



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN CIENCIAS FORESTALES

FENOLOGÍA REPRODUCTIVA Y RIESGO DE
CONTAMINACIÓN GENÉTICA EN UN HUERTO
SEMILLERO DE *Pinus patula*

LILIANA MUÑOZ GUTIÉRREZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2017

La presente tesis, titulada: **Fenología reproductiva y riesgo de contaminación genética en un huerto semillero de *Pinus patula*** realizada por la alumna: **Liliana Muñoz Gutiérrez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

EN CIENCIAS FORESTALES

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. J. Jesús Vargas Hernández

ASESOR



Dr. Javier López Upton

ASESOR



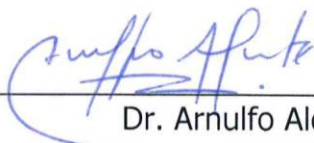
Dr. Carlos Ramírez Herrera

ASESOR



Dr. Marcos Jiménez Casas

ASESOR



Dr. Arnulfo Aldrete

ASESOR



Dr. Ramón Díaz Ruíz

Montecillo, Texcoco, Estado de México, mayo de 2017

FENOLOGÍA REPRODUCTIVA Y RIESGO DE CONTAMINACIÓN GENÉTICA EN UN HUERTO SEMILLERO DE *Pinus patula*

Liliana Muñoz Gutiérrez, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN GENERAL

Los huertos semilleros son fuente importante de germoplasma para producir plantas de calidad genética para los programas de plantaciones comerciales que sean más productivas y mejor adaptadas a su ambiente. El objetivo fue evaluar algunos de los factores que influyen en la eficiencia genética de un huerto semillero y las implicaciones en la producción de semillas de mayor calidad, en términos de ganancia y diversidad genética. Se demostró que la cantidad de polen presente en el huerto semillero de *Pinus patula* es mayor que en los rodales naturales, el periodo de dispersión inicia antes y existe un traslape con el periodo de dispersión del polen de rodales naturales. Sin embargo, no hay diferencias en los eventos fenológicos de receptividad femenina y liberación de polen en el huerto. Existe una amplia variación genética entre los clones del huerto y una moderada correlación genotípica y fenotípica entre el inicio del periodo de receptividad y de liberación de polen, lo que indica que los procesos no son independientes y sugiere riesgos de autofecundación. El control genético elevado y la estabilidad genética de los clones en la fenología reproductiva femenina y masculina indican que el riesgo de contaminación genética varía entre clones según su precocidad. No obstante, los clones con un periodo temprano de receptividad tienen menos riesgo de contaminación por polen externo. Los valores del índice de sincronización de la receptividad femenina con el polen del mismo clon ($\bar{O}_i\bar{P}_i$) y con el polen de los otros clones del huerto ($\bar{O}_i\bar{P}_j$) variaron ampliamente entre clones, pero sin diferencias entre grupos de clones clasificados por su precocidad fenológica, los índices no fueron consistentes entre ciclos reproductivos. Existe un desbalance en la contribución de los clones a la cosecha de conos femeninos. A pesar de ello, los clones más prolíficos tienen menor índice de sincronización con el polen externo de los rodales naturales y tienden a ser los clones más tempranos en cuanto al inicio del periodo de receptividad femenina.

Palabras clave: contaminación genética, fenología reproductiva, flujo genético, variación genética, heredabilidad, sincronización fenológica, fecundidad.

**REPRODUCTIVE PHENOLOGY AND GENETIC CONTAMINATION RISK IN A
SEED ORCHARD OF *Pinus patula***

**Liliana Muñoz Gutiérrez, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2017**

GENERAL ABSTRACT

Seed orchards are an important source of germplasm to produce genetic quality plants for commercial plantation programs, more productive and better adapted to their environment. The objective was to evaluate some factors that influence on genetic efficiency of a seed orchard, and the implications of the quality seed production with gain and diversity genetic. The amount of pollen present in the seed orchard of *Pinus patula* is higher than in the natural stands, dispersal period started earlier and there is an overlap with the period of pollen dispersal of natural stands. However, there are no differences between female receptivity and pollen dispersal in the orchard. There is a wide genetic variation, moderate genotypic and phenotypic correlation between the start of the period of receptivity and pollen dispersal between clones, indicating that the processes are not independent and suggest self-fertilization risk. The high genetic control and genetic stability of clones in female and male reproductive phenology indicate that the risk of genetic contamination varies among clones according to their precocity. However, clones with an early period of receptivity have less risk of contamination by external pollen. Synchronization index values of the female receptivity with pollen of the same clone ($\bar{O}_i\bar{P}_i$) and with pollen of the other clones of the orchard ($\bar{O}_i\bar{P}_j$) varied widely among clones, but without differences between groups of clones classified by their phenological precocity, the indices were not consistent between reproductive cycles. There is an imbalance in the contribution of the clones to the harvest of female cones. In spite of this, the most prolific clones have a lower index of synchronization with the external pollen of the natural stands and tend to be the earliest clones in the beginning of the period of female receptivity.

Key words: Genetic contamination, reproductive phenology, gene flow, genetic variation, heritability, phenological synchronization, fecundity.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) porque a través de su programa de Becas para estudios de Postgrado fue posible realizar con éxito y calidad mis estudios de Doctorado en Ciencias, y por favorecerme en la realización de una estancia de investigación en el extranjero.

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo a través del Postgrado en Ciencias Forestales por la calidez y calidad de sus profesores, al personal de apoyo del postgrado, especialmente a la Sra. Ma. Guadalupe Sánchez Vázquez por su invaluable amistad y apoyo en todo momento, y a la Srita. Sthefanie Susana Cervantes Espejel por el apoyo incondicional y facilidades otorgadas.

A la línea prioritaria de investigación LPI-1 Manejo sustentable de recursos naturales del Colegio de Postgraduados por el apoyo económico otorgado para la realización del trabajo de campo.

Dr. J. Jesús Vargas Hernández: agradezco su infinita e inagotable paciencia durante cada etapa de mi formación profesional, le doy mi reconocimiento por fomentar la educación, por inculcar valores y sembrar el conocimiento, formando mejores personas y profesionales, por escucharme y orientarme tanto en lo profesional como en lo personal, y especialmente respeto y admiro su gran calidad humana.

Al Dr. Javier López Upton y el Dr. Marcos Jiménez Casas, no sólo me dieron conocimientos, se dieron un tiempo para escucharme y darme consejos, su disciplina y pasión por su profesión fueron sus características principales y de ellas aprendí.

A los doctores, Carlos Ramírez Herrera, Arnulfo Aldrete y Ramón Díaz Ruíz, por los aportes a la investigación y muestras de apoyo que me motivaron a continuar. A la Sra. Laura Carrillo Reyes y al Dr. Amalio Santacruz Varela, por el invaluable apoyo, interesante proceso de aprendizaje y su invaluable amistad.

Agradecimientos especiales al Ing. León Jorge Castaños Martínez y al Ing. Salvador Castro Zavala, propietarios de la Reserva Forestal Multifuncional “El Manantial”, por las facilidades y apoyo logístico en la realización del estudio y por su amistad.

Durante el desarrollo de mis estudios se presentaron diversas situaciones que pudieron ser fácilmente causantes de fracaso, pero gracias al apoyo de Dios, de mi esposo, de mi familia, de maestros y amigos.....aprendí que no se puede dar marcha atrás, que la esencia de la vida es ir hacia adelante.

Liliana M. Gutiérrez

DEDICATORIA

A Dios por darme fortaleza

A mi mamá Betty y a mis abuelitos Alicia e Isidoro

Porque una madre sigue teniendo confianza en los hijos cuando todos los demás lo han perdido. En mis triunfos y en mis tropiezos, en mis errores y en mis aciertos, han secado mis lágrimas y me han animado a seguir adelante. Siempre han velado por mi felicidad y bienestar. Querida mamá y abuelos, los amo, son como ángeles de la guarda que me brindan su amor incondicional. Y muchas gracias por enseñarme a ser humilde.

A mi esposo Rogelio Meraz

Mi grillo, agradezco tu infinita paciencia y apoyo incondicional. No hay nada, ni nadie que ilumine mi alma de la manera en que tú lo haces. Me emociona saber que pasaré el resto de mi vida junto a ti. Siempre has estado a mi lado, incluso en mis peores momentos, eres el hombre perfecto para mí. Te amo y te adoro, significa estar enamorada de toda tu vida. Y si yo pudiera darte una cosa en la vida, me gustaría darte la capacidad de verte a ti mismo a través de mis ojos, verás lo especial que eres para mí. Doy gracias a Dios por haberte puesto en mi camino.

A mi hermano Erick Muñoz

A mis tíos María, Paulino, Alicia, Eloisa, Margarita, Jaime

Alfredo, Ana, Jorge, Carlos, Juana

A mis primos, Jhon, Moy, Caro, Leo, Jorge, Diana, Brenda, Lalo, Gus, Mónica, César

Sin importar cuanto tiempo esté fuera, o que tan lejos me vaya, tengo la seguridad que al regresar a casa, me recibirán con mucho amor. Son de aquellas familias, que está presente tanto en las buenas como en las malas.

Les agradezco por brindarme lo necesario para salir adelante.

Especialmente quiero reconocer la ayuda invaluable de mi tío Jaime, siempre dispuesto a dar lo mejor sin importar horarios, ni la cantidad de trabajo, estoy infinitamente agradecida.

Liliana M. Gutiérrez

CONTENIDO

	Página
RESUMEN GENERAL	iii
GENERAL ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	vi
CONTENIDO	vii
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL	15
CAPÍTULO I	18
VARIACIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL EN LA DISPERSIÓN DE POLEN EN UN HUERTO SEMILLERO Y EN RODALES NATURALES CERCANOS DE <i>Pinus patula</i>	18
RESUMEN	18
ABSTRACT	19
1.1 INTRODUCCIÓN	20
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
1.2.1 Área de estudio	23
1.2.2 Localización de trampas y recolecta de polen	23
1.2.3 Información meteorológica.....	24
1.2.4 Variables evaluadas y análisis estadístico	25
1.3 RESULTADOS	27
1.3.1 Cantidad y periodo de dispersión de polen en el huerto semillero y en los rodales naturales.....	27
1.3.2 Variación espacial y temporal en la dispersión del polen en el huerto semillero.....	29
1.3.3 Variación espacial y temporal en la dispersión de polen en los rodales naturales	30

1.3.4 Relación del periodo de dispersión de polen con las variables meteorológicas y grados-día	33
1.4 DISCUSIÓN.....	36
1.4.1 Dispersión del polen en el huerto semillero y en los rodales naturales.....	36
1.4.2 Variación espacial y temporal en la dispersión del polen dentro del huerto	38
1.4.3 Relación entre la fenología de la dispersión de polen y variables meteorológicas	38
1.4.4 Implicaciones sobre el riesgo de contaminación genética en la progenie del huerto ...	39
1.5 CONCLUSIONES.....	41
CAPÍTULO II.....	42
VARIACIÓN EN LA FENOLOGÍA REPRODUCTIVA EN UN HUERTO SEMILLERO Y RIESGO DE CONTAMINACIÓN GENÉTICA POR RODALES NATURALES CERCANOS DE <i>Pinus patula</i>	42
RESUMEN.....	42
ABSTRACT	43
2.1 INTRODUCCIÓN.....	44
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
2.2.1 Área de estudio	46
2.2.2 Evaluación de la fenología de estructuras reproductivas.....	46
2.2.3 Análisis de los datos	47
2.3 RESULTADOS	50
2.3.1 Dispersión de polen en el huerto semillero y en rodales naturales de <i>Pinus patula</i>	50
2.3.2 Dispersión de polen en el transecto altitudinal de los rodales naturales	51
2.3.3 Variación clonal en la fenología reproductiva en el huerto semillero.....	53
2.4 DISCUSIÓN.....	56
2.4.1 Diferencias entre años en la fenología reproductiva de <i>Pinus patula</i>	56
2.4.2 Diferencias en el periodo de dispersión de polen entre el huerto semillero y los rodales naturales.....	57
2.4.3 Diferencias en la dispersión de polen en rodales naturales a lo largo del transecto altitudinal.....	58
2.4.4 Variación clonal en la fenología reproductiva del huerto semillero.....	59
2.4.5 Implicaciones sobre la contaminación genética en el huerto semillero.....	61
2.5 CONCLUSIONES.....	63

CAPÍTULO III	64
VARIACIÓN CLONAL EN LA SINCRONIZACIÓN FENOLÓGICA Y EN LA PRODUCCIÓN DE CONOS EN UN HUERTO SEMILLERO DE <i>Pinus patula</i>	64
RESUMEN.....	64
ABSTRACT	65
3.1 INTRODUCCIÓN.....	66
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
3.2.1 Área de estudio	69
3.2.2 Evaluación de la fenología reproductiva y capacidad productiva de conos	69
3.2.3 Análisis de los datos	70
3.3 RESULTADOS	73
3.3.1 Variación clonal en la sincronización fenológica.....	73
3.3.2 Variación en la capacidad productiva de los clones del huerto semillero de <i>Pinus patula</i>	77
3.3.3 Relación de la capacidad productiva de los clones con la precocidad y el riesgo de contaminación genética	80
3.4 DISCUSIÓN.....	82
3.4.1 Variación clonal en la sincronización fenológica.....	82
3.4.2 Variación anual en la sincronización fenológica.....	84
3.4.3 Variación clonal en la producción de conos y su relación con la precocidad	85
3.4.4 Implicaciones para la producción de semillas	87
3.5 CONCLUSIONES.....	89
CONCLUSIONES GENERALES	90
LITERATURA CITADA.....	93

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1.1. Localización y características generales de los rodales naturales de <i>Pinus patula</i> a lo largo de un transecto altitudinal en los que se muestreó la dispersión de polen.	23
Cuadro 1.2. Significancia estadística (<i>P</i>) para cantidad de polen, fechas y duración del periodo de dispersión de polen en las poblaciones (huerto semillero y rodales naturales) de <i>Pinus patula</i>	27
Cuadro 1.3. Valores promedio de cantidad de polen, fechas y duración de la dispersión en el huerto semillero y en rodales naturales de <i>Pinus patula</i> . Valores promedio dentro de cada factor seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).	28
Cuadro 1.4. Significancia estadística (<i>P</i>) para cantidad de polen, fechas y duración del periodo de dispersión de polen en las zonas del huerto semillero de <i>Pinus patula</i> . ..	29
Cuadro 1.5. Valores promedio de cantidad de polen, fechas y duración de la dispersión por año y zona en el huerto semillero de <i>Pinus patula</i> . Valores promedio dentro de cada factor seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).	29
Cuadro 1.6. Significancia estadística (<i>P</i>) para cantidad de polen, fechas y duración del periodo de dispersión de polen en rodales naturales de <i>Pinus patula</i> a lo largo de un transecto altitudinal.	31
Cuadro 1.7. Valores promedio de cantidad de polen, fechas y duración del periodo de dispersión por año y rodal de <i>Pinus patula</i> a lo largo de un transecto altitudinal. Valores promedio dentro de cada factor seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).	31
Cuadro 2.1. Significancia estadística (<i>P</i>) para las fechas y duración del periodo de dispersión de polen en el huerto semillero y en los rodales naturales de <i>Pinus patula</i>	50

Cuadro 2.2. Valores promedio de las fechas de inicio y terminación y de la duración del periodo de dispersión de polen en el huerto semillero y en rodales naturales de <i>Pinus patula</i> en dos años de evaluación.....	50
Cuadro 2.3. Significancia estadística (P) para fechas y duración del periodo de dispersión de polen en rodales naturales de <i>Pinus patula</i> a lo largo de un transecto altitudinal.	51
Cuadro 2.4. Valores promedio de las fechas de inicio y terminación y de la duración del periodo de dispersión de polen en rodales naturales de <i>Pinus patula</i> a lo largo de un transecto altitudinal en dos años de evaluación.....	52
Cuadro 2.5. Valores promedio por año de las fechas de inicio y terminación y de la duración del periodo de receptividad femenina y dispersión de polen en el huerto semillero de <i>Pinus patula</i> en dos años de evaluación.	53
Cuadro 2.6. Componentes de varianza, relación σ^2_{ac}/σ^2_c , heredabilidad en sentido amplio de las medias de clones (H^2_c) y correlaciones genéticas tipo B (r_B) para las fechas de inicio y terminación y la duración del periodo de receptividad femenina y de dispersión de polen en el huerto semillero de <i>Pinus patula</i> en dos años de evaluación.....	54
Cuadro 2.7. Correlaciones genotípicas (izquierda de la diagonal) y fenotípicas (derecha de la diagonal) entre las características fenológicas del periodo de receptividad femenina y de dispersión de polen en el huerto semillero de <i>Pinus patula</i>	55
Cuadro 3.1. Índice de sincronización fenológica (OP) promedio entre la receptividad femenina de los clones del huerto con respecto al polen del mismo clon (O_iP_i), de los otros clones (O_iP_j) y de los rodales naturales (O_iPRN), en dos años de evaluación. Los clones están ordenados de acuerdo a su nivel de precocidad en el periodo de receptividad femenina en cada año.	73
Cuadro 3.2. Comparación del valor promedio de sincronización del periodo de receptividad femenina de los clones con diferente grado de precocidad con el polen de otros clones en el huerto (O_iP_j), y con el polen de los rodales naturales (O_iPRN) en dos años de evaluación.	76

Cuadro 3.3. Significancia estadística (P) de los factores año, clon y de la interacción entre ambos sobre la capacidad productiva de conos femeninos en clones del huerto semillero de <i>Pinus patula</i>	77
Cuadro 3.4. Valores promedio, mínimo y máximo por clon, e indicadores de variación (desviación estándar y coeficiente de variación) del número de conos femeninos en clones del huerto semillero de <i>Pinus patula</i> por año de evaluación.....	77
Cuadro 3.5. Componentes de varianza, relación σ^2_{ac}/σ^2_c , heredabilidad en sentido amplio de las medias de clones (H^2_c) y correlaciones genéticas tipo B (r_B) para la capacidad productiva de conos femeninos en el huerto semillero de <i>Pinus patula</i> en tres años de evaluación.....	79
Cuadro 3.6. Correlación fenotípica (r_p) entre la capacidad productiva de conos femeninos de los clones del huerto con el valor de OiPRN, y la fecha de inicio y duración del periodo de receptividad femenina del clon en los diferentes ciclos reproductivos evaluados en el huerto semillero.	80

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1. Dispersión de polen en el huerto semillero y en rodales naturales de <i>Pinus patula</i> para los ciclos reproductivos 2014 y 2015. Las barras verticales representan el error estándar de los valores promedio en cada fecha de muestreo.	28
Figura 1.2. Cantidad de polen (granos de polen cm ⁻²) capturado en la zona centro (C) y periferia (P) del huerto semillero de <i>Pinus patula</i> en 2014 y 2015. Columnas dentro de un año de evaluación con distinta letra indica diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre zonas del huerto semillero.	30
Figura 1.3. Periodo de dispersión de polen en rodales naturales de <i>Pinus patula</i> a lo largo del transecto altitudinal durante los ciclos reproductivos 2014 (línea continua) y 2015 (línea discontinua). Las puntas de las flechas indican el inicio y el fin del periodo y el círculo indica la fecha en que se alcanzó 50 % de dispersión. Las líneas en 2015 están ligeramente desfasadas en altitud para evitar su traslape con las líneas de 2014.	33
Figura 1.4. Relación del periodo de dispersión del polen con los grados-día acumulados en los ciclos 2014 (línea continua) y 2015 (línea discontinua) en el huerto semillero de <i>Pinus patula</i> (A) y en los rodales naturales a lo largo del transecto altitudinal para los ciclos 2014 (B) y 2015 (C). Los simbolos a lo largo de las líneas indican las fechas de inicio ($\blacktriangle, \triangle$), 50 % (\diamond, \diamond) y fin (\bullet, \circ) del periodo de dispersión.....	34
Figura 1.5. A) Curva de dispersión de polen en el huerto semillero de <i>Pinus patula</i> , con base en los granos de polen capturados en las trampas durante los ciclos 2014 (línea continua) y 2015 (línea discontinua); y B) temperatura máxima (°C) y precipitación (mm) diarias registradas durante el periodo de dispersión en 2014 y 2015.....	35
Figura 3.1. Variación estacional en las curvas de los periodos de receptividad femenina en los grupos de clones precoces y tardíos en relación con la curva de liberación de polen en los rodales naturales.....	76

Figura 3.2. Curva de contribución acumulada de la producción de conos femeninos de los clones del huerto semillero de *Pinus patula* en tres años de evaluación..... 78

INTRODUCCIÓN GENERAL

Inicialmente las plantaciones se establecían con semilla de poblaciones naturales, como consecuencia, se hizo evidente la gran variabilidad intra-específica en los caracteres de interés y la baja productividad de las plantaciones. Por lo anterior, se han establecido programas de mejoramiento genético, con el propósito de apoyar a las plantaciones forestales comerciales, en términos de aumentar la productividad y la calidad de la madera en las generaciones futuras. El éxito de los programas de mejoramiento se determina por la calidad de los árboles seleccionados, la ganancia genética y el nivel de diversidad que se mantiene en ellas. Las expectativas de esta ganancia dependen tanto del control genético de las características de interés como de la variabilidad existente en la población (Zobel y Talbert, 1988).

Los huertos semilleros son el componente fundamental de los programas de mejora genética para materializar la ganancia genética en el germoplasma que se utilizará en la producción de plantas de calidad genética requeridas por los programas de plantaciones comerciales, que sean más productivas y mejor adaptadas a su ambiente (Di-Giovanni y Kevan, 1991); y a su vez, sirven como una población de mejoramiento (Erteiken, 2012). Se establecen con la finalidad de obtener semillas y plántulas de calidad genética superior comparados con los seleccionados fenotípicamente o genotípicamente en rodales naturales (Gömöry *et al.*, 2003). En otras palabras, los huertos contienen árboles genéticamente superiores; por lo tanto, se espera que produzcan semillas con alto valor genético y fisiológico (El-Kassaby *et al.*, 1989a).

Los huertos semilleros se pueden establecer por semilla (huertos sexuales) o mediante propágulos vegetativos (huertos asexuales o clonales) de individuos seleccionados con base en la superioridad en algunas características importantes (Chmura *et al.*, 2012). Se establecen preferentemente con clones de la misma zona geográfica, con el fin de homogeneizar la fenología reproductiva y garantizar su adaptación a la región (Pakkanen y Pulkkinen, 1991). Sin embargo, un huerto semillero de polinización abierta debe cumplir las siguientes condiciones (Eriksson *et al.*, 1973): a) los clones aportan un número similar de gametos masculinos y femeninos en las semillas; b) la receptividad de los óvulos femeninos está sincronizada con la dispersión de polen en todos los clones en el huerto; c) la fecundación es completamente aleatoria; d) todas las cruzas posibles entre clones son igualmente compatibles; e) la

autofecundación es mínima; y f) el huerto está aislado de rodales naturales de la misma especie para evitar contaminación por flujo de polen externo.

Para que la semilla cosechada en un huerto semillero alcance la máxima calidad, en términos de ganancia y diversidad genética se requiere de una completa sincronización de la floración y de equidad en la capacidad reproductiva (Kang, 2001), con una distribución aleatoria de clones y rametos que permitan un equilibrio panmítico y un balance parental en los ciclos reproductivos (Kang *et al.*, 2004). Estas características, asociadas con un número suficiente de clones, contribuyen, además, a reducir las posibilidades de auto-fecundación y a minimizar la endogamia en la progenie (Kang, 2001). Además, debido a la capacidad de producción y dispersión natural del polen en especies anemófilas, es común que los huertos semilleros se expongan a altos niveles de polen externo (Friedman y Adams, 1985). El grado de contaminación genética en un huerto semillero depende del grado de aislamiento (físico, fenológico o por distancia) con respecto a otras fuentes no deseadas de polen, y de la capacidad de producción de polen en el huerto que compita con la fuente externa (Di-Giovanni y Kevan, 1991).

En particular, la sincronización de la floración entre clones diferentes promueve el cruzamiento aleatorio (panmixia) (Kang, 2001). Sin embargo, cualquier variación en el comportamiento fenológico de la floración de los clones ocasiona desviaciones con respecto al supuesto de panmixia e influye en el intercambio de genes y consecuentemente en la composición y diversidad genética de las semillas (El-Kassaby *et al.*, 1984). Reynolds y El-Kassaby (1990) indicaron que el factor de mayor importancia en la diversidad genética de la semilla producida en un huerto semillero es el balance en la capacidad productiva de los clones y la sincronización en los periodos de floración. Una sincronización baja entre la receptividad femenina y la dispersión de polen tiene efectos negativos sobre el equilibrio panmítico del huerto (Matziris, 1994), ya que ocasiona desbalance en la contribución de los clones, cruza no aleatorias entre ellos, o incremento en la proporción de semillas vanas (Codesido *et al.*, 2005). Si las semillas se recolectan de clones que no están sincronizados fenológicamente, la diversidad genética estará por debajo del nivel ideal, reduciendo la eficiencia genética del huerto (Kang y Lindgren, 1998).

En un ciclo reproductivo del huerto semillero es poco común que todos los clones produzcan la misma cantidad de estructuras reproductivas, por lo que es razonable suponer que el lote de semillas cosechadas en un año en particular no representa el pool genético total de los clones del huerto (Erteiken, 2012). Es común que una porción reducida de los progenitores aporte una cantidad desproporcionadamente grande a la cosecha del huerto (El-Kassaby *et al.* 1989b), lo que por un lado aumenta la relación genética en la progenie pero también ocasiona una reducción en la diversidad genética de la semilla cosechada (El-Kassaby y Cook, 1994).

El presente trabajo se desarrolló con el propósito de evaluar algunos de los factores que influyen en la eficiencia genética de un huerto semillero de *Pinus patula* y las implicaciones para la producción de semillas. En el primer capítulo se evalúa la variación espacial y temporal en la dispersión de polen dentro del huerto de *P. patula* y el potencial de flujo genético de los rodales naturales de la misma especie cercanos al huerto. El flujo de polen de poblaciones naturales a huertos semilleros tiene un efecto negativo en la calidad genética del germoplasma producido.

En el segundo capítulo se determina la variación genética en la fenología reproductiva entre clones del huerto semillero, el nivel de traslape con la dispersión de polen de rodales naturales y el nivel de variación genética entre clones del huerto semillero en la fenología reproductiva y la heredabilidad de estas características, así como su estabilidad entre años de evaluación, debido a que estos factores influyen en la eficiencia genética del huerto.

En el tercer capítulo se determina el nivel de variación clonal en el grado de sincronización entre la receptividad femenina y la liberación de polen del mismo clon ($\bar{O}_i\bar{P}_i$); de otros clones ($\bar{O}_i\bar{P}_j$) y de rodales naturales cercanos ($\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$), y el nivel de variación clonal en la producción de conos femeninos y su relación con el riesgo de contaminación genética por polen externo. Estos factores influyen en el tamaño efectivo de población y la diversidad genética del germoplasma producido en los huertos semilleros.

CAPÍTULO I

VARIACIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL EN LA DISPERSIÓN DE POLEN EN UN HUERTO SEMILLERO Y EN RODALES NATURALES CERCANOS DE *Pinus patula*

RESUMEN

El flujo de polen de poblaciones naturales a huertos semilleros tiene un efecto negativo en la calidad genética del germoplasma producido. El objetivo del estudio fue evaluar el potencial de flujo genético de rodales naturales vecinos a un huerto semillero clonal de *Pinus patula*. En 2014 y 2015 se establecieron trampas para capturar polen en el centro y periferia del huerto y en rodales naturales en un transecto altitudinal en Aquixtla, Puebla, México. Con las curvas de polen capturado se estimó el total dispersado por unidad de superficie (granos de polen cm^{-2}), las fechas y la duración del periodo de dispersión. También se analizó la relación del periodo de dispersión con la temperatura, precipitación y grados-día. El polen capturado en el huerto fue 2.5 veces mayor y el periodo de dispersión inició una semana antes que en los rodales naturales en ambos años. En 2015, el número de granos de polen cm^{-2} aumentó al doble y el periodo de dispersión se retrasó. En la parte central del huerto hubo 74 % más polen que en la periferia y su periodo de dispersión se retrasó uno a tres días. En los rodales naturales no se observó un patrón altitudinal en la dispersión de polen. Las diferencias entre años en la fenología de dispersión se relacionaron con los grados-día acumulados y con la variación en temperatura máxima y precipitación. Los resultados señalan riesgos de contaminación genética en el huerto, pero estos son menores en el centro que en la periferia.

Palabras clave: contaminación genética, fenología reproductiva, flujo genético, gradiente altitudinal, grados-día.

**TEMPORAL AND SPATIAL VARIATION OF POLLEN DISPERSAL IN A SEED
ORCHARD AND NEARBY NATURAL STANDS OF *Pinus patula***

ABSTRACT

Pollen flow from natural populations towards seed orchards has a negative effect on genetic quality of germplasm produced. The objective of the study was to evaluate the potential gene flow into a *Pinus patula* clonal seed orchard from nearby natural stands. In 2014 and 2015, pollen traps were established at the center and periphery of the seed orchard and in nearby natural stands along an altitudinal transect in Aquixtla, Puebla, Mexico. With the pollen capture curves, total pollen dispersal (pollen grains cm⁻²), dates and extent of dispersal period were estimated. The relationship of the dispersal period with temperature, rainfall and degree-days was also analyzed. Pollen captured in the seed orchard was 1.5 times higher and dispersal started one week earlier than in natural stands in both years. In 2015, pollen dispersal doubled and the dispersion period was delayed. The pollen captured at the center of the orchard was 74 % higher than in the periphery, and the dispersal period started one to three days later. No altitudinal trend in the dispersal period was observed in natural stands. Phenology differences between years in pollen dispersal were related to cumulative degree-days and to variation in maximum temperature and rainfall. Results reveal risks of genetic contamination in the seed orchard, but these are lower in the center than in the periphery.

Key words: genetic contamination, reproductive phenology, gene flow, elevation gradient, degree-day.

1.1 INTRODUCCIÓN

Los programas de mejoramiento genético forestal generalmente requieren del establecimiento de huertos semilleros que constituyen el vínculo para transferir a la producción forestal la ganancia genética obtenida en la población de mejora (Lowe y Wheeler, 1993). En los huertos semilleros se obtiene el germoplasma necesario para producir las plantas de calidad genética que se requieren en los programas de reforestación y plantaciones comerciales más productivas y adaptadas a su ambiente (Di-Giovanni y Kevan, 1991). Los huertos semilleros se pueden establecer por semilla (huertos sexuales) o mediante propágulos vegetativos (huertos asexuales o clonales) de individuos seleccionados con base en la superioridad en algunas características importantes (Chmura *et al.*, 2012).

El objetivo final del huerto es producir semilla de mayor calidad, en cantidad suficiente y con una eficiencia genética elevada, la cual depende del tamaño efectivo de población en el huerto y de la capacidad de exclusión de gametos de individuos no seleccionados (Wang *et al.*, 1991). Factores como la fecundidad de los progenitores, sincronía en la fenología reproductiva de los clones y ausencia de polen externo influyen en la eficiencia genética del huerto (Lowe y Wheeler, 1993). Estas condiciones son difíciles de cumplir en especies de coníferas (Squillace y Long, 1981; Adams y Burczyk, 2000).

El polen externo de árboles no seleccionados que llega a los huertos semilleros tiene efectos negativos en la progenie porque reduce el potencial de crecimiento y genera problemas de adaptación que reducen la ganancia genética (Lowe y Wheeler, 1993). Debido a la capacidad de producción y dispersión natural del polen en especies anemófilas, es común que sus huertos semilleros se expongan a altos niveles de polen externo, a pesar de que se encuentren relativamente alejados de poblaciones de la misma especie (Friedman y Adams, 1985). En huertos semilleros de *Pinus sylvestris* se ha encontrado que el nivel de contaminación genética puede variar de 2 a 74 % (El-Kassaby *et al.*, 1989a). En otras especies, los valores de contaminación generalmente son superiores a 40 % como en *Pinus taeda* L. (Adams y Burczyk, 2000) y *Picea abies* (L.) H. Karst (Pakkanen *et al.*, 2000), aunque pueden variar desde menos de 10 %, como en *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco (Ritland y El-Kassaby, 1985), a más de 85 %, como en *Pinus brutia* Ten. (Kaya *et al.*, 2006).

El potencial de contaminación de polen externo en un huerto semillero depende del grado de aislamiento (físico, fenológico o por distancia) con respecto a otras fuentes no deseadas de polen, y de la capacidad de producción de polen en el huerto, que compita con la fuente externa (Di-Giovanni y Kevan, 1991). El primer factor está asociado con la capacidad y el momento de dispersión del polen; la distancia de dispersión varía en función de condiciones ambientales, como dirección y velocidad del viento, precipitación y humedad relativa (Lindgren *et al.*, 1995), y de características de la especie como morfología y tamaño de los granos de polen (Sousa y Hattemer, 2003).

En poblaciones continuas hay un flujo extenso de polen que puede ser alrededor del 4 o 5 % en distancias de hasta 100 km (Kremer *et al.*, 2012). Este flujo es suficiente para evitar la diferenciación y la estructuración de las poblaciones en regiones extensas, ya que se requieren pocos migrantes por generación para contrarrestar los efectos de la selección natural y la deriva genética en la estructura espacial de las poblaciones (Hedrick, 1985). Sin embargo, en un estudio de dispersión de polen de 36 árboles en un rodal aislado de *Pinus sylvestris* L. se ha demostrado que alrededor de 50 % del polen producido por un árbol cae en una distancia no mayor a 11 m, y 7 % cae fuera de una distancia de 200 m (Robledo-Arnuncio y Gil, 2005). Por lo tanto, las diferencias en polen capturado en diferentes sitios dentro de una población continua reflejan en gran medida las diferencias en producción de polen en los vecindarios muestreados.

El momento de la liberación del polen es afectado por la temperatura, la humedad y los grados-calor o grados-día acumulados durante el proceso de diferenciación y desarrollo posterior de las estructuras reproductivas (Huusko y Hicks, 2009). Por lo anterior, se espera que el periodo de producción y dispersión del polen varíe de un año a otro en vecindarios o subpoblaciones a lo largo de un transecto altitudinal (Adams, 1992). Por otro lado, la capacidad de producción de polen en un huerto semillero, y el grado de competencia con el polen externo, depende de la edad y tamaño de copa en los individuos dentro del huerto (Caron y Powell, 1989; Di-Giovanni y Kevan 1991). Las coníferas inician la producción de polen después de varios años de crecimiento, pero una vez iniciada, su capacidad aumenta gradualmente con la edad (Caron y Leblanc, 1992). Debido a esto, el potencial de contaminación por polen externo generalmente es elevado en huertos jóvenes en donde apenas inicia la producción de polen, pero éste se reduce conforme aumenta la edad de los árboles en el huerto (Caron y Powell, 1989).

En el año 2003 se estableció un huerto semillero clonal de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham., en la Sierra Norte de Puebla, como parte de un programa regional de mejoramiento genético de la especie, para satisfacer las necesidades de semilla con calidad genética superior para el establecimiento de plantaciones forestales (Castaños y Castro-Zavala, 2014). El huerto se ubica dentro del área de distribución natural de la especie, a una elevación de 2,860 m, en la parte media de un transecto altitudinal, en donde existen rodales naturales de *P. patula*, por lo que existe un riesgo potencial de contaminación genética. En este trabajo se evalúa la cantidad de polen presente dentro del huerto y en rodales naturales vecinos. Los objetivos son a) estimar la variación espacial y temporal en la dispersión de polen dentro del huerto de *P. patula* y en rodales naturales de la misma especie cercanos al huerto a lo largo de un transecto altitudinal, y b) determinar si la variación en el periodo de dispersión del polen de un año a otro a lo largo del transecto altitudinal está relacionada con las condiciones meteorológicas y grados-día acumulados.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Área de estudio

El estudio se realizó en un huerto semillero asexual de *Pinus patula* de 10 años de edad, establecido mediante injertos en la Reserva Forestal Multifuncional “El Manantial”, en el municipio de Aquixtla, Puebla, México (19° 43' 13" N, 97° 59' 20" O, 2,860 m). El huerto cubre una superficie de 1.2 ha, en un diseño completamente al azar con un espaciamiento de 3x3 m con diferente número de rametos (1-22, promedio = 8 y mediana = 7) por clon. Al inicio del estudio el huerto contaba con 660 rametos pertenecientes a 82 clones distintos. También se muestrearon cuatro rodales naturales coetáneos de la especie a lo largo de un transecto altitudinal (2,807-3,011 m) a una distancia de 150 a 1,000 m del centro del huerto (Cuadro 1.1); al menos el 50 % de los árboles adultos (en edad reproductiva) se encontraba produciendo polen. Para fines del estudio el huerto semillero y los rodales naturales se consideraron como dos poblaciones distintas.

Cuadro 1.1. Localización y características generales de los rodales naturales de *Pinus patula* a lo largo de un transecto altitudinal en los que se muestreó la dispersión de polen.

Rodal	Latitud (N)	Longitud (O)	Altitud (m)	Densidad (árboles ha ⁻¹)	Edad (años)	Diámetro medio (cm)	Altura media (m)	Distancia huerto (m)
R ₁	19° 44'05,4"	97° 59'06,9"	2,807	400	45	40	21	850
R ₂	19° 43'51,2"	97° 59'12,6"	2,870	750	26	24	19	150
R ₃	19° 43'36,6"	97° 59'29,1"	3,011	900	20	18	16	750
R ₄	19° 43'24,7"	97° 59'36,8"	3,009	1,500	16	15	13	1,000

1.2.2 Localización de trampas y recolecta de polen

Para cuantificar la variación espacial y temporal en la presencia de polen se colocaron trampas de captura en diferentes sitios dentro y fuera del huerto. En el huerto se establecieron cinco sitios de muestreo, uno en el centro y cuatro en la periferia, a una distancia de 9 a 12 m del borde, cada uno con cuatro trampas; fuera del huerto también se establecieron cuatro trampas

de muestreo en cada uno de los rodales naturales (R₁-R₄) a lo largo del transecto altitudinal mencionado.

Las trampas consistieron en portaobjetos recubiertos con cinta adhesiva doble cara colocados en una pequeña plataforma con una veleta, montada en tubos de PVC a una altura de 6 m sobre el nivel del suelo, que representa la altura de la parte media de la copa de los árboles en el huerto. En cada sitio las trampas se colocaron con una separación horizontal de un metro entre ellas. Las muestras (portaobjetos) se cambiaron cada 72 horas en todos los sitios de muestreo durante el periodo de dispersión de polen en cada año de evaluación. El conteo de granos de polen de *P. patula* retenidos en las trampas se hizo directamente en cada portaobjeto utilizando un microscopio óptico (Zeiss M 40) con aumento 40X. El portaobjetos se dividió en ocho secciones de un cm², y cuatro de estas secciones se muestrearon en forma de zigzag. Aunque no es posible distinguir el origen o procedencia del polen capturado en las trampas, de acuerdo con los datos de Robledo-Arnuncio y Gil (2005), la mayor proporción del polen presente en un punto dentro de una población extensa procede de un vecindario cercano (radio ≤ 75 m), por lo que bajo este supuesto y considerando una proporción homogénea de flujo de polen dentro de la población, las diferencias en el polen capturado por las trampas en los sitios reflejan las diferencias en producción de polen entre los vecindarios muestreados.

1.2.3 Información meteorológica

Durante el periodo de estudio (2014-2015) la información meteorológica se obtuvo de tres micro-estaciones automatizadas, establecidas en 2009 a diferentes elevaciones dentro de la Reserva Forestal, cercanas a los sitios de muestreo y captura de polen. La primera de ellas se encuentra en la zona central del huerto, la segunda en la parte alta del transecto a una elevación de 3,000 m, (estación Sierra Mojada), cercana a los sitios R₃ y R₄ y la tercera en la parte baja del transecto (estación Chichicaxtla) a una altitud de 2,660 m, cercana al sitio R₁. Las variables registradas en las micro-estaciones fueron temperatura máxima, mínima y media por día y precipitación diaria en los meses previos y durante el periodo de dispersión del polen de los ciclos 2014 y 2015.

Para calcular los grados-día (GD) en los ciclos 2014-2015 se utilizaron las temperaturas máximas y mínimas diarias registradas desde el primer día de enero en cada año hasta el fin del

periodo de dispersión. Dado que en la estación Chichicaxtla no se registraron las temperaturas máximas y mínimas diarias durante el periodo del estudio, éstas se estimaron a través de regresión lineal utilizando los datos registrados en las otras dos micro-estaciones en los años 2011 y 2012. Los grados-día acumulados se calcularon con la siguiente ecuación:

$$GD = \left[\frac{T^{\circ}_{m\acute{a}x} + T^{\circ}_{m\acute{i}n}}{2} \right] - T^{\circ}_{umbral} \quad [1]$$

dónde: $T^{\circ}_{m\acute{a}x}$ = temperatura máxima diaria (°C), $T^{\circ}_{m\acute{i}n}$ = temperatura mínima diaria (°C) y T°_{umbral} = temperatura umbral inferior (°C). Se utilizó una temperatura umbral de 6 °C, con base en el trabajo realizado por Salaya-Domínguez *et al.* (2012) para la misma especie y lugar de estudio; cuando los valores de GD fueron negativos con la fórmula empleada, estos se consideraron como cero.

1.2.4 Variables evaluadas y análisis estadístico

A partir de los datos de polen capturado en cada trampa se estimó la cantidad de polen de *P. patula* por centímetro cuadrado así como la fecha de inicio y terminación (número de días a partir del 1 de enero) y la duración del periodo de dispersión del polen; también se estimó la fecha en que se alcanzó el 50 % del total de polen dispersado en el periodo. Las trampas se consideraron como repeticiones o muestras independientes en cada sitio. Para cada trampa se generó una curva acumulada de dispersión de polen por ciclo reproductivo (2014 y 2015), a partir de la cual se determinaron las fechas en que se alcanzó 5 y 95 % del total de polen dispersado en el periodo, que se consideraron como fechas de inicio y terminación del periodo de dispersión, respectivamente. El día en que se alcanzó 50 % del polen dispersado en el periodo se estimó de la misma curva.

El análisis de varianza para determinar la variación espacial y temporal en la dispersión del polen se realizó con el procedimiento Mixed del paquete estadístico SAS (SAS Institute, 2002). En una primera etapa se analizaron las diferencias en la cantidad de polen (granos cm⁻²) y fechas del periodo de dispersión entre el huerto semillero y los rodales naturales en los dos ciclos reproductivos considerando los valores promedio de cada sitio de muestreo como repeticiones, obtenidos a partir de los valores promedio de las cuatro trampas establecidas en cada sitio o

rodal. Se utilizó el siguiente modelo estadístico, en el que todos los factores se consideraron de efectos fijos, excepto el error:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + P_j + A_iP_j + \epsilon_{ijk}$$

dónde: Y_{ijk} es el valor promedio del k-ésimo sitio en la j-ésima población [huerto semillero o rodal natural] en el i-ésimo año; μ es la media general; A_i es el efecto del i-ésimo año de evaluación; P_j es el efecto de la j-ésima población; A_iP_j es el efecto de la interacción del i-ésimo año con la j-ésima población; y ϵ_{ijk} representa el error.

En una etapa posterior se analizó la variación espacial dentro del huerto y a lo largo del transecto altitudinal en los rodales naturales por separado. En todos los análisis los factores año y zona (o rodal) se consideraron como efectos fijos. Los datos de conteo de granos de polen fueron transformados con la raíz cuadrada del valor original previo al análisis, para homogeneizar las varianzas y ajustar los residuales a una distribución normal; después del análisis, los valores promedio obtenidos fueron re-transformados a su escala original.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Cantidad y periodo de dispersión de polen en el huerto semillero y en los rodales naturales

Todas las variables evaluadas presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre años y entre poblaciones (huerto semillero vs. rodales naturales), excepto la fecha de terminación del periodo de dispersión que no mostró diferencias entre el huerto y los rodales. La fecha en que se alcanzó 50 % de dispersión del polen fue la única variable con efecto significativo de la interacción año \times población (Cuadro 1.2).

Cuadro 1.2. Significancia estadística (P) para cantidad de polen, fechas y duración del periodo de dispersión de polen en las poblaciones (huerto semillero y rodales naturales) de *Pinus patula*.

Fuente de variación	Polen (granos cm ⁻²)	Fechas del periodo de dispersión (días a partir del 1 de enero)			Duración (días)
		Inicio	50 %	fin	
Año	0.006	<0.001	<0.001	<0.001	0.002
Población [†]	<0.001	<0.001	0.008	0.128	<0.001
Año \times Población	0.703	0.075	0.030	0.905	0.065

[†]El huerto semillero y los rodales naturales se consideraron como poblaciones diferentes.

La cantidad promedio de polen (granos cm⁻²) aumentó al doble en 2015 con respecto a 2014; de la misma manera, el polen presente en el huerto semillero, en promedio de los dos años de evaluación, fue 2.5 veces mayor que en los rodales naturales vecinos (Cuadro 1.3, Figura 1.1). En 2015 el periodo de dispersión de polen se retrasó en el huerto semillero y en los rodales naturales; la dispersión inició nueve días después y terminó 13 días después, por lo que el periodo de dispersión se alargó cuatro días en el segundo año (16.3 vs. 12.3 días). En 2014, ocho días después del inicio se alcanzó 50 % del total dispersado, mientras que en 2015 ocurrió 13 días después. En el huerto la dispersión de polen inició en promedio ocho días antes que en los rodales naturales, pero el 50 % de la dispersión se alcanzó solo dos días antes y el final ocurrió

casi al mismo tiempo que en los rodales naturales, por lo que la dispersión de polen en el huerto tuvo una duración mayor (18 vs. 11 días en promedio). La diferencia entre huerto y rodales en la fecha en que se alcanzó 50 % de dispersión fue mayor en 2014 que en 2015 (Figura 1.1).

Cuadro 1.3. Valores promedio de cantidad de polen, fechas y duración de la dispersión en el huerto semillero y en rodales naturales de *Pinus patula*. Valores promedio dentro de cada factor seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

Factor y niveles	Polen (granos cm ⁻²)	Fechas del periodo de dispersión (días a partir del 1 de enero)			Duración (días)
		Inicio	50 %	fin	
<u>Año:</u>					
2014	877 b	64.9 b	72.8 b	77.2 b	12.3 b
2015	1,716 a	73.6 a	86.7 a	89.9 a	16.3 a
<u>Población:</u>					
Huerto semillero	1,883 a	65.3 b	79.0 b	83.2 a	17.9 a
Rodales naturales	764 b	73.2 a	80.5 a	83.9 a	10.6 b

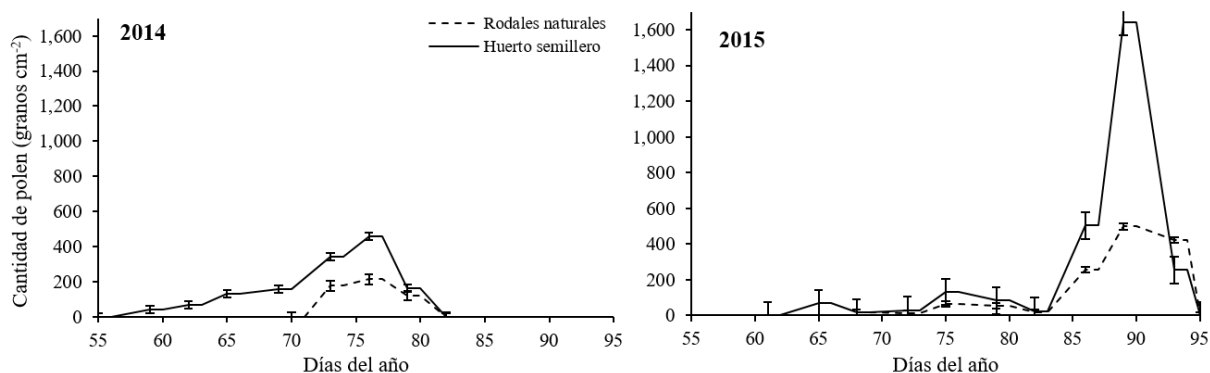


Figura 1.1. Dispersión de polen en el huerto semillero y en rodales naturales de *Pinus patula* para los ciclos reproductivos 2014 y 2015. Las barras verticales representan el error estándar de los valores promedio en cada fecha de muestreo.

1.3.2 Variación espacial y temporal en la dispersión del polen en el huerto semillero

Todas las variables evaluadas, excepto la duración del periodo de dispersión, mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre años y entre zonas del huerto semillero. Ninguna de las variables mostró efectos significativos de la interacción año \times zona (Cuadro 1.4). La cantidad de polen dispersado aumentó al doble en 2015 con respecto a 2014 (3,008 vs. 1,536 granos cm^{-2}). De manera similar, la cantidad de polen capturado en la parte central del huerto fue 74 % mayor que en la periferia en los dos años (Cuadro 1.5, Figura 1.2).

Cuadro 1.4. Significancia estadística (P) para cantidad de polen, fechas y duración del periodo de dispersión de polen en las zonas del huerto semillero de *Pinus patula*.

Fuente de variación	Polen (granos cm^{-2})	Fechas del periodo de dispersión (días a partir del 1 de enero)			Duración (días)
		inicio	50 %	fin	
Año	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.242
Zona	<0.001	0.027	0.030	0.043	0.083
Año x Zona	0.200	0.251	0.282	0.532	0.157

El inicio y fin de la dispersión de polen se retrasó 12 días en promedio en el ciclo 2015 con respecto al ciclo 2014, mientras que la fecha en que se alcanzó 50 % de dispersión total se retrasó en 15 días, del día 72 en 2014, al día 87 en 2015 (Cuadro 1.5). Sin embargo, la duración del periodo de dispersión de polen fue similar en ambos años (17 vs. 18 días). Las diferencias entre zonas en las fechas de dispersión de polen fueron menores, con uno a tres días de adelanto en el inicio, 50 % y fin del periodo de dispersión del polen en la periferia con respecto al centro del huerto (Cuadro 1.5).

Cuadro 1.5. Valores promedio de cantidad de polen, fechas y duración de la dispersión por año y zona en el huerto semillero de *Pinus patula*. Valores promedio dentro de cada factor seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

Factor y niveles	Polen (granos cm ⁻²)	Fechas del periodo de dispersión (días a partir del 1 de enero)			Duración (días)
		Inicio	50 %	Fin	
		<u>Año:</u>			
2014	1,536 b	60.2 b	71.9 b	77.1 b	16.9 a
2015	3,008 a	71.8 a	86.7 a	89.8 a	18.0 a
<u>Zona del huerto:</u>					
Centro	2,863 a	67.1 a	79.9 a	83.8 a	16.6 a
Periferia	1,643 b	64.8 b	78.8 b	83.1 b	18.3 a

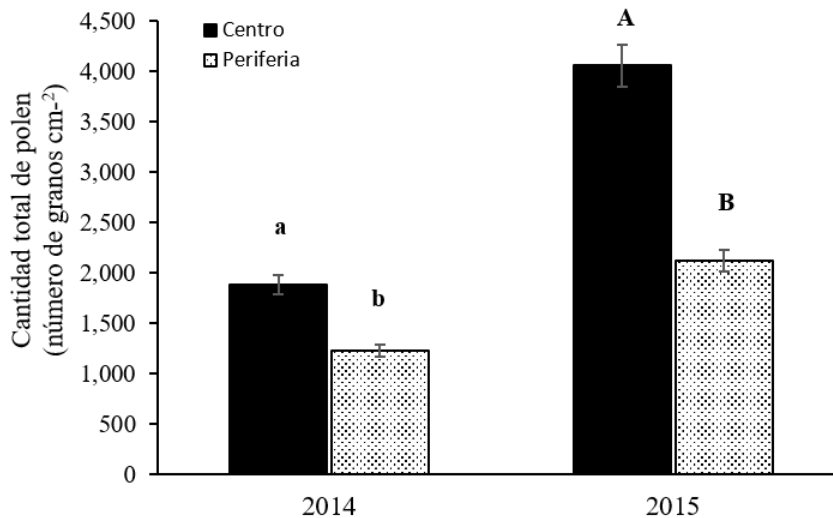


Figura 1.2. Cantidad de polen (granos de polen cm⁻²) capturado en la zona centro (C) y periferia (P) del huerto semillero de *Pinus patula* en 2014 y 2015. Columnas dentro de un año de evaluación con distinta letra indica diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre zonas del huerto semillero.

1.3.3 Variación espacial y temporal en la dispersión de polen en los rodales naturales

Todas las variables mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los ciclos reproductivos, pero no entre rodales a lo largo del transecto altitudinal, excepto la fecha de terminación del periodo de dispersión (Cuadro 1.6). Por otro lado, la interacción año \times rodal fue

significativa ($P \leq 0.05$) en las fechas de inicio, fin y duración del periodo de dispersión, pero no en la cantidad de polen ni en la fecha en que se alcanzó 50 % de dispersión (Cuadro 1.6).

Cuadro 1.6. Significancia estadística para cantidad de polen, fechas y duración del periodo de dispersión de polen en rodales naturales de *Pinus patula* a lo largo de un transecto altitudinal.

Fuente de variación	Polen (granos cm ⁻²)	Fechas del periodo de dispersión (días a partir del 1 de enero)			Duración (días)
		inicio	50 %	fin	
Año	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Rodal	0.413	0.127	0.380	0.015	0.351
Año × Rodal	0.281	0.004	0.057	0.003	0.019

Al igual que en el huerto semillero, la cantidad de polen capturado en los rodales naturales a lo largo del transecto en 2015 fue el doble que en 2014 (Cuadro 1.7), aunque con valores menores que en el huerto (1,032 vs. 497 granos cm⁻²). De la misma manera, en 2015 el periodo de dispersión inició siete días después, mientras que las fechas en que se alcanzó 50 % y finalizó la dispersión se retrasaron en 12-13 días con respecto a 2014; debido a ello, el periodo de dispersión en 2015 aumentó en seis días (Cuadro 1.7). Además, en 2014 la fecha en que se alcanzó 50 % de la dispersión ocurrió cuatro días después del inicio, mientras que en 2015 fue 10 días después, generando una curva de dispersión distinta.

Cuadro 1.7. Valores promedio de cantidad de polen, fechas y duración del periodo de dispersión por año y rodal de *Pinus patula* a lo largo de un transecto altitudinal. Valores promedio dentro de cada factor seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

Año y rodal (altitud)	Polen (granos cm ⁻²)	Fechas del periodo de dispersión (días a partir del 1 de enero)			Duración (días)
		Inicio	50 %	Fin	
		<u>Año:</u>			
2014	497 b	69.9 b	74.3 b	77.6 b	7.6 b
2015	1,032 a	76.6 a	86.9 a	90.3 a	13.7 a
<u>Rodal (altitud):</u>					
R ₁ (2,807 m)	771 a	74.0 a	80.8 a	84.1 ab	10.1 a
R ₂ (2,870 m)	864 a	71.4 a	79.9 a	83.3 b	11.9 a
R ₃ (3,011 m)	756 a	73.9 a	81.0 a	84.9 a	11.0 a
R ₄ (3,009 m)	585 a	73.8 a	80.6 a	83.4 b	9.6 a

En los rodales sólo se encontraron diferencias significativas en la fecha de terminación del periodo de dispersión; los rodales R₂ y R₄ terminaron uno y dos días antes que los rodales R₁ y R₃. Sin embargo, la interacción año × rodal fue significativa para las fechas de inicio y terminación y para la duración del periodo, por lo que la fenología de la dispersión del polen a lo largo del transecto altitudinal varió de un año a otro. En 2014 se observaron diferencias de hasta cuatro días en la fecha de inicio de la dispersión del polen entre los rodales, pero sin un patrón claro a lo largo del transecto altitudinal (Figura 1.3); en cambio, las fechas de 50 % y fin de la dispersión mostraron un patrón altitudinal, con un retraso de uno a dos días conforme aumentó la altitud del sitio (Figura 1.3). En 2015 se observaron diferencias mayores (4-5 días) entre rodales en la fecha de inicio que en las fechas de 50 % y fin del periodo de dispersión, pero en ningún caso se observó el mismo patrón altitudinal que en 2014 (Figura 1.3).

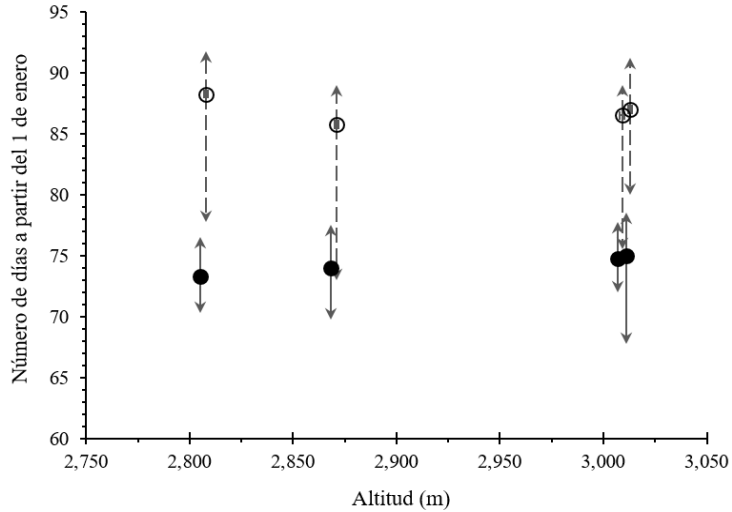


Figura 1.3. Periodo de dispersión de polen en rodales naturales de *Pinus patula* a lo largo del transecto altitudinal durante los ciclos reproductivos 2014 (línea continua) y 2015 (línea discontinua). Las puntas de las flechas indican el inicio y el fin del periodo y el círculo indica la fecha en que se alcanzó 50 % de dispersión. Las líneas en 2015 están ligeramente desfasadas en altitud para evitar su traslape con las líneas de 2014.

1.3.4 Relación del periodo de dispersión de polen con las variables meteorológicas y grados-día

La temperatura (grados-día) y la precipitación influyeron sobre el patrón estacional de dispersión del polen en el huerto en los dos años de evaluación. El periodo de dispersión en ambos años inició cuando se acumularon entre 255-260 GD contados a partir del 1 de enero, mientras que el 50 % de dispersión se alcanzó con 330 GD y el final ocurrió al acumularse entre 340 y 370 GD (Figura 1.4A).

En los rodales naturales a lo largo del transecto, los periodos de dispersión ocurrieron a diferentes GD acumulados. En el ciclo 2014, la dispersión de polen en los rodales R₁ y R₂ inició cuando se acumularon entre 315 y 335 GD, mientras que en los rodales de mayor altitud (R₃ y R₄) ocurrió cuando se acumularon entre 185 y 205 GD (Figura 1.4B). Para el ciclo 2015, en los rodales R₁ y R₂ la dispersión inició al acumularse entre 260 y 280 GD, mientras que en R₃ y R₄

ocurrió con 170 y 190 GD (Figura 4C). El final del periodo de dispersión mostró un patrón altitudinal similar con respecto a los años de evaluación (Figura 1.4B y 1.4C).

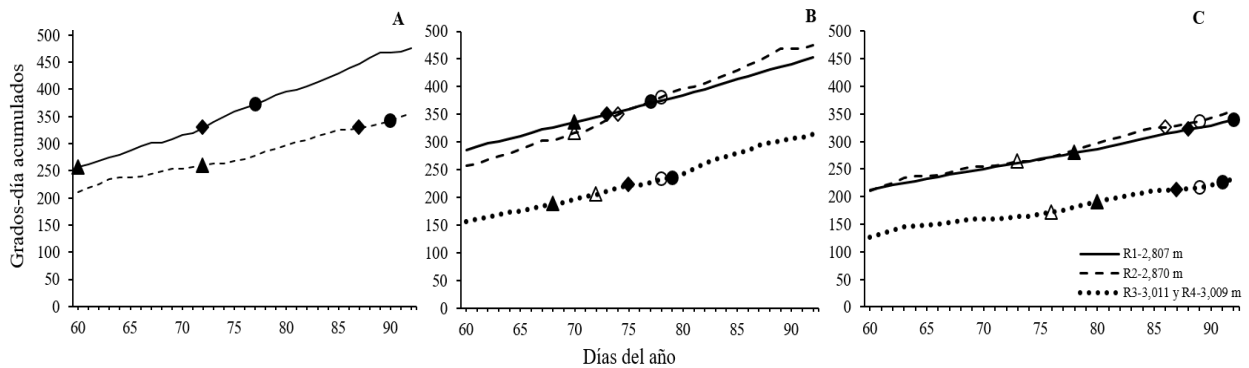


Figura 1.4. Relación del periodo de dispersión del polen con los grados-día acumulados en los ciclos 2014 (línea continua) y 2015 (línea discontinua) en el huerto semillero de *Pinus patula* (A) y en los rodales naturales a lo largo del transecto altitudinal para los ciclos 2014 (B) y 2015 (C). Los símbolos a lo largo de las líneas indican las fechas de inicio (▲, △), 50 % (◇, ◇) y fin (●, ○) del periodo de dispersión.

Las diferencias entre años en el periodo de dispersión de polen en el huerto se relacionaron también con diferencias en temperatura y precipitación en los días antes y durante la dispersión (Figura 1.5A y 1.5B). La mayor amplitud en el periodo de dispersión del polen en 2015 se relacionó con una temperatura máxima más baja y una precipitación abundante, en particular durante los días previos e inicio del periodo de dispersión.

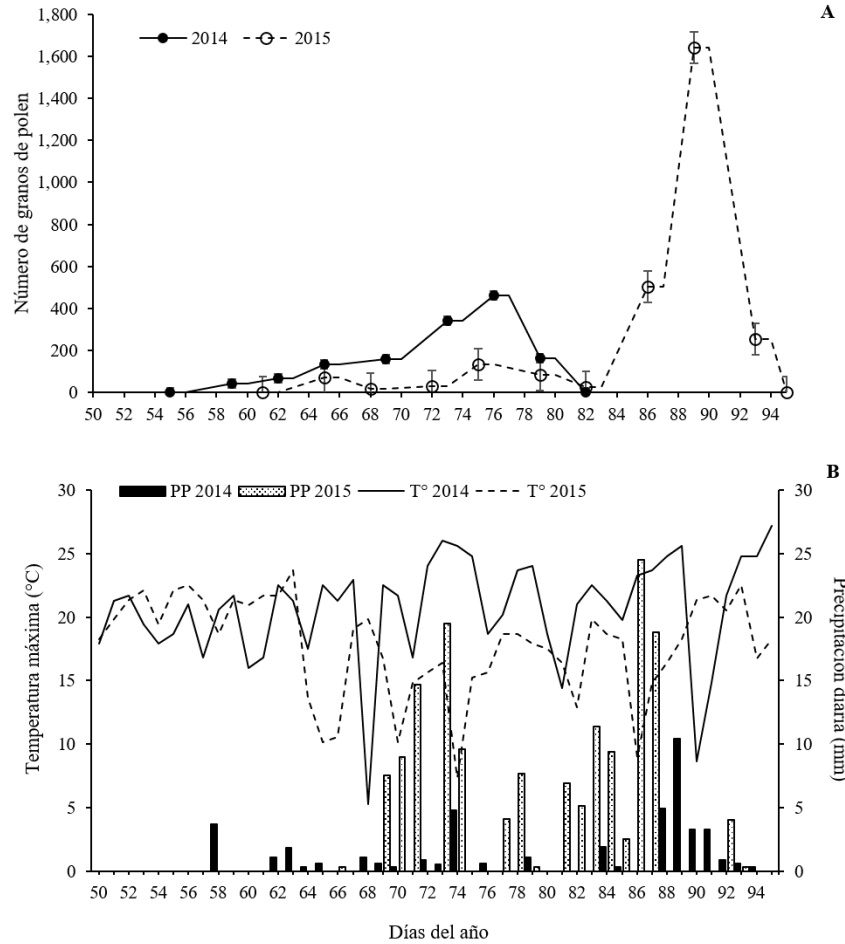


Figura 1.5. A) Curva de dispersión de polen en el huerto semillero de *Pinus patula*, con base en los granos de polen capturados en las trampas durante los ciclos 2014 (línea continua) y 2015 (línea discontinua); y B) temperatura máxima (°C) y precipitación (mm) diarias registradas durante el periodo de dispersión en 2014 y 2015.

1.4 DISCUSIÓN

1.4.1 Dispersión del polen en el huerto semillero y en los rodales naturales

La capacidad de producción de polen en el huerto semillero de *Pinus patula* difiere con respecto a los rodales naturales vecinos, lo cual puede influir sobre el potencial de contaminación genética por polen externo, como se ha demostrado en otras especies (Caron y Leblanc, 1992). La mayor cantidad de granos de polen por unidad de superficie encontrada en el huerto puede estar asociada a diferencias en vigor de los árboles y en densidad de población con respecto a los rodales naturales, ya que se trata de individuos más jóvenes en edad reproductiva (injertos de 10-11 años de edad en el huerto vs 15-45 años de edad en los rodales naturales, y con una mayor densidad poblacional (1,130 árboles ha⁻¹ en el huerto vs. 400-1,500 árboles ha⁻¹ en los rodales). Estos resultados difieren de los descritos por Kaya *et al.* (2006) en un huerto semillero de *Pinus brutia* Ten. de 11 años de edad, en donde la cantidad de polen producido es menor que en rodales naturales disetáneos, con árboles de hasta 100 años de edad. Wang *et al.* (1991) también encontraron una producción baja de polen en huertos de *P. sylvestris* de 25-27 años de edad.

La producción mayor de polen en los individuos del huerto de *P. patula* con respecto a los rodales naturales fue consistente en los dos años de estudio, a pesar de la variación natural en la producción de polen en diferentes ciclos reproductivos de las especies forestales. Caron y Powell (1989) demostraron que la producción de polen en huertos jóvenes de *Picea mariana* (Mill.) Britton, Sterns *et* Poggenb., incrementa año con año conforme aumenta la edad de los árboles. Esto hace suponer que la producción de polen en el huerto puede contrarrestar el impacto del flujo de fuentes externas de polen y esta capacidad aumentará con la edad de los árboles en el huerto cuando éstos desarrollen copas más grandes, con un número mayor de estróbilos masculinos y mayor interferencia física al ingreso de polen de fuentes cercanas al huerto, como se ha mencionado para otras especies (Caron y Leblanc, 1992).

Las diferencias fenológicas en el periodo de dispersión del polen entre el huerto semillero y los rodales naturales también reducen los riesgos de contaminación por polen externo (Di-Giovanni y Kevan, 1991; Caron y Leblanc, 1992). En los dos años de evaluación se encontró,

de manera consistente, que el periodo de dispersión de polen en el huerto inició al menos una semana antes que en los rodales naturales, pero con un traslape amplio, ya que la dispersión se prolongó en el huerto y terminó casi en la misma fecha que en los rodales naturales (Cuadro 1.3, Figura 1.1). Las diferencias en el inicio y duración del periodo de dispersión se debieron, al menos en parte, a la menor edad de los árboles en el huerto y a la variación genética en fenología reproductiva de los clones representados en éste (Hernández-Zaragoza *et al.*, 2016). La dispersión de polen en huertos semilleros jóvenes puede ocurrir antes que en rodales naturales, porque en árboles jóvenes el periodo de crecimiento del brote generalmente inicia antes y en los huertos el espaciamiento es mayor (Torimaru *et al.*, 2009). Además, la parte baja de la copa de los árboles jóvenes, donde se desarrollan los estróbilos masculinos, está cercana al suelo donde la temperatura es mayor, lo que puede acelerar el desarrollo de los estróbilos masculinos (Lindgren *et al.*, 1995), como se demostró en huertos de *Pinus sylvestris* (Harju y Nikkanen, 1996). En *Picea abies* se observó que los primeros dos días de dispersión la cantidad de polen en el huerto fue similar a la de los rodales naturales vecinos y posteriormente aumentó dentro del huerto, debido a diferencias en la fenología por el origen geográfico de los clones (Nikkanen *et al.*, 2002).

Sin embargo, no hubo diferencias importantes en el periodo de dispersión de polen entre los rodales naturales (Cuadros 1.5 y 1.6), a pesar de que uno de ellos tenía árboles de 15 a 20 años de edad. Esto indica que la variación genética en la fenología reproductiva de los clones es un factor importante en el inicio y duración del periodo de dispersión del polen en el huerto. Un estudio realizado antes en el huerto muestra que hay una amplia variación fenológica entre los clones en el desarrollo y maduración de los estróbilos masculinos (Hernández-Zaragoza *et al.*, 2016). Los clones que se encuentran en el huerto provienen de árboles superiores seleccionados en los rodales naturales de la especie en la región, por lo que se espera que la variación genética en el huerto sea mayor que en cada uno de los rodales naturales cercanos, como se ha demostrado en *Pseudotsuga menziesii* (Erickson y Adams, 1989) y en *Picea abies* (Nikkanen *et al.*, 2002). El mosaico de heterogeneidad ambiental en áreas de montaña hace que pequeñas diferencias en el origen de los clones generen variación en la fenología reproductiva entre éstos (Khanduri, 2012).

1.4.2 Variación espacial y temporal en la dispersión del polen dentro del huerto

La cantidad mayor de polen y el retraso en el periodo de dispersión en el centro del huerto con respecto a la periferia (Cuadro 1.5) pueden estar asociados a un efecto de “borde”, con un menor número de árboles en el vecindario y cambios en el microambiente suficientes para modificar ligeramente la fenología de la dispersión del polen. Nikkanen *et al.* (2002) también encontraron una amplia variación en la densidad de polen en diferentes zonas de un huerto semillero de *Picea abies*, la que atribuyeron a factores asociados con la densidad del arbolado, el tamaño del huerto, la dirección del viento y diferencias fenológicas en la dispersión de polen en los vecindarios dentro del huerto.

Friedman y Adams (1985) enfatizan la importancia de la producción y distribución espacial del polen en huertos de *Pinus taeda*, especialmente en los árboles que se encuentran cerca del borde o perímetro, ya que éstos están expuestos a una mayor cantidad de polen foráneo que los del centro. En el huerto de *P. patula*, la menor cantidad de polen en la periferia indica que hay menores posibilidades de competir con el polen externo; aunque el periodo de dispersión se adelantó ligeramente, la diferencia no es suficiente para eliminar el periodo de traslape con la producción de polen en los rodales vecinos. En *P. sylvestris*, Harju y Nikkanen (1996) encontraron que los estróbilos femeninos estuvieron receptivos antes de la dispersión de polen en el huerto, lo que implica un riesgo alto de contaminación, aunque la dispersión del polen en los rodales naturales de la misma especie usualmente inicia más tarde que en el huerto.

1.4.3 Relación entre la fenología de la dispersión de polen y variables meteorológicas

En *Pseudotsuga menziesii* (Erickson y Adams, 1989) y *Pinus radiata* D. Don (Codesido *et al.*, 2005) se ha encontrado que la duración del periodo de dispersión de polen depende de las condiciones meteorológicas en cada ciclo reproductivo. En nuestro estudio, las diferencias encontradas entre años en la fenología de la dispersión del polen, tanto en el huerto como en los rodales naturales a lo largo del transecto altitudinal, se asociaron con las condiciones meteorológicas, en particular con la acumulación de grados-día (Figura 1.4), de manera consistente a lo que se reporta para *Picea mariana* (Caron y Leblanc, 1992) y *P. radiata* (Codesido *et al.*, 2005). En los estudios antes mencionados, el inicio de la floración se correlacionó positivamente con los grados-día acumulados en la etapa previa de crecimiento.

Esto indica que el tiempo requerido para iniciar el periodo de floración está bajo un fuerte control genético y fisiológico; la floración está sincronizada con la suma de grados-día (Boes *et al.*, 1991) ya que la temperatura influye sobre la velocidad de desarrollo de las estructuras reproductivas. Codesido *et al.* (2005) indican que para iniciar los procesos de floración, receptividad femenina y dispersión de polen se requiere una cierta cantidad de temperatura acumulada. La cantidad menor de grados-día requeridos en los dos rodales situados a mayor altitud en el transecto altitudinal sugiere el valor adaptativo de esta característica en las poblaciones naturales de la especie y explica, en parte, el periodo mayor de dispersión de polen en el huerto y la mayor variación en la fenología reproductiva de los clones. En *Pseudotsuga menziesii* encontraron que a una altitud de 305 m la dispersión de polen inicia cuando se alcanzan 800-900 horas-día por arriba de 10 °C, pero a altitudes entre 762 y 1,067 m requiere sólo 400 horas-día (Ebell y Schmidt, 1964).

La temperatura y la precipitación también influyen en el inicio y duración del periodo de dispersión del polen, así como en la dinámica de dispersión de un año a otro; estos dos factores están asociados con la acumulación de grados-día, pero también influyen sobre la humedad relativa de la atmósfera (Boes *et al.*, 1991). Por ello, la menor temperatura y mayor precipitación durante los días previos y al inicio del periodo de dispersión en 2015 (Figura 1.5) posiblemente redujeron la dispersión del polen y ampliaron el periodo. En especies con dispersión anemófila, como los pinos, una alta humedad relativa en el ambiente reduce la apertura de las escamas en los estróbilos y limita la cantidad de polen liberado y su distancia de dispersión como se ha observado en *P. sylvestris* (Chmura *et al.*, 2012) y *P. roxburghii* Sarg. (Khanduri, 2012). Nikkanen *et al.* (2002) mencionan la presencia de picos en la curva de dispersión de polen en *Picea abies* asociados a la reducción de la humedad relativa en el ambiente. En cambio, la presencia de lluvias frecuentes durante el periodo de dispersión ocasiona la pérdida de polen y suspende temporalmente la dispersión (Caron y Leblanc, 1992; Codesido *et al.*, 2005).

1.4.4 Implicaciones sobre el riesgo de contaminación genética en la progenie del huerto

A pesar de que el huerto semillero de *P. patula* inicia la dispersión del polen antes que los rodales vecinos, el amplio traslape en el periodo de dispersión en ambas poblaciones indica que en las condiciones actuales existe riesgo de que el polen externo llegue al huerto y fecunde los óvulos, reduciendo la calidad genética del germoplasma. El riesgo de contaminación genética

es mayor en la zona periférica del huerto debido a la menor cantidad de polen que se encontró en esta zona y a su exposición mayor al flujo de polen externo. El aumento en el número de copas de los árboles conforme se avanza al centro del huerto constituye una barrera física que limita la cantidad de polen foráneo que puede llegar (Nikkanen *et al.*, 2002). Este factor, aunado a la producción mayor de polen en el centro del huerto, sugiere que las posibilidades de contaminación en esa zona son menores, similar a lo encontrado por Nikkanen *et al.* (2002) en *Picea abies*. Sin embargo, el riesgo de contaminación genética disminuye conforme aumenta la capacidad de producción de polen en el huerto, como se reportó en huertos semilleros de *Picea mariana* (Caron y Leblanc, 1992).

Debido a la ubicación del huerto semillero con respecto a poblaciones naturales y plantaciones de *Pinus patula* en los predios cercanos, en la práctica es imposible aislar físicamente al huerto del flujo de polen externo. Sin embargo, la relación encontrada entre la dispersión del polen y las variables meteorológicas, en particular la suma de grados-día y la humedad, así como el inicio anticipado del periodo de dispersión en el huerto en relación con los rodales vecinos, ofrece la posibilidad de adelantar la fenología reproductiva en los árboles del huerto aumentando la temperatura, como se ha sugerido en otras especies para reducir los daños por heladas y acelerar el desarrollo de las estructuras reproductivas (Pakkanen *et al.*, 2000). Por otro lado, los riesgos de contaminación genética detectados sugieren la necesidad de evaluar otros aspectos de la fenología reproductiva en el huerto semillero, como la variación clonal en la dispersión del polen y receptividad de los óvulos en rametos, y el grado de sincronía en estos procesos (Codesido *et al.*, 2005). También es necesario realizar un análisis de paternidad en una muestra de la progenie del huerto para determinar el nivel real de contaminación genética, con base en las técnicas desarrolladas en otras especies (Kaya *et al.*, 2006; Torimaru *et al.*, 2009).

1.5 CONCLUSIONES

Los resultados del estudio muestran que en el huerto de *Pinus patula* hay una cantidad mayor de polen que en los rodales naturales de manera consistente en los dos años evaluados, y que el polen dispersado aumenta en el segundo año. La dispersión de polen en el huerto inicia antes que en los rodales naturales, pero presenta un periodo de dispersión más amplio, lo que genera un fuerte traslape en el periodo de dispersión del polen dentro y fuera del huerto. La dispersión de polen es mayor en el centro que en la periferia y ocurre con uno a tres días de retraso, lo cual sugiere que el riesgo de contaminación genética por polen externo difiere en estas zonas dentro del huerto.

Hay diferencias entre rodales en la fecha de terminación de dispersión del polen, pero el periodo de dispersión no muestra un patrón claro asociado con la elevación de los rodales naturales dentro del intervalo altitudinal muestreado. Sin embargo, la relación fenológica de la dispersión del polen con los grados-día acumulados en los dos años de evaluación en el huerto y en los rodales naturales sugiere una relación adaptativa en la que la dispersión del polen requiere una cantidad menor de grados-día al aumentar la elevación. Debido a los riesgos de contaminación genética que existen en el huerto de *Pinus patula* y a la dificultad para aislarlo físicamente de las poblaciones naturales vecinas, se recomienda implementar prácticas de manejo en el huerto para adelantar su periodo de floración, aumentar la producción de polen y su efectividad en la fecundación de los óvulos.

CAPÍTULO II

VARIACIÓN EN LA FENOLOGÍA REPRODUCTIVA EN UN HUERTO SEMILLERO Y RIESGO DE CONTAMINACIÓN GENÉTICA POR RODALES NATURALES CERCANOS DE *Pinus patula*

RESUMEN

La variación en la fenología reproductiva entre clones de un huerto semillero afecta el intercambio genético entre éstos y la eficiencia genética del huerto. El objetivo fue evaluar la variación genética en la fenología reproductiva en clones de un huerto semillero de *Pinus patula* y el nivel de traslape con la dispersión de polen de rodales naturales. En 2014 y 2015 se registró la fenología de estructuras reproductivas femeninas y masculinas en 31 clones del huerto y de estructuras masculinas en árboles de cuatro rodales naturales cercanos al huerto. Se determinaron las fechas de inicio, terminación y duración de los periodos de receptividad femenina y de dispersión de polen. Se estimaron los componentes de varianza, heredabilidad y correlaciones genéticas. En los rodales se encontró una mayor diferencia entre años en la fecha de inicio de la liberación del polen que en el huerto. La dispersión de polen en el huerto inició antes y terminó después que en los rodales, con una mayor duración del periodo, por lo que en los dos años se encontró un amplio traslape en el periodo de dispersión de polen en el huerto y los rodales naturales. Los clones mostraron una amplia variación genética en los eventos fenológicos evaluados; la dispersión del polen presentó un mayor control genético ($H^2_c \geq 0.60$) que la receptividad de los estróbilos femeninos ($H^2_c \leq 0.36$). La mayoría de las características fenológicas en los clones del huerto mostraron una estabilidad genética elevada entre años ($r_B \geq 0.76$), existe una correlación positiva ($r = 0.67$) entre el periodo de receptividad y el periodo de liberación del polen en los clones, por lo anterior los dos procesos no son independientes, lo que sugiere un posible riesgo de autofecundación. Además, el traslape existente entre la receptividad femenina en los clones y la dispersión de polen en los rodales naturales vecinos advierte un riesgo potencial de contaminación genética del huerto, especialmente en los clones más tardíos en su fenología reproductiva.

Palabras clave: fenología reproductiva, variación genética, heredabilidad, contaminación genética

VARIATION IN REPRODUCTIVE PHENOLOGY IN A SEED ORCHARD AND GENETIC CONTAMINATION RISK FROM NEARBY NATURAL STANDS OF

Pinus patula

ABSTRACT

Genetic variation in reproductive phenology among clones in a seed orchard affects the genetic exchange among them and the genetic efficiency of the orchard. The objective was to evaluate the genetic variation in reproductive phenology *Pinus patula* clones in a seed orchard and the amount of overlap with the pollen dispersal from other trees in natural stands. In 2014 and 2015, the phenology of female and male reproductive structures were recorded in 31 clones from the orchard, as well as for male structures of trees from four natural stands nearby the orchard. The starting date, ending dates, and female receptivity period and pollen dispersal period were registered. The variance components, broad-sense heritability and genetic correlations was estimated. Differences were higher in the starting date of pollen dispersal were larger in the natural stands than those found in the orchard between years. Pollen dispersal started earlier and ended later in the orchard than in began and ended in the stands. The period length of pollen dispersal was large, so a wide overlap was observed between the orchard and natural stands in both years. A broad genetic variation was detected in reproductive phenology among clones; genetic control was stronger for pollen dispersal ($H^2_c \geq 0.60$) than it was for female receptivity ($H^2_c \leq 0.36$). Most phenology traits showed high genetic stability in the orchard clones in both years ($r_B \geq 0.76$), but both processes were not independent since a positive correlation ($r = 0.67$) was found between receptivity and pollen dispersal of clones. Thus, self-fertilization risk could be high. Moreover, a potential risk of genetic contamination into the orchard could be because of the overlap between female receptivity of clones and pollen dispersal in nearby natural stands.

Key words: reproductive phenology, genetic variation, heritability, genetic contamination.

2.1 INTRODUCCIÓN

Los huertos semilleros son la fuente principal del germoplasma requerido para el establecimiento de plantaciones forestales en la mayoría de las especies de coníferas de importancia económica (Askew, 1988). El diseño y manejo de estas unidades productoras de germoplasma está orientado a asegurar más valor genético y diversidad que en las áreas semilleras o rodales naturales (El Kassaby *et al.*, 1984). La diversidad genética máxima en la progenie del huerto ocurre cuando todos los progenitores tienen la misma probabilidad de cruzarse (panmixia) y contribuyen equitativamente a la cosecha de semilla (Kang *et al.*, 2001; Moriguchi *et al.*, 2007).

Para alcanzar la máxima eficiencia genética en un huerto semillero de polinización abierta se deben cumplir las siguientes condiciones (Eriksson *et al.*, 1973): a) los clones aportan un número similar de gametos masculinos y femeninos en las semillas b) la receptividad de los óvulos femeninos está sincronizada con la dispersión de polen en todos los clones; c) la fecundación es completamente aleatoria; d) todas las cruzas posibles entre clones son igualmente compatibles, e) la autofecundación es mínima; y f) el huerto está aislado de rodales naturales de la misma especie para evitar contaminación por flujo de polen externo.

Estudios sobre fenología reproductiva y sincronización en huertos semilleros de coníferas han revelado que la condición de panmixia es difícil de lograr (El Kassaby *et al.*, 1984; Askew y Blush, 1990). Diferencias en la fenología reproductiva afectan el intercambio de genes entre clones, excluyendo algunos cruzamientos e incluso evitando la contribución de algunos de ellos (Matziris, 1994; Alizoti *et al.*, 2010). La variación fenológica entre clones reduce el tamaño efectivo del huerto, promueve la autofecundación y aumenta el riesgo de contaminación de polen externo (Chaisurisi y El-Kassaby, 1993; Burczyk y Chalupka, 1997). Se ha reportado variación genética significativa en los procesos de floración entre clones de *Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco (El-Kassaby *et al.*, 1984) y *Pinus radiata* D. Don (Codesido *et al.*, 2005). Además, la fenología reproductiva y la proporción de estróbilos masculinos y femeninos por clon pueden variar de un año a otro y con la edad de los árboles (Nikkanen y Velling, 1987), afectando la eficiencia genética del huerto.

Los huertos semilleros se establecen preferentemente con clones de la misma zona geográfica, con el fin de homogeneizar la fenología reproductiva y garantizar su adaptación a la región (Pakkanen y Pulkkinen, 1991). Sin embargo, esto ocasiona que la floración del huerto se traslape con la de rodales vecinos al ser de la misma procedencia todos los árboles, lo que aumenta el riesgo de contaminación por polen externo, como se demostró en huertos de *Pinus sylvestris* L. (Pakkanen y Pulkkinen, 1991; Pulkkinen, 1994). Para determinar la variación en la fenología reproductiva en los clones de un huerto semillero se requiere evaluar el momento en que inicia y finaliza la floración, así como la duración de la receptividad femenina y la dispersión de polen en comparación con la dispersión de polen en rodales naturales cercanos de la misma especie (Nikkanen, 2001). Estos aspectos son fundamentales en la toma de decisiones sobre el manejo del huerto, como realizar aclareos, polinización complementaria, y/o cruza controladas (Blush *et al.*, 1993).

En la Sierra Norte de Puebla en 2003 se estableció un huerto semillero clonal de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. *et* Cham., como parte de un programa regional de mejoramiento genético para satisfacer las necesidades de semilla con calidad genética superior para el establecimiento de plantaciones forestales de este pino (Castaños-Martínez y Castro-Zavala, 2014). El huerto se ubica dentro del área de distribución natural de la especie, a una elevación de 2,860 m. Los objetivos del estudio fueron: a) determinar las diferencias en la fenología reproductiva entre los clones del huerto semillero de *Pinus patula* y los rodales naturales cercanos de la misma especie, y b) determinar el nivel de variación genética entre clones del huerto semillero en la fenología reproductiva y la heredabilidad de estas características, así como su estabilidad entre años de evaluación.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Área de estudio

El estudio se realizó en un huerto semillero clonal de *Pinus patula* de 10 años de edad, establecido por injertos en la Reserva Forestal Multifuncional “El Manantial”, en el municipio de Aquixtla, Puebla, México (19° 43' 13" N; 97° 59' 20" O; 2,860 m). El huerto cubre una superficie de 1.2 ha, en un diseño completamente al azar con un espaciamiento de 3 x 3 m con diferente número de rametos (1-22, promedio = 8 y mediana = 7) por clon. Al inicio del estudio el huerto contaba con 660 rametos pertenecientes a 82 clones distintos. En el estudio también se incluyeron rodales naturales coetáneos de la especie a lo largo de un transecto altitudinal (2,807-3,011 m) y localizados a una distancia de 150 a 1,000 m del centro del huerto.

2.2.2 Evaluación de la fenología de estructuras reproductivas

En 2014 y 2015 se registró la fenología de estructuras reproductivas en una muestra de 31 clones, con tres rametos por clon, (93 árboles en total), seleccionados con base en su producción de conos en la cosecha 2012. Durante el periodo de enero a marzo de cada año se evaluó el avance de la fenología de estróbilos femeninos en cinco ramas marcadas en la parte alta de la copa y de los estróbilos masculinos en cinco ramas de la parte baja, con una frecuencia de 3-4 d, hasta que todo el polen fue liberado y los estróbilos femeninos ya no eran receptivos. Las observaciones se hicieron en los mismos árboles los dos años, pero no necesariamente en las mismas ramas.

De manera simultánea, en cuatro sitios ubicados en rodales naturales a lo largo del transecto altitudinal se realizaron las mismas observaciones fenológicas en árboles adultos (en edad reproductiva) de *Pinus patula*, con especial atención en la formación de estróbilos masculinos. En cada sitio se seleccionaron 10 árboles con producción de estróbilos masculinos, de fácil acceso y visibilidad de la copa. La evaluación fenológica se realizó con la misma metodología empleada en el huerto y en los mismos periodos.

Para definir las etapas fenológicas de los estróbilos se empleó la metodología de Matziris (1994) para estróbilos femeninos y de Codesido y Merlo (2001) para estróbilos masculinos,

modificadas para *Pinus patula* por Hernández-Zaragoza *et al.* (2016), que considera cuatro etapas. En la etapa dos correspondiente a los estróbilos femeninos los óvulos no están receptivos, pero el polen puede permanecer dentro de las escamas y si sobrevive puede permanecer viable y fertilizar el óvulo cuando se alcanza la etapa tres, por lo que esta etapa se consideró con un 20 % de receptividad; la etapa tres es la de máxima receptividad y ocurre cuando las escamas se separan gradualmente hasta formar un ángulo recto con el eje del estróbilo, momento en que el polen puede penetrar con facilidad entre las escamas y alcanzar los óvulos, por lo que se consideró con un 100 % de receptividad. En los estróbilos masculinos la liberación de polen ocurre sólo en la etapa tres, cuando los estróbilos se alargan y adquieren un color amarillo. Cuando las ramillas marcadas tenían más de un estróbilo femenino, el periodo receptivo se consideró a partir de la fecha en que el primer estróbilo en la rama estuvo receptivo y hasta que el último de ellos terminó la etapa tres. Para el periodo de liberación del polen en cada ramilla muestreada se usó el mismo criterio.

2.2.3 Análisis de los datos

A partir de los datos fenológicos de cada rama muestreada se determinó la fecha de inicio y de terminación (número de días a partir del 1 de enero), la duración del periodo de receptividad femenina y dispersión del polen, para cada rameto y clon, con el programa SYNCHRO (Zas *et al.*, 2003). Estas variables se analizaron con el procedimiento MIXED del programa de análisis estadístico SAS (SAS Institute, 2002). En un primer análisis se comparó la fenología del periodo de dispersión del polen en el huerto semillero y en los rodales naturales vecinos en los dos años de evaluación con el siguiente modelo, en el que todos los factores se consideraron de efectos fijos, excepto el error:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + P_j + A_iP_j + \epsilon_{ijk}$$

dónde: Y_{ijk} es el valor promedio del k-ésimo clon (o árbol) en la j-ésima población [huerto semillero (HS) o rodal natural (RN)] en el i-ésimo año; μ es la media general; A_i es el efecto del i-ésimo año de evaluación; P_j es el efecto de la j-ésima población; A_iP_j es el efecto de la interacción del i-ésimo año con la j-ésima población; y ϵ_{ijk} representa el error.

En un segundo análisis se evaluaron las diferencias en la fenología de la dispersión del polen entre sitios a lo largo del transecto altitudinal (rodales naturales de 2,807 a 3,011 m), con un modelo estadístico similar al anterior, pero substituyendo las poblaciones con los sitios de muestreo. También se realizó un análisis de la fenología de los clones del huerto para estimar los componentes de varianza y la heredabilidad en sentido amplio de los valores medios por clon (H^2_c = repetibilidad clonal) de las variables asociadas con la receptividad femenina y la liberación del polen, con base en el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + C_j + A_iC_j + \epsilon_{ijk}$$

dónde: Y_{ijk} es el valor de la variable evaluada en el k-ésimo rameto del j-ésimo clon en el i-ésimo año; μ es la media general; A_i es el efecto fijo del i-ésimo año de evaluación; C_j es el efecto aleatorio del k-ésimo clon \sim NID ($0, \sigma^2_c$); A_iC_j es el efecto aleatorio de la interacción del i-ésimo año con el j-ésimo clon \sim NID ($0, \sigma^2_{ac}$); y ϵ_{ijk} es el error \sim NID ($0, \sigma^2_e$). La heredabilidad (H^2_c) se calculó con la siguiente fórmula (Falconer, 1989):

$$H^2_c = \frac{\sigma_c^2}{\sigma_c^2 + \left(\frac{\sigma_{ac}^2}{a}\right) + \left(\frac{\sigma_e^2}{ra}\right)}$$

dónde: σ^2_c es la varianza entre clones; σ^2_{ac} es la varianza debida a la interacción de años por clones; σ^2_e es la varianza debido al error; a es el número de años y r es el número de rametos por clon.

A partir de los componentes de varianza de clones (σ^2_c) y de la interacción años por clones (σ^2_{ac}) para cada característica fenológica se estimó la correlación genética tipo B (r_B) como una medida de la estabilidad genética de dichas características en los dos años de evaluación. Para ello se utilizó la siguiente ecuación:

$$r_B = (\sigma^2_c)/(\sigma^2_c + \sigma^2_{ac})$$

También se estimaron las correlaciones fenotípicas y genotípicas entre las características de floración masculina y femenina de los clones del huerto. Para las correlaciones fenotípicas se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson de los valores promedio por clon de las características de interés en los dos años de evaluación. Para las correlaciones genotípicas se

utilizaron las varianzas y covarianzas de clones (σ^2_c) obtenidas a partir del análisis de varianza descrito anteriormente y de acuerdo al procedimiento descrito por Falconer (1989).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Dispersión de polen en el huerto semillero y en rodales naturales de *Pinus patula*

La mayoría de las variables evaluadas presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre años, y entre poblaciones (huerto semillero vs. rodales naturales), excepto la fecha de terminación entre años, y la duración del periodo en la interacción de año \times población (Cuadro 2.1). En el promedio de las dos poblaciones, el periodo de dispersión de polen inició tres días antes en 2015 que en 2014, pero terminó en la misma fecha en los dos años, por lo que la duración fue tres días mayor en el segundo año (Cuadro 2.2). En los dos años de evaluación, la dispersión en el huerto semillero inició antes y terminó después que en los rodales naturales, por lo que el periodo de dispersión en el huerto fue 8 d mayor en los dos años (Cuadro 2.2). El inicio del periodo de dispersión del polen fue más estable entre años en el huerto semillero que en los rodales naturales (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.1. Significancia estadística para las fechas y duración del periodo de dispersión de polen en el huerto semillero y en los rodales naturales de *Pinus patula*.

Fuente de variación	Periodo de dispersión de polen		Duración (días)
	(días a partir del 1 de enero)		
	Inicio	Fin	
Año	<0.001	0.539	<0.001
Población [†]	<0.001	<0.001	<0.001
Año \times Población	0.004	<0.001	0.767

[†]El huerto semillero y los rodales naturales se consideraron como poblaciones distintas.

Cuadro 2.2. Valores promedio de las fechas de inicio y terminación y de la duración del periodo de dispersión de polen en el huerto semillero y en rodales naturales de *Pinus patula* en dos años de evaluación.

Año	Población	Periodo de dispersión de polen (días a partir del 1 de enero)		Duración (días)
		Inicio	Fin	
2014	Huerto semillero	71.2 b [†]	91.4 a	20.2 a
	Rodales naturales	77.0 a	89.2 b	12.2 b
	Promedio 2014:	74.1	90.3	16.2
2015	Huerto semillero	70.8 a	94.3 a	23.5 a
	Rodales naturales	71.2 a	87.1 b	15.9 b
	Promedio 2015:	71.0	90.7	19.7

[†]Valores promedio dentro de cada factor seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

2.3.2 Dispersión de polen en el transecto altitudinal de los rodales naturales

Todas las variables mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre años, entre sitios a lo largo del transecto altitudinal y en la interacción año \times sitio, excepto la fecha de inicio de la dispersión de polen entre sitios (Cuadro 2.3). En 2015, la dispersión de polen inició 6 d y terminó 2 d antes que en 2014, con una duración 4 d mayor (Cuadro 2.4). En los dos años se observa que en los sitios de mayor elevación se adelanta la terminación de la dispersión de polen, y se reduce la duración del periodo de dispersión, excepto en S4 durante el primer año de medición (Cuadro 2.4).

Cuadro 2.3. Significancia estadística para fechas y duración del periodo de dispersión de polen en rodales naturales de *Pinus patula* a lo largo de un transecto altitudinal.

Fuente de variación	Fechas del periodo de dispersión (días a partir del 1 de enero)		Duración (días)
	Inicio	Fin	
	Año	<0.001	0.013
Sitio	0.137	<0.001	<0.001
Año × Sitio	0.012	0.015	0.019

Cuadro 2.4. Valores promedio de las fechas de inicio y terminación y de la duración del periodo de dispersión de polen en rodales naturales de *Pinus patula* a lo largo de un transecto altitudinal en dos años de evaluación.

Año	Sitio (altitud)	Periodo de dispersión de polen (días a partir del 1 de enero)		Duración (días)
		Inicio	Fin	
	2014	S ₁ (2,807 m)	77.9 a [†]	90.0 ab
S ₂ (2,870 m)		73.0 a	87.9 b	14.9 a
S ₃ (3,011 m)		75.5 a	86.1 b	10.6 b
S ₄ (3,009 m)		81.5 a	92.7 a	11.2 b
Promedio 2014:			77.0	89.2
2015	S ₁ (2,807 m)	71.4 a	89.7 a	18.3 a
	S ₂ (2,870 m)	72.7 a	88.6 a	15.9 a
	S ₃ (3,011 m)	70.1 a	83.7 b	13.7 b
	S ₄ (3,009 m)	70.5 a	86.2 ab	15.7 a
	Promedio 2015:		71.2	87.1

[†]Valores promedio dentro de cada factor seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

2.3.3 Variación clonal en la fenología reproductiva en el huerto semillero

Dentro del huerto semillero no se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre años en la fecha de inicio de la receptividad femenina y de la dispersión del polen, pero sí en la fecha de terminación y en la duración de los periodos respectivos (Cuadro 2.5). Ambos periodos se prolongaron en 2 a 3 d en 2015, con respecto a 2014 (Cuadro 2.5). En los dos años, el periodo de receptividad femenina tuvo una duración 8-9 d mayor que la dispersión de polen, ya que inició 12-13 d antes y terminó 3-4 d antes que este último.

Cuadro 2.5. Valores promedio por año de las fechas de inicio y terminación y de la duración del periodo de receptividad femenina y dispersión de polen en el huerto semillero de *Pinus patula* en dos años de evaluación.

Año	Receptividad femenina			Dispersión de polen		
	Inicio	Fin	Duración (núm. de días)	Inicio	Fin	Duración (núm. de días)
2014	58.2 a [†]	88.0 b	29.8 b	71.2 a	91.4 b	20.2 a
2015	58.5 a	90.7 a	32.2 a	70.8 a	94.3 a	23.5 b

[†]Valores promedio dentro de cada factor seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

A nivel de clones se encontró variación genética en todas las variables fenológicas, excepto en la duración del periodo de receptividad femenina (Cuadro 2.6). La variación debida a la interacción año por clon fue relativamente baja (menor de 33 % de la variación clonal) en la mayoría de las variables que mostraron variación genética, excepto en la fecha de terminación de la dispersión del polen, lo que se reflejó en correlaciones genéticas tipo B (r_B) elevadas para la mayoría de las características, excepto en la duración del periodo de receptividad y en la terminación del periodo de dispersión del polen (Cuadro 2.6). Con excepción de la duración del periodo de receptividad femenina, todas las variables de fenología reproductiva presentaron una heredabilidad en sentido amplio de moderada a alta, con valores de H^2_c que fluctuaron de 0.09

a 0.60 (Cuadro 2.6). El periodo de dispersión del polen presentó un control genético mayor que el periodo de receptividad femenina, en particular, la fecha de inicio y la duración de la dispersión.

Cuadro 2.6. Componentes de varianza, relación σ^2_{ac}/σ^2_c , heredabilidad en sentido amplio de las medias de clones (H^2_c) y correlaciones genéticas tipo B (r_B) para las fechas de inicio y terminación y la duración del periodo de receptividad femenina y de dispersión de polen en el huerto semillero de *Pinus patula* en dos años de evaluación.

Parámetro	Receptividad femenina			Dispersión de polen		
	Inicio	Fin	Duración (núm. de días)	Inicio	Fin	Duración (núm. de días)
σ^2_c	3.93	1.22	0.00	12.00	0.34	8.34
σ^2_{ac}	0.77	0.00	1.04	1.87	1.49	2.70
σ^2_e	36.87	13.24	28.83	42.95	15.85	34.07
σ^2_{ac}/σ^2_c	0.20	0.00	---	0.16	4.38	0.32
H^2_c	0.38	0.36	0.00	0.60	0.09	0.54
r_B	0.83	1.00	0.00	0.87	0.19	0.76

σ^2_c : varianza entre clones; σ^2_{ac} : varianza debida a la interacción de años por clones; σ^2_e : varianza debido al error; H^2_c : heredabilidad en sentido amplio de las medias de clones; r_B : correlaciones genéticas tipo B.

Las correlaciones genotípicas que involucraron la duración del periodo de receptividad fueron nulas o fuera del rango lógico (Cuadro 2.7). Las fechas de inicio y terminación de dispersión de polen presentaron una correlación positiva alta entre ellas ($r_g = 0.96$) pero una correlación negativa con la duración del periodo ($r_g = -1.00$). La fecha de inicio del periodo de receptividad femenina también tuvo una correlación genotípica positiva moderada ($r_g = 0.67$) con la fecha de inicio del periodo de liberación de polen. A nivel fenotípico, la correlación entre el inicio y la terminación del periodo de receptividad femenina fue mayor ($r_p = 0.83$) que entre

el inicio y la terminación del periodo de dispersión del polen ($r_p = 0.49$), pero en ambos casos, la fecha de inicio tuvo una correlación negativa elevada con la duración del periodo respectivo ($r_p \leq -0.85$). Por otro lado, las correlaciones fenotípicas entre las características del periodo de receptividad femenina y las del periodo de liberación de polen fueron relativamente débiles, con signo negativo o positivo entre ellas ($-0.61 \leq r_p \leq 0.60$) (Cuadro 2.7).

Cuadro 2.7. Correlaciones genotípicas (izquierda de la diagonal) y fenotípicas (derecha de la diagonal) entre las características fenológicas del periodo de receptividad femenina y de dispersión de polen en el huerto semillero de *Pinus patula*.

	Receptividad femenina			Dispersión de polen		
	Inicio	Fin	Duración	Inicio	Fin	Duración
<u>Receptividad femenina:</u>						
Inicio		0.83	-0.85	0.60	0.37	-0.50
Fin	1.65		-0.42	0.39	0.33	-0.28
Duración	-	-		-0.61	-0.30	0.56
<u>Dispersión de polen:</u>						
Inicio	0.67	0.19	-		0.49	-0.90
Fin	1.51	1.73	-	0.96		-0.06
Duración	-0.91	-0.32	-	-1.00	-1.00	

2.4 DISCUSIÓN

2.4.1 Diferencias entre años en la fenología reproductiva de *Pinus patula*

En el año 2015 la dispersión de polen en los rodales naturales a lo largo del transecto altitudinal inició antes pero terminó en las mismas fechas que en el año anterior, por lo que tuvo una mayor duración (Cuadro 2.2). Esta tendencia no fue similar en los eventos fenológicos de receptividad femenina y liberación del polen en el huerto semillero, debido a que no se encontraron diferencias entre años en el inicio de la receptividad femenina y la dispersión de polen; sin embargo, la terminación ocurrió después en el segundo año, ocasionando una mayor duración de los dos periodos. Los resultados del periodo de liberación del polen contrastan con los datos del capítulo anterior, en el que se describe que la dispersión de polen tanto en el huerto como en los rodales naturales inició antes y terminó antes en 2014 que en 2015. Sin embargo, estas diferencias pueden atribuirse al método de evaluación usado en cada caso, ya que en el capítulo anterior las fechas del periodo de dispersión de polen se determinaron con base en la captura de granos de polen sin identificar la fuente de origen, mientras que en el estudio actual, se utilizó una muestra de árboles en los rodales naturales y de clones en el huerto semillero en la que se registraron los eventos fenológicos de manera directa. Es posible, por lo tanto, que los árboles y clones muestreados en esta fase del estudio no hayan sido los primeros en dispersar el polen capturado por las trampas.

Además del método de evaluación, las condiciones ambientales de temperatura, y en especial de la humedad relativa, también pudieron influir en la capacidad para detectar con precisión la fecha de inicio de la dispersión de polen por las trampas. En diferentes estudios se demostró que el inicio de la dispersión del polen está correlacionado con la temperatura y la acumulación de grados-día (Luomajoki, 1993); es decir, una mayor temperatura indicó una fecha de inicio temprana (Torimaru *et al.*, 2013); como se demostró en un huerto semillero de *Larix principis-rupprechtii* Mayr. (Zhang *et al.*, 2001). Por otro lado, una humedad relativa alta redujo la capacidad de dispersión del polen de *Pinus strobus* L., *Pinus contorta* Douglas ex Loudon, *Abies amabilis* (Dougl.) Forbes, entre otras (Ebell y Schmidt, 1964). Los datos de este capítulo indican que en 2015 los estróbilos masculinos alcanzaron antes la etapa de dispersión del polen que en 2014, pero en los primeros días la dispersión fue intermitente y a corta distancia

por los eventos de lluvia que se presentaron. Esta situación pudo haber ocasionado sesgos en la estimación de la fecha de inicio de liberación del polen con las trampas de captura de polen en ese año en particular.

Independientemente de las diferencias atribuibles a los métodos de estimación de los eventos fenológicos, en los rodales naturales se encontró una mayor diferencia entre años en la fecha de inicio de la liberación del polen que en el huerto semillero. Esto indica que el riesgo de contaminación genética en el huerto puede variar de un año a otro en función del grado de traslape que ocurra con el periodo de receptividad femenina en los clones del huerto y del grado de competencia que se genere con el polen producido por los mismos clones. Estas implicaciones se discutirán con mayor detalle en una sección posterior del documento.

2.4.2 Diferencias en el periodo de dispersión de polen entre el huerto semillero y los rodales naturales

La dispersión de polen en el huerto semillero inició antes y terminó después que en los rodales naturales, con una mayor duración del periodo en los dos años de evaluación. Estos resultados son consistentes con el estudio previo (Capítulo 1) y se pudo deber, al menos en parte, a la menor edad y mayor vigor de los árboles en el huerto, así como a la variación genética entre los clones del huerto. Estudios anteriores muestran que el desarrollo fenológico de las estructuras reproductivas está asociado con el crecimiento vegetativo del brote (Dick *et al.*, 1990), y el periodo de crecimiento del brote generalmente inicia antes en árboles jóvenes de *Pinus pinaster* Aiton (Miguel-Pérez *et al.*, 2002). Además, en árboles jóvenes, de menor tamaño, los estróbilos masculinos en la parte baja de la copa están más cercanos al suelo, donde la temperatura puede ser mayor, lo que puede acelerar el desarrollo de los estróbilos masculinos (Lindgren *et al.*, 1995). Por otro lado, Nikkanen (2001) mencionó que la competencia por espacio entre árboles influye sobre la fenología de la floración masculina; a menor competencia entre árboles la floración se adelanta, porque los estróbilos se encuentran más expuestos a la luz solar y con mayor ventilación.

En los dos años de evaluación se encontró un amplio traslape en el periodo de dispersión de polen en el huerto y los rodales naturales, con 8 d en común. Esto indicó que existe el riesgo de que el polen externo llegue al huerto y fecunde los óvulos receptivos. Sin embargo, este

riesgo de contaminación puede variar en función de otros factores, como el tamaño del huerto, la capacidad de producción de polen en el huerto, la variación fenológica entre los clones del huerto y el nivel de sincronización del periodo de receptividad femenina con la producción de polen, entre otros (Di-Giovanni y Kevan, 1991). Pulkkinen (1994) señaló que los huertos con mayor superficie son más tolerantes a la contaminación por polen externo. Por otro lado, en el capítulo anterior se determinó que la producción de polen en el huerto fue 2.5 veces mayor que en los rodales, lo que hace suponer que el huerto puede contrarrestar el impacto del flujo de polen de los rodales cercanos. Diversos autores señalaron que la variación fenológica y el nivel de sincronización reproductiva entre los clones del huerto fue quizás el factor mayor importancia sobre el riesgo de contaminación genética en el huerto (El-Kassaby *et al.*, 1984; Reynolds y El-Kassaby, 1990); si la floración de los clones no está sincronizada, la contribución del polen externo será sustancial (Harju y Nikkanen, 1996), sobretodo porque usualmente los estróbilos femeninos se encuentran receptivos antes que ocurra la dispersión de polen (Pulkkinen, 1994).

2.4.3 Diferencias en la dispersión de polen en rodales naturales a lo largo del transecto altitudinal

En los rodales muestreados a lo largo del transecto altitudinal sólo se encontraron diferencias en la fecha de terminación y en la duración del periodo de dispersión (Cuadro 2.4), confirmando los resultados del capítulo anterior. Sin embargo, el patrón detectado entre sitios no fue consistente, ya que el seguimiento de la fenología de los estróbilos masculinos indicó una duración de hasta 5 d mayor en la dispersión de polen con respecto a los valores registrados con las trampas. En este sentido, el método de seguimiento fenológico permitió observar con mayor precisión el efecto altitudinal sobre el periodo de dispersión de polen.

En estudios anteriores se encontró que los árboles que inician antes la dispersión de polen generalmente tienen un periodo mayor de dispersión (Codesido *et al.*, 2005). Sin embargo, en los rodales naturales muestreados no se encontró un patrón claro en este sentido a lo largo del gradiente altitudinal, debido quizás al efecto conjunto de otros factores como la edad y tamaño de los árboles. En los sitios de mayor elevación, la edad del arbolado fue menor (16 y 20 años) y de menor tamaño, con un diámetro promedio entre 15 y 18 cm (Capítulo 1). De cualquier manera, se observó la tendencia a acortarse el periodo de dispersión de polen al aumentar la elevación, de manera similar a lo reportado en *Pinus roxburghii* Sarg. (Khanduri, 2012). Otros

estudios señalaron que la tendencia general en las especies de pino a retrasar y acortar el periodo de dispersión de polen al aumentar la elevación del sitio (Griffin, 1980; Mohan *et al.*, 2012).

A pesar de que no hubo diferencias estadísticas significativas en la fecha de inicio de la dispersión de polen entre los rodales a lo largo del gradiente altitudinal, la menor duración del periodo de dispersión en los sitios de mayor elevación indicó que el riesgo de contaminación de polen se reduce conforme aumenta la diferencia de elevación entre el huerto y los rodales naturales, dado que el periodo de traslape entre ambos se redujo de dos a cuatro días.

2.4.4 Variación clonal en la fenología reproductiva del huerto semillero

La duración promedio del periodo de receptividad femenina fue de 29.8 d en 2014 y 32.2 d en 2015, 9 d más que el periodo de liberación de polen en ambos años (20.2 d y 23.5 d) (Cuadro 2.5), debido a un inicio más temprano del periodo de receptividad femenina. Estos resultados fueron similares a los encontrados en *Pinus radiata* (Codesido *et al.*, 2005), *P. nigra* Arn. (Lario *et al.*, 2001) y *P. sylvestris* (Burczyk y Chalupka, 1997). Pulkkinen (1994) señaló que en especies del género *Pinus* es común el fenómeno de “metándria”, en el cual los estróbilos femeninos están receptivos antes que los estróbilos masculinos en el mismo árbol. Sin embargo, en el caso de *Pinus patula* la mayor precocidad y duración del periodo de receptividad se debe, al menos en parte, al sesgo generado por la manera en que se definió el inicio de la receptividad, a partir de la etapa fenológica 2 (con un 20 % de receptividad). Cuando se elimina el efecto del sesgo de la etapa 2 en la determinación del inicio de la receptividad femenina, sólo el 23 y 13 % de los clones en 2014 y 2015, respectivamente, presentaron el efecto de metándria.

Sin embargo, la correlación genotípica ($r_g = 0.67$) y fenotípica ($r_p = 0.60$) positivas entre el inicio del periodo de receptividad y de liberación de polen indicó que los clones más tempranos para la receptividad femenina también lo son para la liberación de polen. Estos resultados fueron similares a lo encontrado en *Pseudotsuga menziesii* (El-Kassaby *et al.*, 1984) y *Pinus taeda* L. (Askew, 1988) en donde se reportan correlaciones positivas que variaron de 0.45 a 0.63 entre los eventos relacionados con la receptividad femenina y liberación de polen en clones o familias en diferentes años de evaluación en huertos semilleros. Sin embargo, en clones de *Picea abies* (L.) H. Karst. (Nikkanen, 2001) encontró que la correlación fenotípica entre el periodo de receptividad femenina y la liberación del polen varió de 0.26 a 0.53 en diferentes ciclos

reproductivos, y en *Pinus nigra*, Matziris (1994) encontró una baja correlación entre el inicio de la receptividad y de la dispersión de polen ($r_p = 0.35$) en un año de medición, lo cual indicó que sólo una pequeña porción (10%) de la variación en la fecha de dispersión del polen se atribuyó a la fecha de receptividad femenina. Aunque el grado de asociación entre estas características en *P. patula* no fue alto, la moderada correlación genotípica y fenotípica entre ellas indicaron que desde el punto de vista genético y fisiológico los dos procesos no fueron independientes y sugiere un posible riesgo de autofecundación que podría afectar negativamente la producción de semilla y la eficiencia genética del huerto.

Los resultados mostraron que existe una amplia variación genética entre los clones del huerto en las fechas de los eventos fenológicos asociados con los periodos de receptividad femenina y dispersión del polen, de manera similar a lo que se encontró en otras especies de coníferas, como *Pinus radiata* (Codesido *et al.*, 2005), *Pseudotsuga menziesii* (El-Kassaby y Askew, 1991) y *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. (El-Kassaby y Reynolds, 1990). Sin embargo, a diferencia de otros estudios, en los clones de *Pinus patula* muestreados no se encontró variación genética en la duración del periodo de receptividad. Además, los valores reducidos de σ_{ac}^2 y elevados de r_B para la mayoría de las características del periodo de floración indican que las diferencias fenológicas entre los clones son relativamente estables entre años y con un fuerte control genético en la mayoría de estas características.

En el presente estudio, el periodo de liberación de polen mostró un control genético mayor que el periodo de receptividad femenina, contrario a lo que se encontró en otras especies como *Pinus radiata* (Griffin, 1984; Codesido *et al.*, 2005), *P. nigra* (Matziris, 1994) y *Picea abies* (Nikkanen, 2001), en donde los eventos asociados al periodo de receptividad femenina tuvieron un control genético similar o incluso mayor a los del periodo de dispersión del polen. En esas especies se encontró que los eventos fenológicos asociados al inicio y duración del periodo de liberación del polen fueron más afectados por la variación de los factores micro-ambientales, lo que ocasiona un control genético menor que en el caso del periodo de receptividad femenina. A pesar de lo anterior no se encontró ese efecto en la fecha de inicio del periodo de liberación del polen en los clones de *Pinus patula* evaluados en el presente estudio, aunque sí se manifestó en la fecha de terminación del periodo de liberación, de manera similar a lo ocurrido en *P. radiata* (Griffin, 1984; Codesido *et al.*, 2005). En el caso del periodo de receptividad femenina, la

mayor heredabilidad de la fecha de inicio con respecto a la duración del periodo de receptividad, coincidió con los resultados de Matziris (1994) en *P. nigra*; este autor indica que generalmente la fecha de inicio de los periodos fenológicos tienen un mayor control genético que la duración de dichos periodos.

Por otro lado, la correlación fenotípica negativa entre las fechas de inicio de los periodos de receptividad y dispersión del polen con la duración respectiva de esos periodos indica que los clones con mayor duración del periodo de receptividad femenina iniciaron más temprano en el año, por lo que el riesgo potencial de contaminación genética fue menor en ellos, dado que el periodo de dispersión de polen en los rodales naturales inicia después que en el huerto. En clones de *Pinus radiata* (Codesido *et al.*, 2005) se encontraron correlaciones similares entre la fecha de inicio y la duración de las etapas de la fenología reproductiva, lo cual tiene implicaciones importantes sobre la eficiencia genética del huerto, ya que los clones con un periodo mayor de receptividad femenina o de dispersión de polen tuvieron mayores posibilidades de transmitir sus genes a la progenie del huerto (Boes *et al.*, 1991).

2.4.5 Implicaciones sobre la contaminación genética en el huerto semillero

El amplio traslape encontrado en el periodo de receptividad femenina y de dispersión del polen en el huerto semillero de *Pinus patula* con el periodo de dispersión del polen en los rodales naturales vecinos advierte del riesgo potencial que existe en la contaminación genética del huerto, lo que afectaría negativamente la calidad genética de la semilla y la ganancia genética esperada en las plantaciones al usar este germoplasma. En otros estudios también se encontró que la falta de aislamiento fenológico fue un factor importante en el riesgo de contaminación por polen externo en los huertos semilleros, como en el caso de *Pinus sylvestris* (Parantainen y Pulkkinen, 2003); *Pseudotsuga menziesii* (El-Kassaby y Ritland, 1986a) y *Picea abies* (Pakkanen *et al.*, 2000).

Sin embargo, los resultados en el huerto de *Pinus patula* también muestran que este riesgo varía de un año a otro, por la modificación en el periodo de liberación del polen asociada a la secuencia de condiciones climáticas en cada ciclo reproductivo. El mayor riesgo de contaminación genética procede de los rodales vecinos situados a elevaciones similares del

huerto, ya que conforme aumenta la elevación del sitio se reduce la duración del periodo de dispersión y, por lo tanto, el grado de traslape.

Por otro lado, el control genético elevado y la fuerte estabilidad genética de los clones en los eventos de la fenología reproductiva femenina y masculina indican que el riesgo de contaminación genética varía entre ellos. Por ejemplo, los clones con un periodo temprano de receptividad tienen menor grado de exposición al polen externo, reduciendo sus posibilidades de contaminación, con respecto a los clones con un periodo tardío de receptividad. Además, la variación genética de los clones en el periodo de dispersión de polen permite que se mantenga un nivel de competencia adecuado con el polen externo durante todo el periodo de dispersión de los rodales naturales (ver resultados del Capítulo 1).

No obstante que los clones con un periodo temprano de receptividad tienen menos riesgo de contaminación por polen externo, también podrían tener problemas mayores de polinización y producción de semilla llena, por la presencia menor de polen en el huerto. Sin embargo el efecto sobre el tamaño efectivo de población y la eficiencia genética del huerto en la cosecha de semilla sería mínimo, ya que la amplia variación genética en los eventos fenológicos femeninos y masculinos en el huerto y la relativa independencia genética entre ellos favorecen la polinización cruzada entre los clones, asegurando una aportación de todos ellos ya sea a través de los óvulos o del polen. Actividades de manejo que permitan acelerar los eventos de la fenología reproductiva (tanto femenina como masculina) en el huerto para aumentar el grado de aislamiento fenológico con la dispersión de polen externo, o el uso de polinización complementaria (El-Kassaby y Reynolds, 1990) podrían ser útiles para reducir el riesgo de contaminación genética.

2.5 CONCLUSIONES

Los resultados muestran que no hay diferencias entre años en los eventos fenológicos de receptividad femenina y liberación de polen en el huerto semillero de *Pinus patula*; sin embargo en el segundo año es mayor la duración de ambos periodos. En cambio, en los rodales naturales hay una mayor diferencia entre años en la fecha de inicio de la liberación de polen. Por otro lado, la dispersión de polen en el huerto semillero inició antes y terminó después que en los rodales naturales cercanos, con una mayor duración del periodo en los dos años de evaluación. Esto indica que existe riesgo de contaminación genética en el huerto, pero el riesgo varía de un año a otro en función del grado de traslape que hay en el año con el periodo de receptividad femenina de los clones del huerto.

También se encontró una amplia variación genética entre los clones del huerto y una moderada correlación genotípica y fenotípica entre el inicio del periodo de receptividad y de liberación de polen, lo que indica que los procesos no son independientes y sugiere riesgos de autofecundación. El control genético elevado y la estabilidad genética de los clones en la fenología reproductiva femenina y masculina indican que el riesgo de contaminación genética varía entre clones según su precocidad. Se recomiendan actividades de manejo que permitan acelerar los eventos fenológicos al interior del huerto semillero para aumentar el grado de aislamiento fenológico con la dispersión de polen de los rodales vecinos, o aumentar la presencia del polen del huerto para competir favorablemente con el polen de los rodales vecinos.

CAPÍTULO III

VARIACIÓN CLONAL EN LA SINCRONIZACIÓN FENOLÓGICA Y EN LA PRODUCCIÓN DE CONOS EN UN HUERTO SEMILLERO DE *Pinus patula*

RESUMEN

El grado de sincronización entre la receptividad femenina y la dispersión de polen y el nivel de fecundidad de los clones influyen en el tamaño efectivo de población y la diversidad genética del germoplasma producido en los huertos semilleros. El objetivo fue determinar el nivel de variación clonal en el grado de sincronización entre la receptividad femenina y la liberación de polen del mismo clon ($\bar{O}_i\bar{P}_i$); de otros clones ($\bar{O}_i\bar{P}_j$) y de rodales naturales cercanos ($\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$), y en la producción de conos femeninos en un huerto semillero de *Pinus patula*. En 2014 y 2015 se registró la fenología de las estructuras reproductivas femeninas y masculinas en 31 clones del huerto y de las estructuras masculinas en árboles de cuatro rodales naturales vecinos de la misma especie, así como la cantidad de conos femeninos maduros obtenidos en las cosechas de 2014, 2015 y 2016. Con los datos de fenología se calcularon los índices de sincronización fenológica para cada clon y por grupos de precocidad (tempranos, intermedios y tardíos). También se estimaron los parámetros genéticos relacionados con la producción de conos en los clones muestreados y su relación con la precocidad y el índice de sincronización $\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$. Existe una amplia variación entre clones en los índices de sincronización calculados, pero en la mayoría de los casos no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de precocidad, ni son consistente entre ciclos reproductivos. A nivel global del huerto, el riesgo de contaminación por polen externo es mayor que el de autofecundación y cambia de un año a otro. La producción de conos en el huerto presentó una amplia variación genética y entre años, con un control genético elevado ($H^2_c \geq 0.80$) y estable entre ciclos de cosecha ($r_B \geq 0.79$). Existe un desbalance en la contribución de los clones a la cosecha de conos femeninos, de manera consistente entre años. Las correlaciones negativas [$r_p = -0.37$ y -0.40 ($P < 0.05$)] de la producción de conos por clon en las cosechas 2014 y 2016 con el índice $\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$ en 2014, muestra que los clones más prolíficos tienen menor sincronización con la liberación del polen en los rodales naturales vecinos al huerto.

Palabras clave: sincronización fenológica, variación genética, heredabilidad, fecundidad.

CLONAL VARIATION OF PHENOLOGICAL SYNCHRONIZATION AND CONE PRODUCTION IN A *Pinus patula* SEED ORCHARD

ABSTRACT

The degree of synchronization between female receptivity and pollen dispersal, and the fecundity level of clones, influence the effective population size and genetic diversity of seeds produced in seed orchards. The objective was to determinate the level of clonal variation in the degree of synchronization between female receptivity and pollen dispersal from the same clone ($\bar{O}_i\bar{P}_i$); other clones ($\bar{O}_i\bar{P}_j$), and nearby natural stands ($\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$), and in production of seed cones in a *Pinus patula* seed orchard. In 2014 and 2015, the phenology of female and male reproductive structures was recorded in 31 clones from the *P. patula* orchard, as well as the phenology of male structures in trees from four natural stands nearby. In addition, seed cones were harvested in 2014, 2015 and 2016. Synchronization index values were calculated from phenology data for each clone and for precocity groups (early, intermediate, and late clones). Genetic parameters were also estimated for seed cone productions and the relationship of this trait with phenology traits and synchronization index $\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$. A large variation was found in the synchronization indices among clones, but in most cases the differences between precocity groups were not significant ($p=0.05$), and they were not consistent across reproductive cycles. The risk of pollen contamination was larger than of selfing in the orchard, and it changed among years. A large variation among clones and years in cone production was found in the orchard, with a high clonal repeatability ($H^2_c \geq 0.80$) and genetic stability across harvest cycles ($r_B \geq 0.79$). Thus, the clonal contribution to the cone crop is highly and consistently unbalanced across years. The negative correlations [$r_p = -0.37$ y -0.40 ($P < 0.05$)] of cone production per clone in 2014 and 2016 cone crops with $\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$ index values in 2014, showed that the more prolific clones had less synchrony with the pollen release in nearby natural stands.

Key words: Phenological synchronization, genetic contamination, genetic variation, fecundity.

3.1 INTRODUCCIÓN

El objetivo principal de un huerto semillero es producir grandes cantidades de semillas de alta calidad genética (Askew, 1988) para actividades de reforestación y plantaciones comerciales, además de funcionar como población de mejora o cruzamiento (Erteiken, 2012). Para que un huerto semillero alcance la máxima calidad, ganancia y diversidad genética se requiere de una completa sincronización de la floración y de equidad en la capacidad reproductiva (Kang, 2001), con una distribución aleatoria de clones y rametos que permitan un equilibrio panmítico y un balance parental en las cosechas de semilla (Kang *et al.*, 2004; Prescher *et al.*, 2007). Estas características, asociadas con un número suficiente de clones, contribuyen, además, a reducir las posibilidades de auto-fecundación y a minimizar la endogamia en la progenie (Kang, 2001). En particular, la sincronización de la floración entre clones diferentes promueve el cruzamiento aleatorio (panmixia); sin embargo, cualquier variación en el comportamiento fenológico de la floración de los clones ocasiona desviaciones con respecto al supuesto de panmixia e influye en el intercambio de genes y consecuentemente en la composición y diversidad genética de las semillas (El-Kassaby *et al.* 1984).

Reynolds y El-Kassaby (1990) indicaron que el factor de mayor importancia en la diversidad genética de la semilla producida en un huerto semillero es el balance en la capacidad productiva de los clones y la sincronización en los periodos de floración. Una sincronización baja entre la receptividad femenina y la dispersión de polen tiene efectos negativos sobre el equilibrio panmítico del huerto (Matziris, 1994), debido a que ocasiona desbalance en la contribución de los clones, cruza no aleatorias entre ellos, o incremento en la proporción de semillas vanas. Si las semillas son recolectadas de clones que no están sincronizados fenológicamente, la diversidad genética estará por debajo del nivel ideal, reduciendo la eficiencia genética del huerto (Kang y Lindgren, 1998).

Además, conforme se reduce la sincronización entre los clones del huerto, aumenta el riesgo por contaminación de polen de fuentes externas (Webber y Painter, 1996), reduciendo la ganancia genética y la tasa de cruzamiento dentro del huerto, cambiando las frecuencias alélicas y genotípicas entre la población del huerto y sus semillas (El-Kassaby, 1989). El nivel de contaminación del polen se ve afectado por diferentes factores, entre los que destacan la

proximidad y el tamaño de la fuente de contaminación, la sincronía reproductiva entre el huerto y la fuente externa, y la variación fenológica entre clones dentro del mismo huerto (Di-Giovanni y Kevan, 1991). Por ejemplo, El-Kassaby y Ritland (1986a) encontraron que el grado de contaminación genética por polen externo en huertos de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco de Columbia Británica, varió de 18 % en clones tardíos a 24 % en clones precoces. De manera similar, en un huerto semillero de la misma especie en Oregon, el porcentaje de contaminación por polen externo varió de 28.3 % en clones tardíos a 55.5 % en clones precoces (Slavov *et al.*, 2005). En ambos casos la contaminación de polen fue mayor en clones precoces fenológicamente en su periodo de receptividad femenina que en clones tardíos.

Por otra parte, en un ciclo reproductivo del huerto semillero es poco común que todos los clones produzcan la misma cantidad de estructuras reproductivas, por lo que es razonable suponer que el lote de semillas cosechadas en un año en particular no representa el pool genético total de los clones del huerto (Erteiken, 2012). Es común que una porción reducida de los progenitores aporten una cantidad desproporcionadamente grande a la cosecha del huerto (El-Kassaby *et al.*, 1989b), lo que por un lado aumenta la relación genética en la progenie pero también ocasiona una reducción en la diversidad genética de la semilla cosechada (Kang, 2001). Algunos autores reportaron grandes diferencias en la producción de conos entre clones de *Pinus sylvestris* L. (Nikkanen y Velling, 1987) y *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. (Chaisurisri y El-Kassaby, 1993). Generalmente una cuarta parte de los clones con mayor floración producen más de la mitad de los estróbilos masculinos y femeninos, y alrededor de 50 % de los clones con la mayor capacidad productiva aportan 80-90 % de conos femeninos o de ambos sexos (Chalupka, 1991).

A pesar de que no parece haber una asociación directa entre la producción de conos y el grado de sincronización floral de los clones (Sedgley y Griffin, 1989), el efecto de la contribución desigual de los clones puede modificarse por la variación de la fenología reproductiva dentro del huerto (Di-Giovanni y Kevan, 1991). Los progenitores más fértiles pueden incluso ser parcial o totalmente excluidos de la reproducción sexual por otros clones si los estróbilos masculinos dispersan polen antes de que los estróbilos femeninos estén receptivos, o viceversa, si los estróbilos femeninos están receptivos antes de que ocurra la dispersión de polen (Funda y El-Kassaby, 2012). Gömöry *et al.* (2003) determinaron que en un huerto

semillero de *Pinus sylvestris*, 15 % de los clones presentaron floración precoz o tardía, por lo que ese grupo de clones no fueron polinizados por otros clones del huerto sino por polen externo, incrementando el nivel de contaminación en el huerto.

Estudios sobre variación en la producción de estróbilos femeninos en clones son la base para el manejo de huertos de primera generación y para la selección de clones con la finalidad de establecer huertos de generaciones avanzadas (Huwei *et al.*, 2014). Además, la producción de estróbilos femeninos está altamente correlacionada con la producción de semillas en los huertos semilleros (El-Kassaby *et al.*, 1989b). En varias especies de coníferas se ha observado una variación significativa entre clones y años en la capacidad productiva de conos femeninos, como es el caso de *Pinus tabuliformis* Carriere (Huwei *et al.*, 2014), *P. sylvestris* (Buczzyk y Chalupka, 1997; Bilir *et al.*, 2008), *P. koraiensis* Sieb *et Zucc.* (Kang y Lindgren, 1999), *P. thunbergii* Parl. (Kang *et al.*, 2004), y *Pseudotsuga menziesii* (El-Kassaby *et al.*, 1989b), entre otras.

En 2003 se estableció un huerto semillero de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. *et Cham.*, en la Sierra Norte de Puebla, dentro del área de distribución natural de la especie, a una elevación de 2,860 m, el cual se encuentra en la fase de producción de semilla. Los objetivos del estudio fueron: 1) Determinar el nivel de variación clonal en el grado de sincronización fenológica entre la receptividad de óvulos femeninos con la fenología de la liberación de polen del mismo clon, de otros clones y de rodales naturales cercanos; 2) determinar si el grado de sincronización fenológica de los clones del huerto semillero y los árboles en rodales naturales es estable entre años; y 3) determinar el nivel de variación clonal en la capacidad productiva de conos femeninos y su relación con el riesgo de contaminación genética por polen externo.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Área de estudio

El estudio se realizó en un huerto semillero clonal de *Pinus patula* de 10 años de edad, establecido con injertos en la Reserva Forestal Multifuncional “El Manantial”, en el municipio de Aquixtla, Puebla, México (19° 43' 13" N, 97° 59' 20" O, 2,860 m). El huerto cubre una superficie de 1.2 ha, en un diseño completamente al azar con un espaciamiento de 3 x 3 m con diferente número de rametos; al momento del estudio en el huerto se mantenían un total de 657 rametos de 82 clones (1-22, promedio = 8 y mediana = 7). Para los propósitos del estudio, también se evaluó la fenología de la dispersión de polen en cuatro rodales naturales coetáneos de la especie a lo largo de un transecto altitudinal (2,807-3,011 m), a una distancia de 150 a 1,000 m del centro del huerto.

3.2.2 Evaluación de la fenología reproductiva y capacidad productiva de conos

En 2014 y 2015 se registró la fenología de estructuras reproductivas en una muestra de 31 clones del huerto, con tres rametos por clon, (93 árboles en total), seleccionados con base en su producción de conos en la cosecha 2012. Durante el periodo de enero a marzo de cada año se evaluó el avance de la fenología de estróbilos femeninos en cinco ramas marcadas en la parte alta de la copa y de los estróbilos masculinos en cinco ramas de la parte baja, con una frecuencia de 3-4 d, hasta que todo el polen fue liberado y los estróbilos femeninos ya no eran receptivos. Las observaciones se hicieron en los mismos árboles los dos años, aunque no necesariamente en las mismas ramas por la variación natural entre años en la producción de estructuras reproductivas.

De manera simultánea, en cuatro sitios ubicados en los rodales naturales a lo largo del transecto altitudinal se realizaron las mismas observaciones fenológicas en árboles adultos (en edad reproductiva) de *Pinus patula*, con especial atención en la formación de estróbilos masculinos y dispersión del polen. En cada sitio se seleccionaron 10 árboles con producción de estróbilos masculinos, de fácil acceso y visibilidad de la copa. La evaluación fenológica se realizó con la misma metodología empleada en el huerto y en los mismos periodos. Para definir las etapas fenológicas de los estróbilos se empleó la metodología de Matziris (1994) para

estróbilos femeninos y la de Codesido y Merlo (2001) para estróbilos masculinos, modificadas para *Pinus patula* por Hernández-Zaragoza *et al.* (2016), que considera cuatro etapas fenológicas, las que se describen con detalle en el Capítulo II de esta tesis.

Para determinar la capacidad productiva de conos en los clones muestreados, se recolectaron y contaron todos los estróbilos femeninos maduros presentes en la copa de los 31 clones con sus respectivos tres rametos a finales de abril en los años 2014, 2015 y 2016, los cuales corresponden a los ciclos reproductivos que iniciaron en la primavera de 2012, 2013 y 2014, respectivamente.

3.2.3 Análisis de los datos

A partir de los datos fenológicos de cada rama muestreada se determinó la fecha de inicio y terminación (número de días a partir del 1 de enero), y la duración del periodo de receptividad femenina y de dispersión del polen, para cada rameto y clon, así como para el periodo de dispersión del polen en los árboles muestreados en los rodales naturales vecinos, en cada ciclo reproductivo (2014 y 2015) con el programa SAS SYNCHRO (Zas *et al.*, 2003). Con estos datos, en cada año de evaluación se calculó el índice de sincronización fenológica promedio (\overline{OP}) entre el periodo de receptividad femenina de cada clon muestreado en el huerto con: a) el periodo de dispersión de polen del mismo clon ($\overline{O}_i\overline{P}_i$); b) el periodo de dispersión de polen de los otros clones del huerto ($\overline{O}_i\overline{P}_j$); y c) el periodo de dispersión de polen de los árboles en los rodales naturales vecinos ($\overline{O}_i\overline{P}_{RN}$). Estos índices se calcularon de acuerdo al procedimiento propuesto por Askew y Blush (1990), el cual es una medida cuantitativa que permite conocer la proporción simétrica de los fenogramas masculinos y femeninos generados por el programa SYNCHRO, estimados por la relación de la zona común de la superficie máxima entre los fenogramas, sumados a lo largo del periodo de evaluación para todas las posibles parejas que funcionan como progenitores femeninos y masculinos en cada caso.

Los índices de sincronización se calcularon para cada clon por separado y se agruparon, de acuerdo a su nivel de precocidad (definido con base en la fecha de inicio del periodo de receptividad femenina), en clones precoces, intermedios y tardíos. Para determinar si existen diferencias en los índices de sincronización ($\overline{O}_i\overline{P}_i$, $\overline{O}_i\overline{P}_j$ y $\overline{O}_i\overline{P}_{RN}$) entre clones con diferente grado de precocidad, se utilizó la prueba de comparación de medias “t” de Student, de los valores

promedio de estos índices en los grupos de clones “precoces” vs. “tardío”, considerando a los índices de los clones dentro de cada grupo como los valores de la muestra respectiva.

Para determinar el grado de estabilidad entre años de los índices de sincronización fenológica de los clones en el huerto ($\bar{O}_i\bar{P}_i$, $\bar{O}_i\bar{P}_j$ y $\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$), se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r_p) entre los respectivos valores de estos índices obtenidos para cada clon en los dos ciclos reproductivos (2014 y 2015) evaluados.

La variación genética y entre años en la capacidad productiva de conos femeninos de los clones del huerto durante los años de evaluación se estimó a partir del análisis de varianza del número de conos recolectados en cada año (2014, 2015 y 2016), con el procedimiento Mixed del programa de análisis estadístico SAS (SAS Institute, 2002), utilizando el siguiente modelo lineal:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + A_j + CA_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

dónde: Y_{ijk} es la observación del k -ésimo rameto del i -ésimo clon en el j -ésimo año, μ es la media, C_i es el efecto aleatorio del i -ésimo clon [$(i = 1, 2, \dots, 31) \sim \text{NID}(0, \sigma_c^2)$], A_j es el efecto aleatorio del j -ésimo año de evaluación [$(j = 1, 2, 3) \sim \text{NID}(0, \sigma_a^2)$], CA_{ij} es el efecto aleatorio de la interacción entre clones y años $\sim \text{NID}(0, \sigma_{ca}^2)$ y ϵ_{ijk} es el error $\sim \text{NID}(0, \sigma_e^2)$. Previo al análisis, los datos originales de número de conos (x) se transformaron con la función \sqrt{x} para homogeneizar la varianza entre años y entre clones (Steel y Torrie, 1980). La heredabilidad en sentido amplio (H^2_c) se calculó con la siguiente fórmula (Falconer, 1989):

$$H_c^2 = \frac{\sigma_c^2}{\sigma_c^2 + \left(\frac{\sigma_{ac}^2}{a}\right) + \left(\frac{\sigma_e^2}{ra}\right)}$$

dónde: σ_c^2 es la varianza entre clones; σ_{ac}^2 es la varianza debida a la interacción de años por clones; σ_e^2 es la varianza debido al error; a es el número de años y r es el número de rametos por clon. Para evaluar el grado de estabilidad genética en la contribución de los clones a la producción total de conos femeninos entre ciclos reproductivos (años), se calculó la correlación genética tipo B (r_B) con el procedimiento descrito por Falconer (1989). Para ello se utilizó la siguiente ecuación:

$$r_B = (\sigma_c^2) / (\sigma_c^2 + \sigma_{ac}^2)$$

También se estimó el coeficiente de correlación de Spearman de la producción promedio de conos por clon entre los diferentes años de evaluación. Para evaluar la relación entre la capacidad productiva de conos femeninos en los clones y el riesgo de contaminación genética por polen externo, se estimó la correlación fenotípica (r_p) entre el número promedio de conos producido por año en cada clon del huerto con el valor de sincronización del periodo de receptividad de los óvulos del clon con el periodo de dispersión de polen en los rodales naturales ($\bar{O}_i \bar{P}_{RN}$), y con la fecha de inicio y duración del periodo de receptividad femenina del clon en los diferentes ciclos reproductivos evaluados en el huerto semillero.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Variación clonal en la sincronización fenológica

El índice de sincronización de la receptividad femenina de los clones con respecto al periodo de liberación del polen del mismo clon ($\bar{O}_i\bar{P}_i$) varió de 0.39 a 0.78 en el 2014 y de 0.21 a 0.75 en 2015 (Cuadro 3.1); el valor promedio de $\bar{O}_i\bar{P}_i$ mostró diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre años (0.60 vs. 0.52). De los 31 clones evaluados, 58 % en 2014 y 23 % en 2015 tuvieron valores de $\bar{O}_i\bar{P}_i$ superiores a 0.6, lo que representa riesgos altos de autofecundación en ellos. Además, no se encontraron diferencias significativas en $\bar{O}_i\bar{P}_i$ entre grupos de clones clasificados como precoces, intermedios y tardíos en cada ciclo reproductivo. Es decir, el valor de $\bar{O}_i\bar{P}_i$ no está relacionado con la precocidad de los eventos fenológicos en los clones.

El valor del índice de sincronización de la receptividad de los clones con respecto al periodo de liberación de polen de los otros clones en el huerto ($\bar{O}_i\bar{P}_j$) varió de 0.42 a 0.71 en 2014, y de 0.26 a 0.59 en 2015, sin diferencias significativas entre años en los valores promedio globales (0.54 vs. 0.50, Cuadro 3.1), ni entre grupos de clones precoces y tardíos, a excepción de los grupos de clones tardíos e intermedios ($P \leq 0.05$) en el 2015. Por otro lado, el valor promedio de la sincronización femenina de clones del huerto con la liberación del polen de los rodales naturales ($\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$) varió de 0.35 a 0.64 en 2014, y de 0.25 a 0.66 en 2015 sin diferencias significativas entre años en los valores promedio globales (Cuadro 3.1) ni entre grupos de clones precoces y tardíos. Los clones tardíos presentaron un mayor traslape con la liberación de polen externo que los clones precoces en 2014, mientras que en 2015 el traslape de los dos grupos de clones fue más parecido entre ellos (Figura 3.1).

Cuadro 3.1. Índice de sincronización fenológica (\bar{OP}) promedio entre la receptividad femenina de los clones del huerto con respecto al polen del mismo clon ($\bar{O}_i\bar{P}_i$), de los otros clones ($\bar{O}_i\bar{P}_j$) y de los rodales naturales ($\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$), en dos años de evaluación. Los clones están ordenados de acuerdo a su nivel de precocidad en el periodo de receptividad femenina en cada año.

2014				2015			
Cloni	$\bar{O}_i\bar{P}_i$	$\bar{O}_i\bar{P}_j^{\$}$	$\bar{O}_i\bar{P}_{RN}^{\$}$	Cloni	$\bar{O}_i\bar{P}_i$	$\bar{O}_i\bar{P}_j^{\$}$	$\bar{O}_i\bar{P}_{RN}^{\$}$
a) Precoces:							
ID033	0.60	0.54±0.21	0.54±0.23	ID019	0.46	0.58±0.28	0.56±0.06
ID050	0.63	0.43±0.26	0.41±0.23	ID021	0.32	0.48±0.17	0.40±0.11
ID054	0.63	0.49±0.25	0.39±0.22	ID042	0.65	0.54±0.22	0.66±0.14
ID060	0.64	0.58±0.24	0.51±0.25	ID051	0.49	0.47±0.18	0.46±0.06
ID110	0.54	0.50±0.24	0.42±0.22	ID054	0.56	0.47±0.29	0.61±0.05
ID111	0.56	0.49±0.26	0.38±0.21	ID114	0.28	0.43±0.25	0.55±0.07
ID114	0.48	0.42±0.23	0.35±0.20	ID118	0.58	0.48±0.20	0.59±0.10
ID118	0.51	0.49±0.27	0.37±0.20				
b) Intermedios:							
ID018	0.74	0.66±0.21	0.53±0.06	ID012	0.53	0.55±0.22	0.53±0.16
ID019	0.69	0.43±0.13	0.47±0.12	ID020	0.51	0.51±0.19	0.55±0.12
ID020	0.46	0.55±0.20	0.48±0.18	ID036	--	--	--
ID022	0.64	0.62±0.21	0.56±0.18	ID045	0.73	0.59±0.25	0.53±0.14
ID040	0.63	0.45±0.15	0.52±0.11	ID060	0.21	0.26±0.16	0.25±0.04
ID045	0.63	0.55±0.27	0.44±0.23	ID062	0.69	0.54±0.19	0.53±0.15
ID051	0.66	0.63±0.23	0.56±0.21	ID064	0.56	0.56±0.18	0.53±0.11
ID062	0.67	0.60±0.23	0.55±0.23	ID079	0.44	0.41±0.13	0.40±0.06
ID063	0.68	0.71±0.20	0.59±0.11	ID111	0.35	0.46±0.17	0.44±0.07
ID064	0.58	0.49±0.26	0.47±0.23	ID112	0.56	0.51±0.24	0.59±0.08
ID076	0.54	0.44±0.19	0.49±0.19	ID116	0.68	0.52±0.22	0.50±0.14
ID087	0.39	0.42±0.18	0.46±0.18				
ID112	0.66	0.56±0.25	0.44±0.22				
ID116	0.61	0.53±0.25	0.41±0.20				
c) Tardíos							
ID012	0.55	0.59±0.15	0.55±0.13	ID018	0.29	0.47±0.29	0.37±0.12
ID021	0.49	0.44±0.31	0.42±0.22	ID022	0.70	0.55±0.26	0.41±0.13
ID032	0.75	0.68±0.21	0.53±0.03	ID032	0.44	0.48±0.21	0.42±0.11
ID036	0.56	0.52±0.22	0.55±0.07	ID033	0.55	0.53±0.22	0.41±0.06

ID042	0.66	0.56±0.22	0.48±0.21	ID040	0.53	0.52±0.26	0.42±0.13
ID058	0.65	0.64±0.15	0.64±0.13	ID050	0.63	0.48±0.17	0.56±0.11
ID079	0.59	0.59±0.20	0.54±0.22	ID058	0.44	0.42±0.17	0.36±0.10
ID086	0.51	0.53±0.16	0.59±0.12	ID063	0.57	0.52±0.25	0.34±0.11
ID117	0.78	0.59±0.14	0.62±0.11	ID076	0.55	0.46±0.22	0.64±0.07
				ID086	0.43	0.56±0.21	0.56±0.15
				ID087	0.55	0.46±0.16	0.45±0.08
				ID110	0.75	0.57±0.25	0.50±0.12
				ID117	0.49	0.51±0.17	0.39±0.05
\overline{OP} global	0.60	0.54	0.49		0.52	0.50	0.48

§Se incluyen los valores promedio $\overline{OP} \pm$ la desviación estándar.

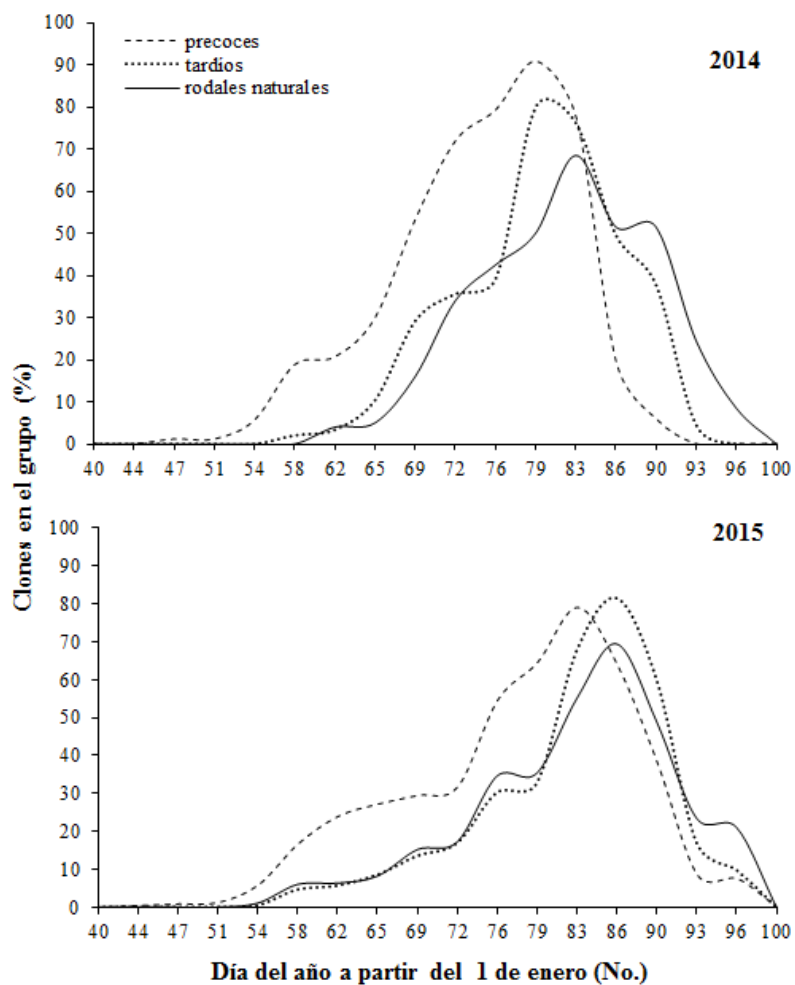


Figura 3.1. Variación estacional en las curvas de los periodos de receptividad femenina en los grupos de clones precoces y tardíos en relación con la curva de liberación de polen en los rodales naturales.

Los valores de $\bar{O}_i\bar{P}_j$ fueron ligeramente mayores que los de $\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$ en la mayoría de los clones los dos años de evaluación (Cuadro 3.1). Sin embargo, con excepción del grupo de clones tardíos en el año 2015, en ninguno de los grupos de clones las diferencias entre los valores promedio de $\bar{O}_i\bar{P}_j$ y $\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$ fueron significativas (Cuadro 3.2).

Cuadro 3.2. Comparación del valor promedio de sincronización del periodo de receptividad femenina de los clones con diferente grado de precocidad con el polen de otros clones en el huerto ($\bar{O}_i\bar{P}_j$), y con el polen de los rodales naturales ($\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$) en dos años de evaluación.

Año	Grupo de Clones	N	Sincronización fenológica (\bar{OP})		Pr > F
			$\bar{O}_i\bar{P}_j$	$\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$	
2014	Precoces	8	0.49	0.42	0.50
	Intermedios	14	0.55	0.50	0.07
	Tardíos	9	0.57	0.55	0.92
2015	Precoces	7	0.49	0.55	0.18
	Intermedios	10	0.49	0.49	0.93
	Tardíos	13	0.50	0.45	0.02

El coeficiente de correlación entre años de los valores de sincronización de la receptividad femenina de los clones con respecto al polen del mismo clon ($\bar{O}_i\bar{P}_i$) y con respecto al polen de otros clones ($\bar{O}_i\bar{P}_j$) fue cercano a cero ($|r| \leq 0.05$, $P \geq 0.79$), lo que indica que la posibilidad de autofecundación y de polinización cruzada de cada clon no se mantiene estable de un año a otro. En cambio, la correlación entre años de los valores de $\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$ de cada clon fue -0.48 ($P \leq 0.01$), lo cual implica que los clones que tuvieron mayor sincronización en el 2014, su sincronización fue menor en el 2015 y viceversa, debido tanto a los cambios en el periodo de receptividad de

los óvulos en los clones del huerto como en el periodo de dispersión del polen en los rodales vecinos de un año a otro.

3.3.2 Variación en la capacidad productiva de los clones del huerto semillero de *Pinus patula*

El análisis de varianza mostró que existen diferencias altamente significativas ($P \leq 0.001$) entre años en la producción de conos, pero también se encontraron efectos significativos de los clones y de la interacción clones \times años sobre la variación en la capacidad de producción de conos en el huerto (Cuadro 3.3).

Cuadro 3.3. Significancia estadística de los factores año, clon y de la interacción entre ambos sobre la capacidad productiva de conos femeninos en clones del huerto semillero de *Pinus patula*.

Factor	Grados de libertad	Valor de F	P > F
Año	2	54.99	<0.001
Clon	30	8.10	<0.001
Año \times Clon	60	1.59	0.010

La producción de conos femeninos en el huerto semillero mostró una amplia variación en los tres años de evaluación, desde cero hasta 197.7 conos en promedio por árbol. La producción promedio por árbol varió de 6.3 conos en 2015 a 43.5 conos en 2016. En términos absolutos, las diferencias entre clones fueron mayores en 2014 y 2016, pero el coeficiente de variación fue mayor en 2015, debido a la baja producción de conos en ese año (Cuadro 3.4).

Cuadro 3.4. Valores promedio, mínimo y máximo por clon, e indicadores de variación (desviación estándar y coeficiente de variación) del número de conos femeninos en clones del huerto semillero de *Pinus patula* por año de evaluación.

Año	N	Media	Mínimo	Máximo	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
2014	31	30.2	1	109.7	35.22	116.50
2015	31	6.3	0	35.5	12.04	191.14
2016	31	43.5	0	197.7	57.67	132.42

La capacidad productiva de los clones del huerto varió ampliamente; de manera consistente los clones menos productivos fueron el 32, 33 y 36 en los tres años de evaluación, sin embargo, en el 2015 fueron más los clones que no produjeron ningún cono (12, 21, 51, 60, 86 y 112). Mientras que los clones más productivos fueron el 19, 20, 22, 42, 45, 50, 54, 62, 64, 114, 116 y 118. Estos 12 clones en conjunto aportaron 70 %, 74 % y 80 % de la producción total de conos femeninos en 2014, 2015 y 2016, respectivamente, pero en diferente orden (Figura 3.2). Además, en 2014 los clones 51, 87, 111 y 117; y en 2015 los clones 76 y 118 también tuvieron un aporte importante a la producción de conos de los 31 clones muestreados. A pesar de las fluctuaciones en el ordenamiento de los clones en cuanto a la producción de conos de un año a otro, indicada por el efecto significativo de la interacción clon \times año, el coeficiente de correlación de Spearman entre los años de producción 2014 y 2016 fue de 0.74 ($P \leq 0.0001$), y entre los ciclos 2014-2015 y 2015-2016 fue de 0.60 ($P \leq 0.001$).

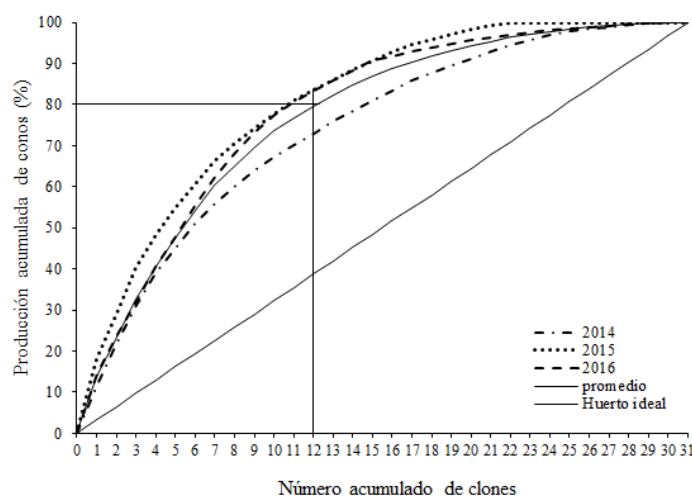


Figura 3.2. Curva de contribución acumulada de la producción de conos femeninos de los clones del huerto semillero de *Pinus patula* en tres años de evaluación.

El análisis de los componentes de varianza mostró que hubo una amplia variación genética en la capacidad de producción de conos de los clones muestreados en el huerto, tanto en el análisis conjunto como entre pares de años (Cuadro 3.5). La variación debida a la interacción año \times clon fue relativamente baja ($< 27\%$) respecto a la variación genética, excepto en el análisis de los años 2015-2016, cuando su contribución a la varianza total fue casi igual a la varianza genética. Por lo anterior, se encontró un elevado control genético en la capacidad de producción de conos, con una heredabilidad global en sentido amplio de las medias de clones (repetibilidad clonal) de 0.80, aunque los valores estimados fluctuaron de 0.57 a 0.85 en los análisis realizados para diferentes pares de años. El análisis de correlación para la producción de estróbilos femeninos indica que las correlaciones fenotípicas de las medias de clones (r_p) entre años fueron positivas y relativamente elevadas ($r_p \geq 0.57$), mientras que la correlación genotípica tipo B (r_{gb}) fue 0.79 en el análisis global, con valores de 0.52 a 0.97 entre los diferentes pares de años (Cuadro 3.5). Lo anterior indica que los clones son relativamente estables en su capacidad productiva de conos en diferentes ciclos de cosecha.

Cuadro 3.5. Componentes de varianza, relación σ^2_{ac}/σ^2_c , heredabilidad en sentido amplio de las medias de clones (H^2_c) y correlaciones genéticas tipo B (r_B) para la capacidad productiva de conos femeninos en el huerto semillero de *Pinus patula* en tres años de evaluación.

Parámetro	Capacidad productiva de conos femeninos			
	Análisis conjunto	2014-2015	2014-2016	2015-2016
σ^2_c	4.29	2.25	7.53	3.11
σ^2_{ac}	1.17	0.47	0.20	2.85
σ^2_e	5.94	4.94	7.31	5.56
σ^2_{ac}/σ^2_c	0.27	0.21	0.03	0.92
H^2_c	0.80	0.68	0.85	0.57
r_B	0.79	0.83	0.97	0.52
r_p		0.61*	0.73*	0.57*

*Diferencias significativas con $P < 0.001$. σ^2_c : varianza entre clones; σ^2_{ac} : varianza debida a la interacción de años por clones; σ^2_e : varianza debido al error; H^2_c : heredabilidad en sentido

amplio de las medias de clones; r_B : correlaciones genéticas tipo B; r_p correlaciones fenotípicas de las medias de clones

3.3.3 Relación de la capacidad productiva de los clones con la precocidad y el riesgo de contaminación genética

El coeficiente de correlación fenotípica entre la capacidad productiva de conos en los clones del huerto con la fecha de inicio y la duración del periodo de receptividad femenina presentó en general valores bajos y no significativos en los diferentes ciclos reproductivos evaluados (Cuadro 3.6), excepto en el caso de la fecha de inicio del periodo de receptividad en 2014 y en promedio de los tres años, con un valor moderado y significativo ($r_p \leq -0.39$). El signo negativo de esta correlación indica que los clones más productivos tienden a ser los más precoces en cuanto al inicio de la receptividad femenina y, por lo tanto, se esperaría que tuvieran menor riesgo de contaminación genética por el menor traslape con el periodo de dispersión de polen en los rodales naturales. Las correlaciones negativas [$r_p = -0.37$ y -0.40 ($P < 0.05$)] de la capacidad de producción de conos de las cosechas 2014 y 2016 con el valor de $\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$ en 2014, muestra que los clones más productivos tienen menor grado de sincronización con el polen externo de los rodales naturales, lo anterior es favorable porque implica menor riesgo de contaminación genética en esas cosechas. Sin embargo, el signo de la correlación puede cambiar de un año a otro, ya que la producción de conos en la cosecha 2016 también tuvo una correlación positiva [$r_p = 0.44$, ($P < 0.05$)] con el valor de $\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$ 2015. En el promedio de los tres ciclos evaluados, no se encontró una correlación significativa entre la capacidad de producción de conos de los clones y el valor promedio de $\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$ (Cuadro 3.6).

Cuadro 3.6. Correlación fenotípica (r_p) entre la capacidad productiva de conos femeninos de los clones del huerto con el valor de $\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$, y la fecha de inicio y duración del periodo de receptividad femenina del clon en los diferentes ciclos reproductivos evaluados en el huerto semillero.

Año de producción		Correlación fenotípica (r_p)		
Conos	polen en rodales naturales	$\bar{O}_i \bar{P}_{RN}$	Inicio receptividad	Duración receptividad
2014	2014	-0.37*	-0.40*	0.09
2015	2014	-0.28	-0.17	0.02
	2015	0.28	0.02	-0.03
2016	2014	-0.40*	-0.29	-0.11
	2015	0.44*	-0.27	0.25
r_p promedio		0.13	-0.39*	0.21

*Diferencias significativas con $P < 0.05$

3.4 DISCUSIÓN

3.4.1 Variación clonal en la sincronización fenológica

La sincronización entre la receptividad de los óvulos y la dispersión de polen es uno de los factores de mayor importancia en huertos semilleros, ya que influye sobre las posibilidades de autofecundación, polinización cruzada y contaminación genética, en función del origen del polen, lo cual afecta la eficiencia genética del huerto y el equilibrio panmítico (Reynolds y El-Kassaby, 1990). A pesar de que se encontraron valores promedio similares en el grado de sincronización de la receptividad femenina con el polen del mismo clon ($\bar{O}_i\bar{P}_i$) y con el polen de los otros clones ($\bar{O}_i\bar{P}_j$), hubo una amplia variación entre los clones en estos valores de sincronización fenológica, lo cual indica que las posibilidades de autofecundación y de polinización cruzada varían entre ellos. Sin embargo, estas posibilidades no están relacionadas con la precocidad en el periodo de receptividad de los clones ni son consistentes en diferentes ciclos reproductivos, por lo que al parecer dependen más bien de las circunstancias ambientales y de la variación fenológica de los clones de un año a otro. En otras especies de coníferas también existe una amplia variación en los valores de sincronización fenológica de la receptividad femenina con polen de otros clones, como en el caso de *Pinus sylvestris* (Burczyk y Chalupka, 1997), *Pinus radiata* (Zas *et al.*, 2003; Codesido y Fernández-López, 2008) y *Pinus tabuliformis* (Li *et al.*, 2012). Aunque en estas especies el valor promedio de $\bar{O}_i\bar{P}_j$ en el huerto es similar (entre 0.29 y 0.48), los valores individuales de los clones variaron desde 0.01 hasta 0.98. Sin embargo, a diferencia de lo ocurrido en *Pinus patula*, en estos casos los valores de sincronización fenológica fueron relativamente consistentes de un año a otro.

A pesar de que una proporción importante de los clones muestreados (más de 50 % en el ciclo 2014) presentó un valor elevado de $\bar{O}_i\bar{P}_i$ (mayor de 0.6), la probabilidad global de autofecundación en este huerto es relativamente baja, incluso en esos clones, por varias razones. En primer lugar, dado el alto número de clones que existen en el huerto, la cantidad de parejas distintas que pueden aportar polen a los óvulos de cada clon es al menos 30 veces mayor (considerando sólo el número de clones muestreados) que la del propio clon. Además, los rametos del mismo clon están distribuidos en el huerto en un diseño espacial que reduce la posibilidad de intercambio entre ellos. Suponiendo una producción similar de polen entre los

clones y todos los demás factores constantes, la probabilidad de autofecundación sería menor de 5 % en todos los clones. En este sentido, el nivel de autofecundación no parece ser un problema importante en el huerto a pesar de los valores moderados y altos del índice de sincronización entre óvulos y polen del mismo clon. En huertos de *Pinus tabuliformis* se han reportado valores mayores de $\bar{O}_i\bar{P}_i$, en donde 80 % de los clones tuvieron valores altos de sincronización consigo mismos, que variaron de 0.60 a 0.90 (Li *et al.*, 2012).

Por otro lado, a pesar de que los valores promedio de $\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$ fueron similares de un año a otro, la amplia variación entre clones en este valor indica que el riesgo de contaminación genética varía entre ellos, de manera similar se ha encontrado en *Pseudotsuga menziesii* en donde se determinó que aquellos clones con floración temprana y tardía tuvieron mayor nivel de contaminación con el polen de los rodales naturales (El-Kassaby y Ritland, 1986a). El mayor traslape fenológico del grupo de clones tardíos en 2014 (Figura 3.1) y la variación en los valores de $\bar{O}_i\bar{P}_j$ y $\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$ en cada grupo de clones indica que este riesgo está asociado a la precocidad fenológica de los clones, así como a la variación anual en el periodo de dispersión del polen en los rodales vecinos, que depende de las condiciones ambientales (Capítulo I). A pesar de no encontrar diferencias en la sincronización fenológica entre grupos de clones clasificados por su precocidad, en otras especies se ha demostrado que los clones tempranos en su fenología de floración, tienen periodos de receptividad y de dispersión de polen más extensos (Fashler y El-Kassaby, 1987; Codesido *et al.*, 2005). De la misma manera, en el Capítulo II se mostró que la fecha de inicio de la receptividad femenina tuvo una correlación negativa elevada con la duración del periodo respectivo ($r_p \leq -0.85$), indicando que los clones que inician más temprano tiene una mayor duración del periodo de receptividad femenina. Por el contrario, los clones intermedios o tardíos, aunque tienen un periodo de receptividad más corto, tienen un índice de sincronización más homogéneo con la producción de polen de los otros clones, lo cual promueve el cruzamiento entre todos los pares de clones presentes en el huerto (Erickson y Adams, 1990).

A nivel global del huerto, el riesgo de contaminación es mayor que el de autofecundación, por la cantidad de árboles que producen polen en el vecindario del huerto, aunque depende en gran medida de la cantidad total de polen producido y del grado de traslape con el periodo de receptividad de los óvulos. En el Capítulo I se determinó que la producción de polen en el huerto es mayor que en los rodales naturales, con un periodo más amplio de dispersión, y los datos de

$\bar{O}_i\bar{P}_j$ y $\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$ muestran que a nivel global la sincronización del polen del huerto es ligeramente mayor, lo cual en conjunto puede reducir de manera importante las posibilidades de contaminación genética.

Por otro lado, la baja sincronización reproductiva entre algunos clones del huerto puede crear escenarios en los cuales algunos progenitores están más expuestos a la contaminación por polen externo, o estar menos representados en la progenie del huerto, como en el caso de las parejas de clones con valores de $\bar{O}_i\bar{P}_j$ menores de 0.5. Por lo tanto, es posible que los clones del huerto estén agrupados en pequeñas poblaciones de cruzamiento debido a la amplia variación en el grado de sincronización fenológica entre ellos, de manera similar a como se ha encontrado en huertos semilleros de *Pseudotsuga menziesii* (El-Kassaby y Ritland, 1986a; Kess y El-Kassaby, 2015). Esta situación, lógicamente, tiene implicaciones negativas en la eficiencia genética del huerto, ya que reduce el tamaño efectivo de población y la diversidad genética de la progenie, con respecto al escenario ideal de panmixia. Sin embargo, este efecto negativo se reduce por el propio diseño del huerto, dado que un rameto no siempre está rodeado por el mismo vecindario de clones.

3.4.2 Variación anual en la sincronización fenológica

La nula correlación entre años de los valores de $\bar{O}_i\bar{P}_i$ y $\bar{O}_i\bar{P}_j$ indica que las posibilidades de autofecundación y de polinización cruzada de cada uno de los clones cambian de un año a otro; posiblemente debido a cambios en la dinámica de dispersión del polen propio y de los otros clones en el huerto, en relación con la duración del periodo de receptividad de los óvulos en cada uno de ellos. Estos resultados difieren de la estabilidad de los índices de sincronización entre clones de *Pinus tabuliformis* (Li *et al.*, 2012) y *Pinus sylvestris* (Burczyk y Chalupka, 1997), mientras que en *Pinus radiata* los índices de sincronización mejoran cada año (Codesido y Fernández-López, 2008).

En el Capítulo II se mostró que la fenología de dispersión de polen presentó un control genético más elevado que la fenología del periodo de receptividad femenina, especialmente en lo que se refiere a la fecha de inicio y duración del periodo de dispersión del polen. Además, las características del periodo de dispersión del polen tuvieron una interacción clon \times año más baja, y una correlación genética tipo-B (r_B) más alta, que las características del periodo de

receptividad del óvulo (Capítulo II). En este sentido, los resultados indican que los cambios en la fenología del periodo de receptividad de los óvulos de un año a otro, debido a su mayor dependencia de las condiciones ambientales (menor control genético), fue el principal factor que afectó la inestabilidad de los valores promedio de $\bar{O}_i\bar{P}_i$ y $\bar{O}_i\bar{P}_j$ de los clones de un año a otro.

En cambio, la correlación negativa entre años en los valores de $\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$ de los clones parece deberse tanto a la inestabilidad del periodo de receptividad de los óvulos como a la variación anual en el periodo de dispersión del polen en los rodales naturales. De acuerdo con los resultados de los capítulos I y II, en los dos años de evaluación el periodo de dispersión de polen en el huerto inició al menos una semana antes que en los rodales naturales, y los estróbilos femeninos de clones tempranos llegan a estar receptivos antes de que comience la dispersión de polen en los rodales naturales. Además, como se mencionó anteriormente, el periodo de receptividad de los óvulos presentó un bajo control genético, con una elevada interacción genotipo \times ambiente en los dos años de evaluación (Capítulo II). De cualquier manera, la correlación entre los valores anuales de $\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$ no es elevada ($r=-0.48$), lo cual indica, para fines prácticos, que el riesgo de contaminación genética de los clones cambia de un año a otro y que es difícil de anticipar con base en los valores previos del índice de sincronización fenológica.

3.4.3 Variación clonal en la producción de conos y su relación con la precocidad

La amplia variación encontrada en el número de conos femeninos producidos por clon en cada año de evaluación indica que éstos no contribuyen de manera equitativa a la cosecha de semillas, como se requiere en un huerto semillero ideal (Matziris, 1997). A pesar de que la producción de conos en el huerto varió de un año a otro, como ocurre de manera natural en huertos semilleros de otras especies de coníferas como *Pseudotsuga menziesii* (El-Kassaby *et al.*, 1989b), *Pinus nigra* (Matziris, 1993), y *Pinus halepensis* (Matziris, 1997), la varianza debida a la interacción año \times clon fue más baja que la varianza genética atribuida a los clones (Cuadro 3.5), lo que indica que esta característica de fecundidad tiene un control genético elevado y es relativamente estable entre ciclos de cosecha.

Dicha variación genética podría explicarse por varios factores, asociados a la tasa relativa de crecimiento de los clones, que genera diferencias en el tamaño de la copa de los árboles, a diferencias en la sincronización de los ritmos de floración de los clones con las condiciones

ambientales del sitio (Huwei *et al.*, 2014), o a diferencias intrínsecas en la fecundidad de los genotipos. Diferencias entre clones en la producción de estróbilos femeninos de *Pinus contorta* (Ying *et al.*, 1985) y *Pinus thunbergii* (Kang *et al.*, 2004) indicaron que solo algunos clones son muy prolíficos, pero éstos tienen mayor participación en la producción de semillas especialmente en los años de baja floración, ya que las diferencias en la producción de estróbilos son menos pronunciadas en años semilleros (O'Reilly *et al.*, 1982). En huertos semilleros de *Pseudotsuga menziesii* también se encontró una amplia variación entre clones en la producción de conos (El-Kassaby *et al.*, 1989b), con un fuerte control genético (El-Kassaby y Cook, 1994). Los valores estimados de heredabilidad en sentido amplio en la producción de conos son similares a los que se han encontrado en clones de *Pinus nigra* de 11 años, que oscilaron de 0.61 a 0.71 (Matziris, 1993), pero son superiores a los encontrados en clones de *Pseudotsuga menziesii* (El-Kassaby y Cook, 1994) y *Pinus halepensis* (Matziris, 1997), en donde los valores de H^2_c fueron menores de 0.48. Sin embargo, en clones de *Pinus radiata* se ha encontrado un control genético más elevado, con un valor de $H^2_c = 0.91$ en dos años de evaluación (Codesido y Fernández-López, 2014).

Los ligeros cambios en la heredabilidad estimada de un año a otro reflejan el efecto de los cambios en la producción de conos entre años asociada a la variación entre rametos dentro de clones por la variación en las condiciones ambientales (Matziris, 1993). Sin embargo, se espera que dicha variación disminuya y se estabilice con el incremento en edad de los árboles del huerto, como ocurrió en huertos de *Pinus pinaster* de seis años de edad, en donde la heredabilidad aumentó con el paso de los años de 0.76 a 0.82 (Merlo y Fernández-López, 2004). Los altos valores de heredabilidad estimados sugieren que las observaciones realizadas en el huerto semillero proveen una herramienta útil para una mejor selección de los clones que se establecerán en huertos de segunda generación, al combinar la información de la fecundidad con la de productividad y calidad de la madera.

Por otro lado, el desbalance en la contribución de los clones a la cosecha de conos femeninos reduce el tamaño efectivo de población en el huerto y la diversidad genética de la progenie (Reynolds y El-Kassaby, 1990; Chaisurisi y El-Kassaby, 1993). En el caso de *Pinus patula*, el nivel de participación clonal fue relativamente bajo, ya que 20 % de los clones evaluados produjeron 50 % de los conos femeninos cosechados, y 39 % de los clones produjeron

entre 70 y 80 % del total de conos femeninos de manera consistente en los tres años de evaluación (Figura 3.1). Sin embargo, estos datos son similares a la contribución clonal que se ha encontrado en huertos semilleros de otras especies con edades menores de 20 años, como el caso de *Pinus sylvestris* (Jonsson *et al.*, 1976; Burczyk y Chalupka, 1997) y *P. pinaster* (Merlo y Fernández-López, 2004), en donde entre 25 y 35 % de los clones contribuyeron con 50 a 65 % de la producción de conos en el huerto.

Las correlaciones fenotípicas negativas entre la capacidad productiva de los clones 2016 con el valor de $\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$, y con el inicio y duración del periodo de receptividad femenina en 2014 (Cuadro 3.6), indican que los clones más productivos tienen menor índice de sincronización con el polen de los rodales naturales y tienden a ser los clones más tempranos en cuanto al inicio de la receptividad femenina. Esta es una situación favorable ya que indica que los clones con mayor potencial de aportación de semilla a la cosecha presentan menor riesgo de contaminación genética por el menor traslape con el periodo de liberación del polen en los rodales naturales. Sin embargo, el cambio en las correlaciones de un año a otro indica que esta situación no es consistente, y puede haber años en que los clones más productivos también se expongan a riesgos altos de contaminación genética, lo cual afectaría la calidad del germoplasma. Al respecto, en *Pinus contorta* clones procedentes de menor latitud produjeron un mayor número de conos femeninos que los de más al norte (Ying *et al.*, 1985).

3.4.4 Implicaciones para la producción de semillas

La composición genética de las semillas cosechadas en un huerto semillero es importante. Las principales metas del manejo de huertos semilleros incluyen maximizar la ganancia genética, evitar la depresión endogámica e incrementar la diversidad genética del lote de semillas. Estas metas pueden verse afectadas por factores como la autofecundación, la contaminación por polen externo, la sincronización en la fenología reproductiva de los clones en el huerto, y las diferencias en fertilidad femenina y masculina (Zobel y Talbert, 1988; Matziris, 1993; Kang, 2001), entre otros. Evitar o reducir las posibilidades de autopolinización y lograr un mayor nivel de sincronización fenológica entre clones dentro del huerto ayudará a incrementar la tasa de cruzamiento y disminuir la endogamia y los riesgos de contaminación por polen externo.

En nuestro caso, la amplia variación clonal en los valores de $\bar{O}_i\bar{P}_i$ y $\bar{O}_i\bar{P}_j$ asociada a la amplia variación genética en la fenología reproductiva de los clones advierten de posibles grupos de cruzamiento dentro del huerto, con algunos clones más propensos a la autofecundación, como se ha encontrado en *Pseudotsuga menziesii* (Kess y El-Kassaby, 2015). Por otra parte, la falta de aislamiento fenológico del huerto y la amplia variación clonal en valores de $\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$ también advierten de un riesgo potencial de contaminación genética del huerto, particularmente en los clones tardíos en su periodo de receptividad femenina. Estos dos factores tienen implicaciones negativas en la calidad genética esperada de la semilla producida en el huerto. Sin embargo, debido al elevado número de clones incluido en el huerto, se espera que la proporción global de autofecundación con respecto al cruzamiento entre clones sea baja. Además, la fecundidad (producción de conos femeninos) de los clones presentó una correlación negativa moderada con el índice de sincronización $\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$, lo que reduce el impacto potencial negativo de la contaminación genética en la calidad genética de la semilla cosechada.

En situaciones similares, diversos autores recomiendan realizar algunas prácticas de manejo en el huerto, entre las que se incluyen el uso de técnicas para inducir, aumentar y homogeneizar la floración entre los clones (Ericksson, 1996; Chalupka, 2008), para aumentar y homogeneizar la sincronización de la fenología reproductiva dentro del huerto (Griffin, 1984; Ross *et al.*, 1985), para aumentar el grado de aislamiento fenológico del huerto con la dispersión de polen externo (El-Kassaby y Ritland, 1986b), y para aumentar la competencia y éxito en la fecundación del polen del huerto (El-Kassaby y Reynolds, 1990), especialmente en los clones con capacidad reproductiva baja y con niveles de sincronización inferiores (Codesido y Merlo, 2007).

3.5 CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que los índices de sincronización de la receptividad femenina con el polen del mismo clon ($\bar{O}_i\bar{P}_i$) y con el polen de los otros clones del huerto ($\bar{O}_i\bar{P}_j$) variaron ampliamente entre clones, lo cual indica que las posibilidades de autofecundación y de polinización cruzada varían entre ellos. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en los índices de sincronización entre grupos de clones clasificados por su precocidad fenológica, a excepción de los grupos de clones tardíos e intermedios en el 2015, ni los índices de los clones fueron consistentes entre ciclos reproductivos. El índice de sincronización de la receptividad femenina de los clones del huerto con el polen de los árboles en rodales naturales ($\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$) también mostró una amplia variación entre clones, lo cual indica que el riesgo de contaminación genética varía entre ellos. El mayor traslape fenológico del grupo de clones tardíos en 2014 y la variación en los valores de $\bar{O}_i\bar{P}_j$ y $\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$ en cada grupo de clones indica que el riesgo de contaminación por polen externo está asociado a la precocidad fenológica de los clones, así como a la variación anual en el periodo de dispersión del polen en los rodales vecinos, que depende de las condiciones ambientales. A nivel del huerto, el riesgo de contaminación fue mayor que el de autofecundación y cambió de un año a otro, por la cantidad de árboles que producen polen en el vecindario del huerto, aunque depende en gran medida de la cantidad total de polen producido y del grado traslape con el periodo de receptividad de los óvulos.

El estudio demostró que la producción de conos es una característica que muestra una amplia variación genética, con un control genético elevado y una baja interacción genotipo por ambiente entre ciclos de cosecha. El fuerte desbalance en la contribución de los clones a la cosecha de conos femeninos afecta negativamente el tamaño efectivo de población, de manera consistente en los tres años de evaluación. A pesar de ello, los clones más prolíficos tienen menor índice de sincronización con el polen externo de los rodales naturales y tienden a ser los clones más tempranos en cuanto al inicio del periodo de receptividad femenina.

CONCLUSIONES GENERALES

Las principales metas del manejo de huertos semilleros incluyen maximizar la ganancia genética, evitar la depresión endogámica e incrementar la diversidad genética del lote de semillas. Estas metas se ven afectadas por factores como la contaminación por polen externo, variaciones en la fenología reproductiva de los clones en el huerto, el nivel de sincronización en la fenología reproductiva, y las diferencias en fertilidad femenina y masculina de los clones, entre otros factores.

Se demostró que la cantidad de polen presente en el huerto semillero de *Pinus patula* es mayor que en los rodales naturales, e inicia antes su dispersión, pero con un periodo de dispersión más amplio, lo que genera un amplio traslape con el periodo de dispersión del polen dentro y fuera del huerto. Esta situación sugiere que existe un riesgo potencial de contaminación genética por polen externo con un nivel diferente en las zonas dentro del huerto y se presentó de manera consistente en los dos años de evaluación.

Además, bajo la hipótesis de que el periodo de dispersión del polen en las poblaciones naturales varía a lo largo del transecto altitudinal y de un año a otro en función de la temperatura y los grados-calor acumulados, el periodo de dispersión no muestra un patrón claro asociado con la elevación de los rodales naturales. Sin embargo, la relación fenológica de la dispersión del polen con los grados-día acumulados en los dos años de evaluación en el huerto y en los rodales naturales sugiere una relación adaptativa en la que la dispersión del polen requiere una cantidad menor de grados-día al aumentar la elevación.

El amplio traslape encontrado en los periodos de dispersión de polen entre las poblaciones estudiadas (huerto semillero y rodales naturales) se confirmó con la determinación de la amplitud y fenología del periodo de receptividad femenina en relación con la fenología de dispersión del polen en una muestra de clones del huerto semillero de *Pinus patula* y en una muestra de árboles adultos en los rodales naturales vecinos. La evaluación fenológica advierte del riesgo potencial que existe en la contaminación genética del huerto, ya que no hay diferencias en los eventos fenológicos de receptividad femenina y liberación de polen en el huerto semillero en los años evaluados.

También se encontró una amplia variación genética entre los clones del huerto y una moderada correlación genotípica y fenotípica entre el inicio del periodo de receptividad y de liberación de polen, lo que indica que los procesos no son independientes y sugiere riesgos de autofecundación. El control genético elevado y la estabilidad genética de los clones en la fenología reproductiva femenina y masculina indican que el riesgo de contaminación genética varía entre clones según su precocidad; los clones con un periodo temprano de receptividad tienen menor grado de exposición al polen externo, reduciendo sus posibilidades de contaminación, con respecto a los clones con un periodo tardío de receptividad. No obstante que los clones con un periodo temprano de receptividad tienen menos riesgo de contaminación por polen externo, también podrían tener problemas mayores de polinización y producción de semilla llena, por la presencia menor de polen en el huerto.

Además se demostró que los valores del índice de sincronización de la receptividad femenina con el polen del mismo clon ($\bar{O}_i\bar{P}_i$) y con el polen de los otros clones del huerto ($\bar{O}_i\bar{P}_j$) variaron ampliamente entre clones. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en los valores promedio del índice de sincronización entre grupos de clones clasificados por su precocidad fenológica, ni los valores individuales del índice fueron consistentes entre ciclos reproductivos. El índice de sincronización de la receptividad femenina de los clones del huerto con el polen de los árboles en rodales naturales ($\bar{O}_i\bar{P}_{RN}$) también mostró una amplia variación entre clones, lo cual indica que el riesgo de contaminación genética varía entre ellos.

A nivel del huerto, el riesgo de contaminación es mayor que el de autofecundación y cambia de un año a otro, por la cantidad de árboles que producen polen en el vecindario del huerto, aunque depende en gran medida de la cantidad total de polen producido y del grado de traslape con el periodo de receptividad de los óvulos. Por otra parte, la amplia variación clonal en los valores de $\bar{O}_i\bar{P}_i$ y $\bar{O}_i\bar{P}_j$ asociada a la amplia variación genética en la fenología reproductiva de los clones, advierten de posibles grupos de cruzamiento dentro del huerto, con algunos clones más propensos a la autofecundación, como se ha encontrado en otras especies de coníferas.

El estudio demostró que la producción de conos es una característica que muestra una amplia variación genética, con un control genético elevado y una baja interacción genotipo por ambiente entre ciclos de cosecha. El fuerte desbalance en la contribución de los clones a la

cosecha de conos femeninos afecta negativamente el tamaño efectivo de población, de manera consistente en los diferentes años de evaluación. A pesar de ello, los clones más prolíficos tienen menor índice de sincronización con el polen externo de los rodales naturales y tienden a ser los clones más tempranos en cuanto al inicio del periodo de receptividad femenina.

LITERATURA CITADA

- Adams, W. T. 1992. Gene dispersal within forest tree populations. *New Forests* 6: 217-240.
- Adams, W. T., and J. Burczyk. 2000. Magnitude and implications of gene flow in gene conservation reserves. *In: Young A., D. Boshier, T. Boyle (eds.). Forest Conservation Genetics: Principles and Practice.* Collingwood, Victoria, Australia. CSIRO Publishing. pp. 215-224.
- Alizoti, P. G., K. Kilimis, and P. Gallios. 2010. Temporal and spatial variation on flowering among *Pinus nigra* Arn. clones under changing climatic conditions. *For. Ecol. Manage.* 259: 786-797.
- Askew, G. R. 1988. Estimation of gamete pool compositions in clonal seed orchards. *Silvae Genet.* 37: 227-232.
- Askew, G. R., and T. D. Blush. 1990. An index of phenological overlap in flowering for clonal conifer seed orchards. Short note. *Silvae Genet.* 39: 168-171.
- Bilir, N., F. Prescher, D. Lindgren, and J. Kroon. 2008. Variation in cone and seed characters in clonal seed orchards of *Pinus sylvestris*. *New Forests* 36: 187-199.
- Blush, T. D., D. L. Bramlett, and Y. A. El-Kassaby. 1993. Reproductive phenology of seed orchards. *In: Bramlett D. L., G. R. Askew, T. D. Blush, F. E. Bridgwater, and J. B. Jett (eds.). Advances in Pollen Management.* Agriculture Handbook 698. USDA, Forest Service. pp. 15-23.
- Boes, T. K., J. R. Brandle, and W. R. Lovett. 1991. Characterization of flowering phenology and seed yield in a *Pinus sylvestris* clonal seed orchard in Nebraska. *Can. J. For. Res.* 21: 1721-1729.
- Burczyk, J., and W. Chalupka. 1997. Flowering and cone production variability and its effect on parental balance in a Scots pine clonal seed orchard. *Ann. For. Sci.* 54: 129-144.
- Caron, G. E., and G. R. Powell. 1989. Patterns of seed-cone and pollen-cone production in young *Picea mariana* trees. *Can. J. For. Res.* 19: 359-364.
- Caron, G. E., and R. Leblanc. 1992. Pollen contamination in a small black spruce seedling seed orchard for 3 consecutive years. *For. Ecol. Manage.* 53: 245-261.

- Castaños-Martínez, L. J., y S. Castro-Zavala. 2014. Manejo forestal: Reserva Forestal Multifuncional “El Manantial” S. C. Conceptos, Conductas y Acciones. Comisión Nacional Forestal. Zapopan, Jalisco, México. 222 p.
- Chaisurisi, K., and Y. A. El-Kassaby. 1993. Estimation of clonal contribution to cone and seed crops in a Sitka spruce seed orchard. *Ann. For. Sci.* 50: 461-467.
- Chalupka, W. 1991. Usefulness of hormonal stimulation in the production of genetically improved seeds. *Silva Fennica.* 25: 235-240.
- Chalupka, W. 2008. Do We Need Flower Stimulation In Seed Orchards?. *In: Lindgren, D. (ed). Proceedings of a Seed Orchards Conference, Umea, Sweden.* pp. 37-42.
- Chmura, D. J., R. Rozkowski, and W. Chalupka. 2012. Growth and phenology variation in progeny of Scots pine seed orchards and commercial seed stands. *Eur. J. For. Res.* 131: 1229-1243.
- Codesido, V., y E. Merlo. 2001. Caracterización fenológica del huerto semillero de *Pinus radiata* de Sergude. III Congreso Forestal Español. Actas del Congreso Tomo III. pp. 69-74.
- Codesido, V., E. Merlo, and J. Fernández-López. 2005. Variation in reproductive phenology in a *Pinus radiata* D. Don seed orchard in northern Spain. *Silvae Genet.* 54: 246-256.
- Codesido, V. y E. Merlo. 2007. Inducción floral mediante aplicación de GA_{4/7} y fertilización mineral en el huerto semillero de *Pinus radiata* (D. Don) en Sergude (Galicia). *Invest. Agr. Sist. Rec. For.* 16: 262-266.
- Codesido, V., and L. Fernández-López. 2008. Using SYNCHRO.SAS, a program to facilitate phenological data processing, in a radiata pine seed orchard in northern Spain. *In: Lindgren, D. (ed.). Proceedings of a Seed Orchards Conference, Umea, Sweden.* pp. 43-52.
- Codesido, V., and J. Fernández-López. 2014. Juvenile radiata pine clonal seed orchard management in Galicia (NW Spain). *Eur. J. Forest Res.* 133: 177-190.
- Dick, J. M., R. R. B. Leakey, and P. G. Jarvis. 1990. Influence of female cones on the vegetative growth of *Pinus contorta* trees. *Tree Physiol.* 6: 151-163.

- Di-Giovanni, P., and P. G. Kevan. 1991. Factors affecting pollen dynamics and its importance to pollen competition: a review. *Can. J. For. Res.* 21: 1151-1170.
- Ebell, L. F., and R. L. Schmidt. 1964. Meteorological factors affecting conifer pollen dispersal on Vancouver Island. Department of Forestry, Forest Entomology and Pathology Branch. Government of Canada. Ottawa. Department of Forestry Publication No. 1036. 34 p.
- El-Kassaby, Y. A., A. M. K. Fashler, and O. Sziklai. 1984. Reproductive phenology and its impact on genetically improved seed production in a Douglas-fir seed orchard. *Silvae Genet.* 33: 120–125.
- El-Kassaby, Y. A. and K. Ritland. 1986a. The relation of outcrossing and contamination to reproductive phenology and supplemental mass pollination in a Douglas-fir seed orchard. *Silvae Genet.* 35:240-244.
- El-Kassaby, Y. A. and K. Ritland. 1986b. Low levels of pollen contamination in a Douglas-fir seed orchard as detected by allozyme markers. *Silvae Genet.* 35: 224-229.
- El-Kassaby, Y. A. 1989. Genetics of Douglas-fir seed orchards: expectations and realities. *In: Proc. 20th Southern Forest Tree Improv. Conf.* Charleston, South Carolina. pp. 87-109.
- El-Kassaby, Y. A., D. Rudin, and R. Yazdani. 1989a. Levels of outcrossing and contamination in two *Pinus sylvestris* L. seed orchards in northern Sweden. *Scand. J. For. Res.* 4: 41-49.
- El-Kassaby, Y. A., A. M. K. Fashler, and M. Crown. 1989b. Variation in fruitfulness in a Douglas-fir seed orchard and its effect on crop-management decisions. *Silvae Genet.* 38: 113-121.
- El-Kassaby, Y. A., and S. Reynolds. 1990. Reproductive phenology, parental balance, and supplemental mass pollination in a Sitka-spruce seed orchard. *For. Ecol. Manage.* 31: 45-54.
- El-Kassaby, Y. A., and G. R. Askew. 1991. The relation between reproductive phenology and reproductive output in determining the potential gametic pool profile in a Douglas-fir seed orchard. *For. Sci.* 37: 827-835.

- El-Kassaby, Y. A., and C. Cook. 1994. Female reproductive energy and reproductive success in a Douglas-fir seed orchard and its impact on genetic diversity. *Silvae Genet.* 43: 243-246.
- Eriksson, V. J., A. Jonsson, and D. Lindgren. 1973. Flowering in a clonal trial of *Picea abies* Karst. *Stud. For. Suec.* 110: 5-45.
- Ericksson, V. J., and W. T. Adams. 1989. Mating success in a costal Douglas-fir seed orchard as affected by distance and floral phenology. *Can. J. For. Res.* 19: 1248-1255.
- Erickson, V. J., and W.T. Adams. 1990. Mating system variation among individual ramets in a Douglas-fir seed orchard. *Can. J. For. Res.* 20: 1672-1675.
- Ericksson, U. 1996. Enhancing production of high-quality seed in Swedish conifer breeding. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae Silvestria.* 12: 45 p.
- Erteiken, M. 2012. Genetic Diversity of Seed Orchard Crops. INTECH Open Access Publisher.
- Falconer, D. S. 1989. Introduction to quantitative genetics. 4th Edition. Longman Sci & Tech. New York, NY. 459 p.
- Fashler, A. M. K., and Y. A. El-Kassaby. 1987. The effect of water spray cooling treatment on reproductive phenology in a Douglas-fir seed orchard. *Silvae Genet.* 36: 245-249.
- Friedman, S. T., and W. T. Adams. 1985. Estimation of gene flow into two seed orchards of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Theor. Appl. Gene.* 69: 609-615.
- Funda, T., and Y. A. El-Kassaby. 2012. Review: Seed orchard genetics. CAB Reviews No. 013. 24 p.
- Gömöry, D., R. Bruchánik, & R. Longauer. 2003. Fertility variation and flowering asynchrony in *Pinus sylvestris*: consequences for the genetic structure of progeny in seed orchards. *For. Ecol. Manage.* 174:117-126.
- Griffin, A. R. 1980. Isolation of a radiata pine seed orchard from external pollen. *Aust. For. Res.* 10: 83-94.
- Griffin, A. R. 1984. Clonal variation in radiata pine seed orchards. II. Flowering phenology. *Aust. Forest Res.* 14: 271-281.

- Harju, A. M., and T. Nikkanen. 1996. Reproductive success of orchard and nonorchard pollens during different stages of pollen shedding in a Scots pine seed orchard. *Can. J. For. Res.* 26: 1096-1102.
- Hedrick, P. W. 1985. *Genetics of Populations*. Boston, Massachusetts, USA. Jones & Bartlett Publishers. 629 p.
- Hernández-Zaragoza, O., J. López-Upton, J. J. Vargas-Hernández, y M. Jiménez-Casas. 2016. Variación clonal de la fenología reproductiva en un huerto semillero de *Pinus patula*. *Bosque* 37: 255-264.
- Huusko, A., and S. Hicks. 2009. Conifer pollen abundance provides a proxy for summer temperature: evidence from the latitudinal forest limit in Finland. *J. Quat. Sci.* 24:522-528.
- Huwei, Y., Z. Li, P. Fang, W. Li, and Y. Li. 2014. Variation and stability in female strobili production of a first-generation clonal seed orchard of Chinese pine (*Pinus tabuliformis*). *Silvae Genet.* 63: 41-47.
- Jonsson, A., I. Ekberg, and G. Ericksson. 1976. Flowering in a seed orchard of *Pinus sylvestris* L. *Stud. Forest. Suec.* 135: 1-38.
- Kang, K. S., and D. Lindgren. 1998. Fertility variation and its effect on the relatedness of seeds in *Pinus densiflora*, *Pinus thunbergii* and *Pinus koraiensis* clonal seed orchards. *Silvae Genet.* 47: 196-201.
- Kang, K. S., y D. Lindgren. 1999. Fertility variation among clones of Korean pine (*Pinus koraiensis* S. et Z.) and its implications on seed orchard management. *Forest Genetics* 6: 191-200.
- Kang, K. S. 2001. Genetic gain and gene diversity of seed orchard crops. PhD Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Silvestria, Umeå, Sweden. 187 p.
- Kang, K. S., D. Lindgren, and T. J. Mullin. 2001. Prediction of genetic gain and gene diversity in seed orchards crops under alternative management strategies. *Theor. Appl. Gene.* 103: 1099-1107.

- Kang, K. S., D. Lindgren, and T. J. Mullin. 2004. Fertility variation, genetic relatedness, and their impacts on gene diversity of seeds from a seed orchard of *Pinus thunbergii*. *Silvae Genet.* 53: 202-206.
- Kaya, N., K. Isik, and W. T. Adams. 2006. Mating system and pollen contamination in a *Pinus brutia* seed orchard. *New Forests* 31: 409-416.
- Kess, T., and Y. A. El-Kassaby. 2015. Estimates of pollen contamination and selfing in a coastal Douglas-fir seed orchard. *Scand. J. For. Res.* 30: 266-275.
- Khanduri, P. V. 2012. Temporal and spatial variation of pollen yield in natural populations of *Pinus roxburghii*. *For. Stud. China* 14: 20-29.
- Kremer, A., O. Ronce, J. J. Robledo-Arnuncio, F. Guillaume, G. Bohrer, R. Nathan, J. R. Bridle, R. Gomuńkiewicz, E. K. Klein, K. Ritland, A. Kuparinen, S. Gerber, and S. Schueler. 2012. Long distance gene flow and adaptation of forest trees to rapid climate change. *Ecology Letters* 15: 378-392.
- Lario, F. J., E. Merlo, J. L. Peñuelas, y L. Gil. 2001. Variabilidad clonal de la fenología reproductiva y producción floral. Participación clonal en un huerto semillero de *Pinus nigra* Arnold *salzmannii* (Dunal) Franco. *Actas del III Congreso Forestal Español*. Granada, España. pp. 539-545.
- Li, W., X. Wang, and Y. Li. 2012. Variation in floral phenological synchronization in a clonal seed orchard of *Pinus tabulaeformis* in Northeast of China. *Silvae Genet.* 61: 133-142.
- Lindgren, D., L. Paule, S. Xihuan, R. Yazdani, U. Segerström, J. E. Wallin, and M.L. Lejdebros. 1995. Can viable pollen carry Scots pine genes over long distances? *Grana* 34: 64-69.
- Lowe, W. J., and N. C. Wheeler. 1993. Pollen contamination in seed orchards. *In: Bramlett, D. L., G. R. Askew, T. D. Blush, F. E. Bridgwater, and J. B. Jett (eds.). Advances in pollen management. Agriculture Handbook 698. USDA Forest Service. pp. 49-53.*
- Luomajoki, A. 1993. Climatic adaptation of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Finland based on male flowering phenology. *Acta Forestalia Fennica* 237. 27 p.
- Matziris, D. 1993. Variation in cone production in a clonal seed orchard of black pine. *Silvae Genet.* 42: 136-141.

- Matziris, D. 1994. Genetic variation in the phenology of flowering in Black pine. *Silvae Genet.* 43:321-328.
- Matziris, D. 1997. Variation in growth, flowering and cone production in a clonal seed orchard of Aleppo pine grown in Greece. *Silvae Genet.* 46: 224-228.
- Merlo, E., y J. Fernández-López. 2004. Análisis del balance parental reproductivo en un huerto semillero de *Pinus pinaster*. *Invest. Agr. Sist. Rec. For.* 13: 387-398.
- Miguel-Pérez, I., S. C. González-Martínez, R. Alía-Miranda, and L. Gil-Sánchez. 2002. Growth phenology and mating system of maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton) in central Spain. *Invest. Agr. Sist. Rec. For.* 11: 193-204.
- Mohan, S. C., V. P. Khanduri, and S. K. Ghildiyal. 2012. Reproductive ecology of male and female strobili and mating system in two different populations of *Pinus roxburghii*. *The Scientific World Journal.* 13 p.
- Moriguchi, Y., H. Taira, and Y. Tsumura. 2007. Paternal gene flow in *Cryptomeria japonica* seed orchards as revealed by analysis of microsatellite markers. *In: Lindgren, D. (ed). Proceedings of a Seed Orchards Conference, Umea, Sweden.* pp. 183-188.
- Nikkanen, T., and P. Velling. 1987. Correlations between flowering and some vegetative characteristics of grafts of *Pinus sylvestris*. *For. Ecol. Manage.* 19: 35-40.
- Nikkanen, T. 2001. Reproductive phenology in a Norway spruce seed orchard. *Silva Fenn.* 35: 39-53.
- Nikkanen, T., A. Pakkanen, and J. Heinonen. 2002. Temporal and spatial variation in airborne pollen and quality of the seed crop in a Norway spruce seed orchard. *For. Genet.* 9: 243-255.
- O'Reilly, C., W. H. Parker, and J. E. Barker. 1982. Effect of pollen period and strobilus number on random mating in a clonal seed orchard of *Picea mariana*. *Silvae Genet.* 31: 90-94.
- Pakkanen, A., and P. Pulkkinen. 1991. Pollen production and background pollination levels in Scots pine seed orchard of Northern Finnish origin. *In: Lindgren, D. (ed). Pollen contamination in seed orchards.* Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Swedish University of Agricultural Sciences. Report 10:14-21.

- Pakkanen, A., T. Nikkanen, and P. Pulkkinen. 2000. Annual variation in pollen contamination and outcrossing in a *Picea abies* seed orchard. *Scand. J. For. Res.* 15: 399-404.
- Parantainen, A., and P. Pulkkinen. 2003. Flowering and airborne pollen occurrence in a *Pinus sylvestris* seed orchard consisting of northern clones. *Scand. J. For. Res.* 18: 111-117.
- Prescher, F., D. Lindgren, C. Almqvist, J. Kroon, T. A. Lestander, and T. J. Mullin. 2007. Female fertility variation in mature *Pinus sylvestris* clonal seed orchards. *Scand. J. For. Res.* 22: 280-289.
- Pulkkinen, P. 1994. Aerobiology of pine pollen: dispersal of pollen from non-uniform sources and impact on Scots pine seed orchard. *Forest Tree Breed.* 8: 1-23.
- Reynolds, S., and Y. A. El-Kassaby. 1990. Parental balance in Douglas-fir seed orchards (cone crop vs. seed crop). *Silvae Genet.* 39: 40-42.
- Ritland, K., and Y. A. El-Kassaby. 1985. The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas-fir as shown by an efficient multilocus model. *Theor. Appl. Gene.* 71: 375-384.
- Robledo-Arnuncio, J. J., and L. Gil. 2005. Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. *Heredity* 94: 13-22.
- Ross, S. D., J. E. Webber, R. P. Pharis, and J. N. Owens. 1985. Interaction between gibberellin A_{4/7} and root-pruning on the reproductive and vegetative process in Douglas-fir. I. Effects on flowering. *Can. J. For. Res.* 15: 341-347.
- Salaya-Dominguez, J. M., J. López-Upton, y J. J. Vargas-Hernández. 2012. Variación genética y ambiental en un ensayo de progenies de *Pinus patula*. *Agrociencia* 46: 519-534.
- SAS (Statistical Analysis System) Institute. 2002. SAS/STAT Computer Software. Release 9.00. SAS Institute Inc. Cary. N. C. 378 p.
- Sedgley, M., and A. R. Griffin. 1989. Sexual reproduction of tree crops. Academic Press. 378 p.
- Slavov, G. T., G. T. Howe, and W. T. Adams. 2005. Pollen contamination and mating patterns in a Douglas-fir seed orchard as measured by simple sequence repeat markers. *Can. J. For. Res.* 35: 1592-1603.

- Sousa, V. A., and H. H. Hattemer. 2003. Pollen dispersal and gene flow by pollen in *Araucaria angustifolia*. *Aust. J. Bot.* 51: 309-317.
- Squillace, A. E., and E. M. Long. 1981. Proportion of pollen from nonorchard sources. *In: Pollen management Handbook*.
- Steel, R. G. D., and J. H. Torrie. 1980. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. McGraw-Hill Book Co., New York. 672 p.
- Torimaru, T., U. Wennström, B. Andersson, C. Almqvist, and X. R. Wang. 2013. Reduction of pollen contamination in Scots pine seed orchard crop by tent isolation. *Scand. J. For. Res.* 28: 715-723.
- Torimaru, T., X. R. Wang, A. Fries, B. Andersson, and D. Lindgren. 2009. Evaluation of pollen contamination in an advanced Scots pine seed orchard. *Silvae Genet.* 58: 262-269.
- Wang, X., D. Lindgren, A. E. Szmidt, and R. Yazdani. 1991. Pollen migration into a seed orchard of *Pinus sylvestris* L. and the methods of its estimation using allozyme markers. *Scand. J. For. Res.* 6: 379-385.
- Webber, J. E., and R. A. Painter. 1996. Douglas-fir pollen management manual. Research program, British, British Columbia Ministry of Forest, Victoria, British Columbia working paper. 2nd ed. 91 p.
- Ying, C. C., J. C. Murphy, and S. Andersen. 1985. Cone production and seed yield of Longepole pine grafts. *Forestry Chronicle*. pp. 223-228.
- Zas, R., E. Merlo, and J. Fernández-López. 2003. Synchro: A SAS Program for analyzing the floral phenological synchronization in seed orchards. *Silvae Genet.* 52: 212-215.
- Zhang, X., J. Ren, and D. Zhang. 2001. Phenological observations on *Larix principis-rupprechtii* Mayr. in primary seed orchard. *J. For. Res.* 12: 201-204.
- Zobel, B., y J. Talbert. 1988. Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales. Ed. Limusa. México. D. F. 545 p.