

VARIABILIDAD CLONAL DE LA FENOLOGÍA DE REPRODUCCIÓN Y DE LA ABUNDANCIA DE FLORACIÓN EN UN HUERTO SEMILLERO DE *P. pinaster*. Ait.

E. MERLO¹; R. ZAS¹; F. LARIO²

(1): Departamento de Producción y Mejora Genética Forestal. CIFA Lourizán. Apdo Correos 127. 36080. Pontevedra.

(2): Unidad de Anatomía, Fisiología y Genética, ETSIM, Ciudad Universitaria s/n 28040 Madrid, España.

RESUMEN

Se estudian las variaciones clonales de las características de floración y de fructificación en un huerto semillero clonal de *P. pinaster* Ait. compuesto de 116 clones. El estudio se ha realizado durante el período reproductivo en 1999, sobre 4 ramets de una muestra de 28 clones seleccionados al azar. La representación gráfica de los fenogramas de todos los clones muestra el alto grado de probabilidad de cruzamiento en la polinización. Para cuantificar el grado de sincronización reproductiva, se utiliza el índice de sincronización fenológica (Index of Phenological Overlap) calculado para todas las posibles parejas de clones y con valores aceptables en la mayoría de los casos. La asimetría sexual en la contribución clonal, se calcula mediante el índice de maleness propuesto por Lloyd en 1979. Se obtiene la contribución proporcional de gametos masculinos y femeninos. La talla de la población efectiva es relativamente alta para el periodo de estudio.

P.C.: huerto semillero, sincronización fenológica, población efectiva, *Pinus pinaster* Ait

SUMMARY

Clonal differences in flowering and cone production patterns was studied in a *Pinus pinaster* Ait. seed orchard in Galicia (NW Spain). Flowering phenology of 4 ramets of 21 random selected clones was investigated every 2-3 days over a reproductive period in 1999. Phenograms of all clones showed a high probability of crossing pollination. Reproductive synchronicity was evaluate trough the index of phenologic overlap, calculated for any possible pair of mating clones. This index showed acceptable values in most of cases. Sexual asymmetry of clonal contribution was estimated by the maleness index. Male and female strobili relative contribution was calculated for each clone. Inbreeding effective population number of the orchard was relative high in the period studied.

K.W.: seed orchard, reproductive synchronicity, effective population number, *Pinus pinaster* Ait

INTRODUCCIÓN,

La calidad de la semilla utilizada es el primer eslabón para asegurar el éxito de las plantaciones. La utilización de material mejorado genéticamente, como garantía de calidad, es una técnica generalmente aceptada y recogida en la legislación forestal que promueve y regula su empleo. Los huertos semilleros se crean como material de base selecto para la obtención de material vegetal de reproducción sexual.

El conocimiento de la fenología reproductiva se hace imprescindible en el seguimiento operativo de un huerto semillero, pues de ella depende el intercambio genético entre los distintos clones. Así mismo la participación clonal en la producción de estróbilos femeninos y masculinos va a determinar la mayor o menor variabilidad genética de la cosecha. Actualmente existen numerosos índices capaces de evaluar las condiciones de funcionamiento de un huerto semillero.

MATERIAL Y MÉTODOS:

El huerto semillero de *Pinus pinaster* Ait de Sergude se encuentra situado a 10 Km al S.E. de Santiago de Compostela en el municipio de Boqueixón, provincia de La Coruña. Están representados 116 clones seleccionados en la región de procedencia costera de Galicia en base a caracteres fenotípicos superiores de crecimiento y forma, y reproducidos por injerto. Los árboles están dispuestos a marco regular de 5 x 5 m bajo un diseño de 10 bloques completos al azar con vecindades permutadas. La instalación del huerto comenzó en 1990, aunque la edad de los clones

desde el injerto es muy variable. Actualmente es el único huerto semillero en producción de Galicia.

Se realiza el seguimiento fenológico de floración sobre 28 clones seleccionados al azar y en 4 repeticiones dentro del huerto. En cada uno de los árboles, se seleccionan 10 brotes en la orientación sur de la copa: 5 en la parte superior para el seguimiento de estróbilos femeninos y 5 en la parte inferior para el seguimiento de estróbilos masculinos. Durante un periodo aproximado de un mes y con una frecuencia de dos-tres días se realiza el seguimiento individual de dichos brotes, anotando el estado fenológico de los mismos desde el momento de elongación de yemas hasta el final del periodo reproductivo. Los estados fenológicos reproductivos se definen siguiendo la descripción de MATZIRIS (1994) y POHOSKI (1977).

Los datos de fenología obtenidos nos permitirán conocer para cada fecha qué porcentaje de brotes monitorizados se encontraban en un estado fenológico u otro.

Se cuantifica el grado de sincronización reproductiva para todas las posibles parejas de clones, mediante el índice de sincronización fenológica (*Index of Phenological Overlap*) descrito por ASKEW (1990).

$$PO_{jk} = \frac{\sum_{i=1}^n (S_{ijk} - \Delta_{ijk})}{\sum_{i=1}^n S_{ijk}} \quad (1)$$

donde s_{ijk} es el valor más alto que resulta de comparar en la observación del día i , la proporción de brotes monitorizados del clon j emitiendo polen y la proporción de brotes monitorizados del clon k receptivos; Δ_{ijk} es la diferencia en valor absoluto de las dos proporciones.

Se cuantifica la producción de estróbilos de ambos sexos mediante el conteo de los mismos sobre el total de la copa en todos y cada uno de los árboles incluidos en el estudio. El cálculo de la contribución gamética de cada clon, se obtiene asociando la sincronización fenológica de cada posible pareja de clones, con la producción de estróbilos masculinos y femeninos (XIE et al, 1994)

$$\begin{aligned} \text{a) } GC_{ji} &= \frac{(RDP_{ji} \times PS_j)}{\sum_{i=1}^n (RDP_{ji} \times PS_j)} \times PM_j & \text{b) } GC_{ji} &= \frac{(RDP_{ji} \times PM_j)}{\sum_{i=1}^n (RDP_{ji} \times PM_j)} \times PS_j \end{aligned} \quad (2)$$

Siendo RDP_{ji} el nº de días con solapamiento fenológico entre el clon j y el clon i ; PS es la proporción de estróbilos femeninos del clon respecto al total; PM es la proporción de estróbilos masculinos del clon respecto al total.

La contribución gamética clonal (masculina +femenina) vendrá dado por :

$$G_j = (\sum_{i=1}^n GC_{ji} + \sum_{i=1}^n GC_{ij}) / 2 \quad (3)$$

La asimetría sexual se valora utilizando el índice de masculinidad (*Maleness index*) descrito por LLOYD (1979).

$$M_i = \frac{PM_i}{PS_i + PM_i} \quad (4)$$

El número de genotipos que contribuye realmente en la cosecha del huerto semillero se valora mediante el tamaño de población efectiva descrita por KANG & NAMKOONG (1988) y modificado por XIE et al (1994).

$$N_e = \frac{1}{\sum_i G_i^2} \quad (5)$$

RESULTADOS

Fenología reproductiva. Los fenogramas de receptividad de estróbilos femeninos y emisión de polen de estróbilos masculinos muestran una alta probabilidad de polinización para el conjunto de clones (Fig. 1). El periodo de receptividad femenina presenta una mayor homogeneidad en el total de los clones estudiados que la emisión de polen. En el primer caso destacan dos clones más precoces frente al resto (clones 1006 y 1046) y dos clones más tardíos (1043 y 1042). Los máximos de receptividad se agrupan principalmente en dos fechas, 30/03/99 y 05/03/99. La emisión de polen empieza en general antes que la receptividad y tiene una mayor duración. Los clones más tardíos en la emisión de polen son el 1000, 2051 y 2077 (Fig.1).

Los periodos de receptividad y emisión de polen están sincronizados para la mayoría de los clones. Sin embargo, la posibilidad de cruzamiento entre todas y cada una de las posibles parejas de clones es difícil de determinar con la simple observación del fenograma. Para obtener un dato cuantitativo de solapamiento fenológico se calcula el índice de sincronización fenológica.

El índice de solapamiento fenológico medio para el conjunto de clones es de 0.49 con una desviación estándar de 0.20. Este dato se ajusta a los obtenidos en otros huertos (BURCZYK & CHALUPKA, 1997). De las 756 combinaciones posibles entre clones tan sólo existen 18 sin posibilidad de cruzamiento (Fig. 2). El 82% de los clones receptivos tiene posibilidad de polinizarse con todos los genotipos representados. Los clones con mayor probabilidad de ser polinizados por el total de genotipos son 1037, 2007 y A con valores de POf de 0.67, 0.66 y 0.67 respectivamente. El 75% de los clones tiene posibilidad de polinizar a todos los genotipos representados. Los clones que más intervienen en la polinización del conjunto son 1043, 2007 y 2061 con valores de POM de 0.62, 0.60 y 0.63 respectivamente. Los clones polinizados por un menor número de genotipos son 1000, 1042, 1043, 2051 y 2057 coincidiendo 4 de ellos con los clones de fenología reproductiva femenina más tardía (Fig. 2).

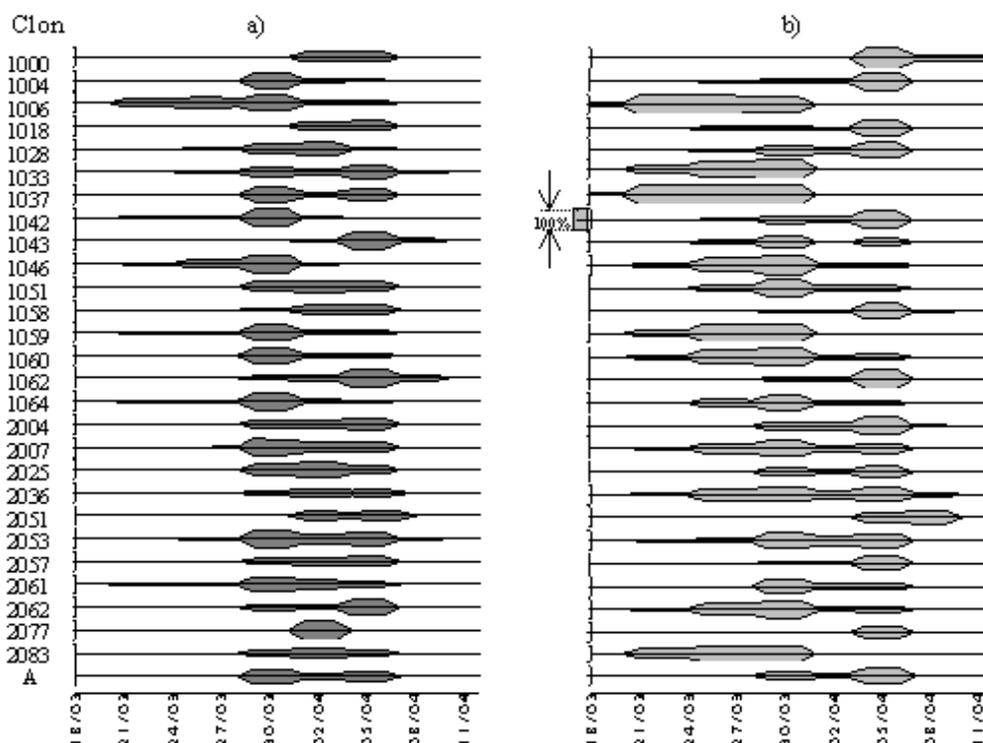


Fig 1: Receptividad de estróbilos femeninos (a) y emisión de polen de estróbilos masculinos (b) en 28 clones del huerto semillero de *Pinus pinaster* Ait. en Sergude durante marzo-abril de 1999. La altura de las bandas horizontales representa el porcentaje de ramas observadas que alcanzan el estado fenológico reproductivo en estudio.

| PO _{fem} | Emisión de polen de estróbilos masculinos | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | PO _m |
|-------------------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----------------|
| | 1000 | 1004 | 1006 | 1018 | 1020 | 1033 | 1037 | 1042 | 1043 | 1046 | 1051 | 1058 | 1059 | 1060 | 1062 | 1064 | 2004 | 2007 | 2025 | 2036 | 2051 | 2053 | 2057 | 2061 | 2062 | 2077 | 2083 | A | |
| 1000 | | .51 | 0 | .59 | .63 | .10 | 0 | .57 | .72 | .52 | .42 | .60 | 0 | .63 | .48 | .31 | .51 | .92 | .80 | .70 | .98 | .67 | .65 | .69 | .58 | .74 | 0 | .56 | .51 |
| 1004 | .48 | | .99 | .17 | .31 | .82 | .81 | .30 | .57 | .69 | .80 | .54 | .81 | .71 | .11 | .73 | .26 | .64 | .32 | .49 | .10 | .53 | .65 | .70 | .74 | .73 | .81 | .68 | .49 |
| 1006 | .20 | .20 | | .28 | .33 | .75 | .59 | .31 | .50 | .73 | .75 | .15 | .68 | .77 | .20 | .82 | .35 | .67 | .44 | .63 | .43 | .47 | .17 | .87 | .74 | .31 | .67 | .73 | .51 |
| 1018 | .50 | .52 | .10 | | .49 | .89 | .83 | .46 | .39 | .22 | .21 | .61 | .83 | .27 | .50 | .20 | .44 | .44 | .58 | .42 | .94 | .40 | .67 | .33 | .26 | .77 | .83 | .23 | .38 |
| 1020 | .16 | .25 | .31 | .28 | | .32 | .28 | .46 | .64 | .38 | .54 | .15 | .28 | .38 | .21 | .56 | .39 | .39 | .50 | .38 | .34 | .44 | .17 | .63 | .41 | .25 | .29 | .39 | .36 |
| 1033 | .56 | .62 | .34 | .73 | .87 | | .31 | .82 | .65 | .37 | .44 | .59 | .31 | .40 | .59 | .42 | .79 | .56 | .84 | .65 | .38 | .82 | .63 | .55 | .41 | .91 | .32 | .38 | .57 |
| 1037 | .57 | .46 | .89 | .52 | .69 | .49 | | .65 | .74 | .61 | .64 | .40 | .71 | .69 | .43 | .62 | .59 | .90 | .74 | .90 | .82 | .87 | .43 | .79 | .69 | .88 | .71 | .62 | .67 |
| 1042 | 0 | .24 | .33 | .33 | .46 | .51 | .37 | | .69 | .60 | .85 | .44 | .47 | .58 | .18 | .57 | .44 | .66 | .44 | .56 | 0 | .85 | .58 | .82 | .66 | 0 | .42 | .63 | .44 |
| 1043 | .80 | .93 | 0 | .94 | .87 | .57 | 0 | .96 | | .29 | .23 | .81 | 0 | .34 | .88 | .17 | .82 | .59 | .69 | .81 | .45 | .82 | .84 | .38 | .32 | .74 | 0 | .30 | .52 |
| 1046 | .10 | .15 | .47 | .23 | .27 | .67 | .50 | .26 | .52 | | .80 | .82 | .63 | .72 | .14 | .80 | .27 | .68 | .33 | .60 | .21 | .49 | .93 | .69 | .80 | .15 | .57 | .78 | .44 |
| 1051 | .48 | .47 | .60 | .54 | .74 | .36 | .48 | .70 | .76 | .49 | | .40 | .48 | .56 | .43 | .56 | .62 | .72 | .81 | .69 | .99 | .65 | .44 | .66 | .56 | .73 | .48 | .50 | .59 |
| 1058 | .52 | .60 | .20 | .65 | .57 | .14 | .16 | .53 | .45 | .27 | .26 | | .16 | .32 | .59 | .26 | .51 | .52 | .68 | .49 | .90 | .46 | .64 | .39 | .31 | .80 | .16 | .28 | .44 |
| 1059 | .23 | .25 | .32 | .28 | .44 | .40 | .31 | .42 | .67 | .55 | .78 | .17 | | .53 | .21 | .57 | .36 | .58 | .44 | .47 | .48 | .63 | .18 | .85 | .62 | .35 | .36 | .57 | .44 |
| 1060 | .25 | .27 | .47 | .29 | .45 | .45 | .43 | .43 | .69 | .58 | .76 | .18 | .43 | | .23 | .57 | .38 | .60 | .46 | .50 | .53 | .64 | .20 | .88 | .63 | .38 | .43 | .59 | .47 |
| 1062 | .97 | .94 | .30 | .87 | .71 | .15 | .24 | .77 | .37 | .25 | .24 | .59 | .24 | .29 | | .24 | .72 | .43 | .62 | .56 | .52 | .55 | .66 | .34 | .28 | .68 | .24 | .26 | .48 |
| 1064 | .71 | .17 | .36 | .24 | .31 | .50 | .37 | .30 | .60 | .56 | .80 | .67 | .46 | .53 | .12 | | .26 | .54 | .32 | .45 | .15 | .57 | .78 | .69 | .62 | .11 | .42 | .57 | .38 |
| 2004 | .55 | .55 | .50 | .64 | .79 | .29 | .40 | .74 | .65 | .42 | .42 | .49 | .40 | .48 | .51 | .46 | | .68 | .95 | .69 | .86 | .64 | .53 | .56 | .48 | .85 | .40 | .43 | .57 |
| 2007 | .47 | .38 | .99 | .44 | .59 | .57 | .79 | .56 | .76 | .71 | .74 | .32 | .79 | .79 | .35 | .63 | .51 | | .63 | .79 | .99 | .82 | .34 | .86 | .79 | .73 | .79 | .72 | .66 |
| 2025 | .40 | .38 | .75 | .44 | .62 | .46 | .60 | .58 | .94 | .61 | .63 | .31 | .60 | .69 | .35 | .71 | .52 | .76 | | .73 | .85 | .68 | .34 | .81 | .69 | .62 | .60 | .62 | .60 |
| 2036 | .32 | .40 | .40 | .48 | .53 | .28 | .32 | .50 | .67 | .43 | .44 | .32 | .32 | .51 | .36 | .48 | .48 | .48 | .64 | | .68 | .43 | .35 | .59 | .50 | .49 | .32 | .44 | .45 |
| 2051 | .20 | .21 | 0 | .24 | .26 | .25 | 0 | .24 | .58 | .80 | 1 | .25 | 0 | .67 | .20 | .75 | .21 | .38 | .33 | .29 | | .28 | .27 | .60 | .71 | .31 | 0 | .75 | .36 |
| 2053 | .55 | .48 | .49 | .53 | .66 | .42 | .48 | .63 | .63 | .52 | .64 | .44 | .48 | .56 | .44 | .46 | .59 | .70 | .67 | .69 | .44 | | .44 | .72 | .58 | .10 | .48 | .54 | .57 |
| 2057 | .52 | .57 | .38 | .67 | .69 | .23 | .30 | .65 | .58 | .36 | .36 | .51 | .30 | .43 | .52 | .39 | .62 | .62 | .83 | .60 | .90 | .56 | | .50 | .42 | .80 | .30 | .38 | .52 |
| 2061 | .24 | .26 | .34 | .36 | .43 | .42 | .33 | .41 | .79 | .59 | .82 | .18 | .41 | .56 | .23 | .66 | .38 | .64 | .47 | .54 | .51 | .70 | .20 | | .65 | .37 | .38 | .60 | .46 |
| 2062 | .76 | .78 | .35 | .90 | .87 | .19 | .28 | .81 | .46 | .30 | .30 | .74 | .28 | .35 | .72 | .30 | .78 | .51 | .76 | .67 | .62 | .65 | .76 | .41 | | .86 | .28 | .31 | .56 |
| 2077 | .1 | .11 | 0 | .12 | .13 | .50 | 0 | .12 | .29 | .40 | .50 | .13 | 0 | .33 | .1 | .67 | .11 | .19 | .17 | .15 | .21 | .14 | .14 | .30 | .36 | | 0 | .38 | .21 |
| 2083 | .26 | .35 | .46 | .41 | .53 | .33 | .37 | .49 | .66 | .49 | .50 | .26 | .37 | .53 | .31 | .57 | .47 | .48 | .63 | .46 | .56 | .43 | .29 | .58 | .54 | .40 | | .50 | .45 |
| A | .47 | .38 | 1 | .43 | .58 | .58 | .80 | .55 | .76 | .72 | .75 | .32 | .80 | .80 | .35 | .63 | .50 | .96 | .62 | .78 | .99 | .81 | .34 | .86 | .80 | .72 | .80 | | .67 |
| PO _m | .38 | .42 | .42 | .47 | .55 | .38 | .36 | .53 | .62 | .50 | .58 | .34 | .39 | .53 | .36 | .52 | .48 | .60 | .58 | .58 | .59 | .59 | .37 | .63 | .56 | .56 | .38 | .51 | 0.49 |

Fig. 2: Índices de Solapamiento Fenológico (Index of Phenological Overlap) de 28 de clones de *Pinus pinaster* Ait del huerto semillero de Sergude obtenidos en 1999. En el interior de la tabla se muestran los valores de los índices obtenidos enfrentando la fenología reproductiva femenina y masculina de cada pareja de clones. Los valores varían de 0 (mínimo) a 1 (máximo). A la derecha de la matriz se representa el índice medio clonal de solapamiento fenológico femenino x masculino. En la parte inferior de la matriz aparecen los valores del índice medio clonal de solapamiento fenológico masculino x femenino. En la esquina inferior derecha se muestra el índice de solapamiento medio calculado para el conjunto de los 28 clones. Dentro de la matriz, se señalan en negrita los índices con valores por encima de la media obtenida para el conjunto.

Participación clonal. El 25% de los clones produce el 51% de estróbilos femeninos, el 44% de estróbilos masculinos y aportan el 45% de contribución gamética (Fig. 3). Este desequilibrio se debe fundamentalmente a la gran heterogeneidad en edad desde el injerto de los distintos clones. El índice de contribución gamética varía de 0.004 en el clon 2025 a 0.075 en 2036, siendo la contribución gamética óptima por clon de 0.035.

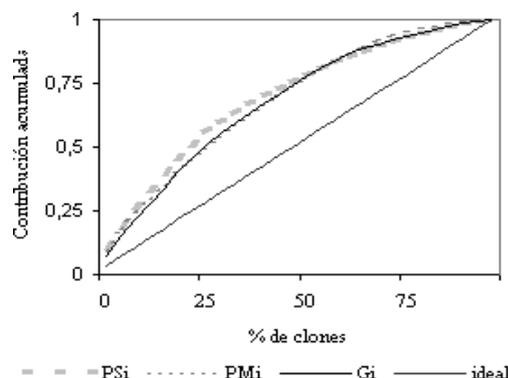


Fig. 3: Participación acumulada de la producción de estróbilos femeninos masculinos y de la contribución gamética clonal sobre 28 clones del huerto semillero de Sergude. La diagonal representa la acumulada ideal para que se produzca la panmixis

Asimetría sexual. El índice de masculinidad medio obtenido para el huerto es de 0.49 con una desviación típica de 0.15, lo que indica que la contribución masculina en el huerto es equivalente a la

contribución femenina sin que exista una asimetría sexual marcada en el conjunto de clones en estudio. El rango de variación obtenido para el índice de masculinidad (M_i) calculado en todos los clones varía de 0.7 a 0.17. Un 50% de los clones estudiados presentan asimetría sexual aunque nunca con valores muy altos, si comparamos con los obtenidos por otros autores (KANG, 2000) (Fig. 4).

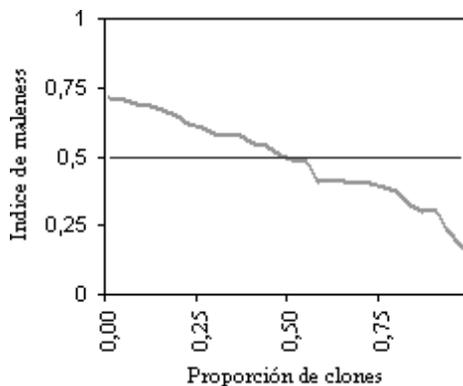


Fig. 4. Índices de masculinidad (M_i) calculados individualmente por clon. La línea horizontal muestra una contribución clonal equivalente en ambos sexos.

Población efectiva. El número efectivo de clones respecto a los 28 estudiados que aportan su contribución gamética a la semilla cosechada es de 21, representando el 75% de la población muestreada, asegurando así una variabilidad genética suficiente en la semilla producida, aunque por debajo de los valores encontrados en otros huertos (BURCZYK & CHALUPKA, 1997).

CONCLUSIONES

Existe una gran sincronización en la fenología reproductiva del huerto semillero de Sergude de *Pinus pinaster* Ait. lo que favorece la posibilidad de cruzamiento entre todos los clones representados.

No se observa una asimetría sexual marcada en el conjunto del huerto asegurándose la existencia de polen suficiente para realizar la polinización de los estróbilos femeninos.

La participación clonal es variable tanto en la producción de estróbilos femeninos como masculinos. Este desequilibrio origina una gran heterogeneidad en la contribución gamética clonal a pesar de la alta sincronización reproductiva, lo que disminuye la variabilidad genética en la cosecha. El número efectivo de clones se estima en un 75% de los analizados.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se engloba dentro del 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.

Agradecemos su colaboración a todo el personal del Departamento de Producción y Mejora Genética Forestal del CIFA Lourizán que participó en la toma de datos de este estudio.

BIBLIOGRAFIA

- 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.
- KANG, H. & G. NAMKOONG; (1988). *Inbreeding effective population size under some artificial selection schemes*. *Theor Appl Genet* **75**: 333-339.
- KANG, K. S.; (2000). *Clonal and annual variation of flower production and composition of gamete gene pool in a clonal seed orchard of Pinus densiflora*. *Can. J. For. Res.* **30**: 1275-1280.
- 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, STOEHR M.; (1994). *Effects of seed orchard inputs on estimating effective population size of seedlots- A computer simulation*. *Silvae Genetica* **43**: 2-3.