a flower bud increment, as well in male and female flowering. The effect depends on the application date, the analysed genotype and on the weather conditions of the year.

In 1999 the female flowering increases in 249 % (application on 13<sup>th</sup> august, 1998), in a year with a low natural flowering; in front of 42 % increase (application on 8<sup>th</sup> august, 1997) in 1998, year with a high natural flowering.

In both years treatment triples the male flowering as a result of the earlier applications (on may-june).

KW: *Pinus sylvestris*, gibberellin, flower induction, clonal variability, seed orchard.

## INTRODUCCIÓN

La influencia de las giberelinas en la estimulación de flores y en la diferenciación sexual de la familia *Pinaceae* es conocida desde los años 70 por los trabajos de PHARIS y KUO publicados en 1977. No obstante, se han caracterizado hasta 90 tipos de GAs (TALÓN, 1993). Entre ellas, la giberelina A<sub>4/7</sub> parece ser la que induce una mayor floración en pino silvestre y la aplicación endógena se muestra como el método más eficaz (CHALUPKA, 1987).

La aplicación de giberelina A<sub>4/7</sub> es uno de los métodos más efectivos para incrementar la producción en huertos semilleros descritas en la bibliografía (PHILIPSON, 1996; BEAULIEU *et al.* 1998). Esta hormona es considerada un agente que induce cambios en la actividad mitótica de los meristemas apicales cuando la concentración de GA<sub>4/7</sub> excede a la demanda vegetativa (EYSTEINSSON & GREENWOOD; 1995), sin afectar a los rasgos de la piña en cuanto a tamaño y número de semillas (SHEARER *et al.* 1999).

La GA<sub>4/7</sub> aumenta la formación de estróbilos tanto masculinos como femeninos (LUUKKANEN & JOHANSSON, 1980; GREENWOOD, 1982), si bien sus efectos en la floración dependen del momento fenológico en el que se realice la aplicación (HARRISON & SLEE, 1991; DAOUST *et al.* 1995). La variación clonal, tanto en la intensidad de la respuesta a la hormona como

en el momento de mayor incremento, es una característica común en los resultados de inducción floral (TODHUNTER & POLK, 1981; SIREGAR & SWEET, 1996).

## MATERIAL Y MÉTODOS

La estimulación de la floración mediante giberelina  $A_{4/7}$  se llevó a cabo en dos años consecutivos (1997 y 1998) y en ocho clones de los 72 constituyen el huerto semillero de Valsaín. Es un huerto semillero de 5.04 ha de la región de procedencia Sierra de Guadarrama, situado en el Centro de Mejora Genética de Valsaín, dependiente de la DGCN y esta enfocado a la producción de semilla de calidad. Todos los ramets utilizados en el ensayo se injertaron entre los años 1987 y 88.

En el primer periodo de tratamiento (de 9 de junio hasta el 8 de septiembre de 1997) se realizaron diez inoculaciones, con una separación de diez días entre ellas y en dos ramets de cada clon. El segundo ensayo se realizó de modo análogo, aunque utilizado esta vez solo cuatro fechas de tratamiento (20 de mayo, 26 de junio, 13 de agosto y 23 de septiembre de 1998).

La hormona se inoculó en dosis de 15 mg de  $GA_{4/7}$  disueltos en 0.8 ml de etanol (al 96%). Dicha cantidad se inyectó en cada ramet, mediante cuatro orificios realizados en la base del tronco. Como control se utilizó cuatro ramets de cada clon, a los que se les inyectó 0.8 ml de etanol.



Figura 1: Aplicación de  $GA_{4/7}$  en un ramet

Los efectos de los tratamientos realizados durante 1997 y 1998 se recogen en la floración contabilizada en el verano de 1998 y 1999. El muestreo de la floración se realizó en dos ramas situadas en el tercio medio del árbol (zona en la que se podría encontrar una mayor influencia de la hormona en la diferenciación sexual) de orientaciones distintas, Norte-Sur y de aspecto similar en tamaño, grosor y número total de brotes. Se contabilizó en cada rama el número de brotes con presencia de estróbilos masculinos, de estróbilos femeninos y los brotes que no presentaban inflorescencias reproductoras. La valoración de los datos obtenidos de la floración se realizó mediante el porcentaje de brotes con presencia de estróbilos femeninos y masculinos. Los valores expresados en porcentajes se transformaron mediante  $\arcsen \sqrt{x}$ . Para el conjunto de clones y fechas de aplicación, se realizó un análisis de varianza con interacción entre los factores según un modelo de efectos fijos:

$$X_{ijk} = \mu + C_i + F_j + (CF)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$C_i$  = efecto del clon  $i$

$F_j$  = efecto de la fecha de aplicación  $j$

$(CF)_{ij}$  = interacción genotipo-fecha de tratamiento

$\varepsilon_{ijk}$  = error

La separación de grupos homogéneos (fechas de tratamiento con valores estadísticamente significativos en cada clon) se realizó mediante el test de rangos múltiples Tukey HSD (95%) y en los casos en los que el tamaño de muestra no era igual se empleó el test de Bonferroni para esta separación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1-Tratamientos de GA<sub>4/7</sub> en 1997: Influencia en el porcentaje de brotes reproductivos de 1998.

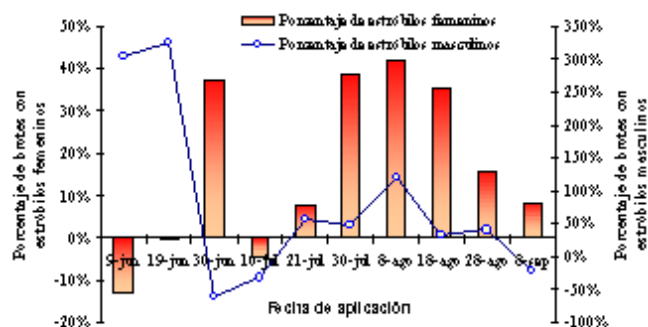


Figura 2: Incremento en el porcentaje de brotes reproductivos respecto al control en 1998.

En la figura 2 se muestra como los momentos fenológicos de inducción masculina y femenina son diferentes. La estimulación de la floración masculina se ha visto reflejada con las dos primeras fechas de aplicación (el 9 y 19 de junio), cuando la elongación del brote estaba entre un 60-70% de su desarrollo total, con valores en el porcentaje de estróbilos masculinos en la rama (21.94% y 23.11%) que son tres veces más elevados que los obtenidos de los controles (5.41%), pese a que solo los clones 3, 18 y 30 muestran valores estadísticamente significativos. Para el mismo momento fenológico, ERIKSSON *et al.* (1998) obtuvieron un incremento de solo el 90% en un huerto semillero de *Pinus sylvestris* en Suecia (de características similares al de Valsáin).

La inducción floral femenina, a diferencia de la masculina, se muestra en mayor o menor medida en todos los genotipos y en al menos uno de los diez tratamientos (tabla 1). Cinco de los clones estudiados en 1997 responden a la influencia de la hormona en las aplicaciones realizadas entre el 30 de julio y el 28 de agosto, mientras que los dos restantes (6 y 15) presentan antes el óptimo de aplicación (del 19 de junio al 10 de julio). Las diferencias se deben, posiblemente, a un distinto comportamiento fenológico entre clones, explicación señalada por SMITH y GREENWOOD (1995).

Tabla 1: Porcentaje medio de brotes con presencia de estróbilos femeninos y masculinos, respecto al total de brotes muestreados, por clon y fecha de aplicación de la hormona en 1998.

1998 Fech/clon	Porcentaje de estróbilos femeninos										Porcentaje de estróbilos masculinos									
	3	6	15	16	18	30	67	media	Desv	% respecto al control	3	6	15	16	18	30	67	media	Desv	% respecto al control
9-jun	17,86	29,86	2,20	43,13	8,04	22,52	32,64	23,75	12,3	-13,09%	<b>52,39</b>	2,43	4,83	12,53	<b>29,94</b>	<b>38,39</b>	13,09	<b>21,94</b>	<b>18,72</b>	<b>305,49%</b>
19-jun	29,22	<b>50,50</b>	28,42	-	20,60	13,38	20,93	27,18	12,82	-0,55%	<b>49,98</b>	9,92	0,99	-	13,08	<b>58,96</b>	5,73	<b>23,11</b>	<b>24,79</b>	<b>327,06%</b>
30-jun	17,09	<b>49,03</b>	<b>57,77</b>	50,11	18,36	28,49	42,08	<b>37,56</b>	<b>16,27</b>	<b>37,45%</b>	5,33	0,00	0,00	2,47	0,00	2,79	3,30	2,07	1,97	-61,71%
10-jul	9,52	<b>46,23</b>	<b>52,62</b>	27,59	4,64	7,60	24,29	26,07	17,9	-4,60%	1,68	2,03	4,54	5,57	4,54	5,39	1,74	3,64	1,75	-32,73%
21-jul	30,31	28,54	24,64	42,14	21,03	26,71	32,79	29,45	6,77	7,77%	10,28	11,92	3,84	2,63	2,75	14,89	13,46	8,54	5,32	57,82%
30-jul	22,09	39,14	23,97	<b>67,50</b>	25,55	32,08	<b>55,20</b>	<b>37,93</b>	<b>17,35</b>	<b>38,81%</b>	<b>23,83</b>	0,32	0,83	0,39	0,00	23,78	6,64	8	11,03	47,82%
8-ago	<b>34,28</b>	32,13	19,44	<b>69,89</b>	<b>26,72</b>	<b>50,19</b>	-	<b>38,78</b>	<b>18,34</b>	<b>41,89%</b>	22,98	1,78	4,21	3,89	<b>28,61</b>	10,44	-	11,98	11,22	121,47%
18-ago	<b>45,28</b>	30,47	7,37	<b>55,87</b>	<b>24,18</b>	35,78	<b>59,81</b>	<b>36,97</b>	<b>18,4</b>	<b>35,28%</b>	3,21	1,45	3,87	0,00	17,62	12,84	11,07	7,18	6,64	32,69%
28-ago	<b>73,69</b>	26,35	23,16	39,41	<b>22,42</b>	22,57	13,83	31,63	20,05	15,76%	1,81	0,61	7,93	2,24	24,28	10,97	5,17	7,57	8,23	39,91%
8-sep	<b>66,42</b>	15,99	25,94	38,11	3,86	-	27,36	29,62	21,42	8,37%	2,35	5,77	0,00	0,00	6,05	-	10,98	4,26	4,18	-21,30%
Control	25,53	27,9	22,97	37,55	12,75	36,61	27,98	27,33	8,43	-	0,2	4,2	2,11	7,96	5,52	3,67	14,22	5,41	4,59	-

\*Los porcentajes enmarcados con línea discontinua y en cursiva, expresan valores que difieren estadísticamente del control al 95%.

El máximo incremento en la floración femenina (42%) se alcanza con la aplicación del día 8 de agosto de 1997. Este incremento es inferior al 60% registrado por ERIKSSON *et al.* (1998) en un huerto semillero de la misma especie, pero está dentro del margen del 30 al 70% que se espera obtener con este tipo de estimulación floral (BONNET-MASIMBERT & WEBBER, 1995)

Las diferencias entre clones y fechas de tratamiento se muestran altamente significativas en el análisis de la varianza (tabla 2), así como una interacción significativa entre ambas variables. Aspecto éste que evidencia como cada genotipo tiene un momento óptimo en el que la respuesta es máxima. La variación atribuible al genotipo ha sido señalada por numerosos autores en *Pinus sylvestris* (CHALUPKA, 1987; BEAULIU *et al.* 1998).

Tabla 2: Análisis de varianza para el porcentaje de brotes con presencia de estróbilos femeninos y masculinos.1998

Tras: $y = \arcsin \sqrt{\frac{9}{100}}$		Porcentaje de brotes femeninos		Porcentaje de brotes masculinos	
Fuente	GL	cuadrados medios	Valor de F	cuadrados medios	valor de F
Clon	6	0,498263	103,22***	0,534473	42,20***
Fecha	9	0,157855	32,70***	0,320466	25,30***
Interacción Cl x fecha	54	0,108902	22,56***	0,0872111	6,89***
Error	210	0,0048274		0,0126658	

\*y \*\* Marcan diferencias estadísticamente significativas al 95% y 99% respectivamente

## 2- Tratamientos de GA<sub>4/7</sub> en 1998: Influencia en el porcentaje de brotes reproductivos de 1999.

Al igual que los resultados obtenidos con las aplicaciones de 1997, el aumento del porcentaje de brotes con estróbilos femeninos se ha observado principalmente en la primera aplicación (figura 3) y solo en tres genotipos (tabla 3), con un valor que triplica al encontrado en el control. Incremento este semejante al cuantificado el año anterior. La variación clonal es una de las características descritas con frecuencia en la literatura (LUUKKANEN & JOHANSSON, 1980; SIREGAR & SWEET, 1996).

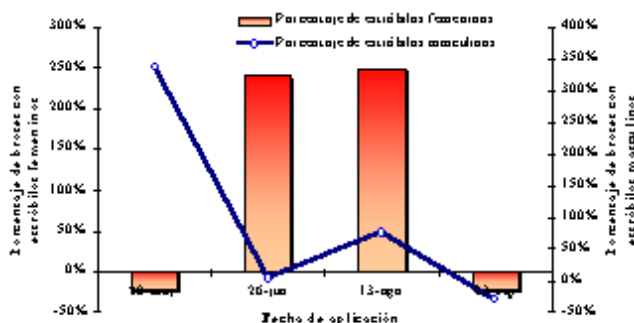


Figura 3: Incremento en el porcentaje de brotes reproductivos respecto al control en 1999.

Las aplicaciones realizadas al término de la elongación del brote, al igual que en el año anterior, incrementan la floración femenina respecto a los controles. El porcentaje medio de brotes con estróbilos femeninos ha presentado los mayores incrementos este segundo año, año coincidente con una floración muy baja en los controles, del orden de siete veces menor (el 3.6% de los brotes presentaban flores femeninas en 1998 frente al 27.3% en 1997).

Las aplicaciones realizadas en 1998 dieron lugar a incrementos en la floración, casi seis veces superiores a los registrados durante 1997 (tabla 3). Estos incrementos (240% y 249%) son muy superiores a los ya comentados para *Pinus sylvestris*. No obstante sí resultan comparables con el trabajo de GREENWOOD *et al.* (1991) en *Picea glauca* y *Picea mariana*, en el que la floración femenina se triplica para la primera y se multiplica por diez para la segunda.

Tabla 3: Porcentaje de brotes con estróbilos femeninos y masculinos respecto al total de brotes.1999

1999	Porcentaje de estróbilos femeninos	Porcentaje de estróbilos masculinos
------	------------------------------------	-------------------------------------

Fech/clo										% respecto al control												% respecto al control		
	6	15	16	18	27	30	59	67	media	Desv	respecto al control	6	15	16	18	27	30	59	67	media	Desv	respecto al control		
20-may	1.79	5.07	5.32	0.94	1.83	2.02	1.16	<b>4.48</b>	2.83	1.64	-21.50%	1.78	1.49	7.54	1.46	<b>27.4</b>	<b>38.3</b>	<b>22.3</b>	2.92	<b>12.9</b>	<b>7.36</b>	<b>337.45%</b>		
26-jun	<b>45.2</b>	<b>21.9</b>	<b>16.6</b>	0.71	1.73	<b>9.24</b>	1.52	1	<b>12.25</b>	<b>4.59</b>	<b>240.37%</b>	0.35	2.04	0.96	5.08	0.81	8.71	3.42	3.22	3.07	3.7	4.20%		
13-ago	5.31	5.31	<b>17.6</b>	<b>3.67</b>	<b>31.4</b>	<b>14.3</b>	0.77	<b>22</b>	<b>12.57</b>	<b>7.1</b>	<b>249.24%</b>	3.82	3.82	5.78	0.81	1.33	5.78	12.1	8.07	5.2	3.88	76.17%		
23-sep	1.59	3.56	1.65	0.4	9.63	3.8	1.13	0.81	2.82	2.81	-21.62%	0.24	3.69	0	1.97	1.4	5.78	1.39	2.28	2.1	1.99	-28.85%		
Control	5.66	5.67	5.42	1.25	3.23	1.82	0.45	1.19	3.6	2.21	-	0.41	4.76	2.19	3.38	2.02	5.78	1.18	3.92	2.95	1.83	-		

\* Los porcentajes enmarcados con línea discontinua y en cursiva, expresan valores que difieren estadísticamente del control al 95%.

Los análisis de la varianza volvieron a señalar diferencias significativas según la fecha de tratamiento. Asimismo el factor clon también resultó significativo, al igual que la interacción entre ambos efectos (tabla 4).

Tabla 4: Análisis de varianza para el porcentaje de brotes con presencia de estróbilos femeninos y masculinos. 1999

Tras: $y = \sqrt[3]{x} + \sqrt[3]{x+1}$		Porcentaje de brotes femeninos		Porcentaje de brotes masculinos	
Fuente	GL	Cuadrados medios	Valor de F	cuadrados medios	valor de F
Fecha	3	1.17299	78.97**	0.810034	49.34**
Clon	7	0.492097	33.13**	0.447424	27.25**
Interacción	21	0.357207	24.05**	0.199532	12.15**
Cl x fecha					
Error	340	0.014853		0.016417	

\*y \*\* Marcan diferencias estadísticamente significativas al 95% y 99% respectivamente

Por otro lado, se ha mostrado como los efectos de la hormona se ven incrementados en años de menor floración y en árboles donde ésta es más escasa (HARRISON & SLEE, 1991). Por tanto, su aplicación compensa la desigual floración de los genotipos del huerto, elevando el número efectivo de individuos (KJAER & WELLENDORF, 1997). Este aspecto unido al elevado incremento de la floración masculina conseguido, mejora la panmixia y disminuye el porcentaje de polen externo cuando se aplica a todo el huerto semillero (ERIKSSON *et al.* 1998). Aunque, las condiciones climáticas durante el año de tratamiento se muestran como el factor que más influye en la floración.

## CONCLUSIONES

La aplicación de giberelina  $A_{4/7}$  se presenta como un método eficaz para aumentar la producción del huerto semillero. Sin embargo sus efectos no solo dependen del estado fenológico en el momento de aplicación, sino también del genotipo y de las condiciones climáticas del año de tratamiento. Esta variación hace que sea difícil de predecir una respuesta general ante la estimulación floral.

La  $GA_{4/7}$  además de aumentar la producción, también compensa la desigual floración femenina entre los clones del huerto ya que los mayores incrementos se registran en los clones menos floríferos. La combinación con una aplicación hormonal poco después de la brotación que incremente la floración masculina, permite lograr una mayor diversidad genética de la semilla producida, al mejorar la floración de ambos sexos.

## BIBLIOGRAFIA

- BEAULIEU, J., DESLAURIERS, M. AND DAOUST, G.; (1998) *Flower induction treatments have no effects on seed traits and transmission of alleles in Picea glauca*. Tree physiology 18, 817-821.
- BONNET-MASIMBERT, M., WEBBER, J. E.; (1995) *From flower induction to seed production in forest tree orchards*. Tree Physiology 15, 419-426.
- CHALUPKA, W.; (1987) *Stimulation of flowering in Scots pine (Pinus sylvestris) Grafts by gibberellin injection*. Forest ecology and management 19, 177-181.
- DAOUST, G., PLOURDE, A., BEAULIEU, J.; (1995) *Influences of crown size and maturation on flower production and sex expression in Picea glauca treated with gibberellin A4/7*. Tree physiology 15, 471-475.
- ERIKSSON, U, JONSSON, G., ALMGUIST, C.; (1998) *Seed and pollen production after stem*

- injections of gibberellin A4/7 in field-grown seed orchard of Pinus sylvestris*. Can. J. Res. 28: 340-346.
- EYSTEINSSON, T., GREENWOOD M.S.; (1995) *Flowering on long shoots of Larix laricina in response to differential timing of GA4/7 applications*. Tree physiology 15, 467-469.
- GREENWOOD, M. S.; (1991) *Stimulation of flowering by grafted black spruce and white spruce: a comparative study of effects of gibberellin A 4/7, cultural treatments, and environment*. Can. J. For. Res. 21: 395-400.
- GREENWOOD, M. S.; (1982) *Rate, timing, and mode of gibberellin application for female strobilus production by grafted loblolly pine*. Can. J. For. Res. 12: 998-1002.
- HARRISON, D. L., SLEE, M. U.; (1991) *Gibberellin A 4/7 enhanced flowering in Pinus caribaea Var. hondurensis*. Can. J. For. Res. 21: 788-793.
- KJAER, E. D., WELLENDORF, H.; (1997) *Variation in flowering and reproductive success in a Danish Picea abies (Karst.) seed orchards*. Forest genetics 4: 181-188.
- LUUKKANEN, O., JHOHANSSON, S.; (1980) *Effect of exogenous gibberellins on flowering in Pinus sylvestris grafts*. Physiol. Plant. 50: 365-370.
- PHARIS, R. P., KUO, C. G.; (1977) *Physiology of gibberellins in conifers*. Can. J. For. Res. 7(2): 299-325.
- PHILIPSON, J. J.; (1996) *Effects of girling and gibberellin A4/7 on flowering of european and japanese larch grafts in an outdoor clone bank*. Can. J. For. Res. 26, 355-359.
- SHEARER, R. C., STROEHR, M. U., WEBBER, J. E., ROSS, S. D.; (1999) *Seed cone production enhanced by injecting 38-year- old Larix occidentalis Nutt. With GA4/7*. New Forest 18: 289-300
- SIREGAR, I. Z., SWEET, G. B.; (1996) *Optimal timing of gibberellin A4/7 application to increase female strobilus numbers in a Pinus radiata seed orchard*. New Zealand Journal of Forestry Science 26(3): 339-347.
- SMITH, R., GREENWOOD, M.; (1995) *Effects of gibberellin A4/7, root pruning and cytokinins on seed and pollen cone production in black spruce (Picea mariana)*. Tree Physiology 15. 457-465.
- TALÓN, M.; (1993) *Fisiología y bioquímica vegetal*. McGraw-Hill-Interamericana de España. Madrid. 301-318
- TODHUNTER, M. N., POLK, R. B.; (1981) *Seed and cone production in a clonal orchard of jack pine (Pinus banksiana)*. Can. J. For. Res. Vol 11: 512-516.