

MANEJO DE RECURSOS GENÉTICOS

FORESTALES

Segunda Edición

Documentos presentados en el Seminario-Taller sobre Manejo de Recursos
Genéticos Forestales realizado los días 11 y 12 de Abril de 1995 en la Universidad
Autónoma Chapingo,

Organizado por el

**Grupo de Estudios sobre Recursos Genéticos Forestales
de la Comisión Forestal para América del Norte
Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)**

J. Jesús Vargas H., Basilio Bermejo V. y F. Thomas Ledig
Editores

Esta publicación se realizó con el apoyo económico del

**Servicio Forestal de los Estados Unidos de América (U.S.D.A. Forest Service),
la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)
y la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR), de la Secretaría de Medio Ambiente y
Recursos Naturales (SEMARNAT) de México.**

Programa Forestal
Colegio de Postgraduados
Montecillo, Edo. de México.

Comisión Nacional Forestal
Periférico Poniente No. 5360
Zapopan, Jalisco.

México, Septiembre de 2004

**CITA CORRECTA: Vargas H., J. Jesús, Basilio Bermejo V.† y F. Thomas Ledig
(eds.). 2004. Manejo de Recursos Genéticos Forestales, Segunda Edición. Colegio de
Postgraduados, Montecillo, Edo. de México, y Comisión Nacional Forestal, Zapopan,
Jalisco.**

J. Jesús Vargas Hernández es Profesor Investigador del Programa Forestal en el Instituto de
Recursos Naturales del Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México.

Basilio Bermejo Velázquez fue Profesor Investigador de la División de Ciencias Forestales de
la universidad Autónoma Chapingo y Director del Centro de Genética Forestal, A.C.
Chapingo, Edo. de México. Por desgracia, falleció a principios del año 2001. Esta segunda
edición se dedica a su memoria.

F. Thomas Ledig es Investigador Líder en la Pacific Southwest Research Station del Servicio
Forestal de los Estados Unidos, adscrito al Institute of Forest Genetics en Placerville,
California. Además, es profesor de la Universidad de California, en Davis.

Derechos Reservados. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México y Comisión
Nacional Forestal, Zapopan, Jalisco. Registro Núm. 306 de la Cámara Nacional de la Industria
Editorial Mexicana.

ISBN 968-839-223-5

Se pueden obtener copias adicionales de esta publicación en:

Comisión Nacional Forestal (CONAFOR)
Gerencia de Investigación y Desarrollo Tecnológico
Periférico Poniente No. 5360
Col. San Juan de Ocotán, Zapopan, Jalisco
Fax: 01 (33) 3110 0820
(e-mail: rherrera@conafor.gob.mx, mcastillo@conafor.gob.mx)

Programa Forestal
Instituto de Recursos Naturales
Colegio de Postgraduados
Montecillo, Edo. de México, 56230
Fax: 01 (595) 952-0256
(e-mail: vargashj@colpos.colpos.mx)

PRESENTACIÓN

El Grupo de Trabajo sobre Recursos Genéticos Forestales de la Comisión Forestal para América del Norte fue creado en 1961, y realizó su primera reunión de trabajo en 1965, bajo la denominación de Grupo de Trabajo en Mejoramiento Genético Forestal. Con la aprobación de los miembros del Grupo, en 1993 modificó su nombre a Grupo de Estudio en Recursos Genéticos Forestales, que reflejaba en forma más precisa sus objetivos de largo plazo. En el año 2000 tomó su designación actual, como Grupo de Trabajo en Recursos Genéticos Forestales. Su misión es promover y facilitar el conocimiento, manejo y conservación de los Recursos Genéticos Forestales de América del Norte. Con este propósito, los integrantes del Grupo promueven la cooperación internacional y el intercambio de información técnica y científica relacionada con la conservación y uso sostenible de los recursos genéticos forestales en la región.

El Grupo de Trabajo está integrado por tres representantes de cada uno de los tres países de América del Norte (Canadá, Estados Unidos y México), quienes definen las actividades a realizar y la estrategia a seguir para lograr los objetivos específicos de cada una de ellas. El Grupo realiza reuniones de trabajo en forma periódica para evaluar las tareas asignadas a sus miembros y definir la continuación de éstas o programar nuevas actividades. Hasta la fecha de esta publicación, se han realizado 21 reuniones de trabajo.

En cumplimiento a los objetivos y misión de este Grupo, durante su XX Reunión de Trabajo, celebrada en la Universidad Autónoma Chapingo del 10 al 14 de Abril de 1995, se organizó un Seminario-Taller sobre el “**Manejo de Recursos Genéticos Forestales**”. Especialistas de Canadá, Estados Unidos y México en diferentes disciplinas de genética, fisiología, producción de planta y mejoramiento genético de árboles forestales, presentaron 13 conferencias agrupadas en los temas de: 1) Aspectos básicos de conservación de recursos genéticos, 2) Manejo de Germoplasma, 3) Evaluación de germoplasma, y 4) utilización de germoplasma de especies forestales. Al seminario-Taller asistieron en total 64 profesionistas, técnicos y académicos de diferentes dependencias oficiales, universidades e instituciones de investigación relacionadas con este tema en México.

En virtud de la calidad de las ponencias presentadas durante el Seminario, y del vacío existente de información actualizada y especializada en español en relación con el manejo sostenible y conservación de los recursos genéticos forestales en México, en 1997 se publicó la primera edición de los documentos presentados por cada uno de los especialistas. Cinco años después los ejemplares de esta obra estaban agotados, por lo que se decidió publicar una segunda edición para atender la demanda de información que aún existe sobre el tema. En esta nueva edición algunos de los capítulos fueron actualizados, se incorporó un nuevo capítulo relacionado con la zonificación altitudinal para la transferencia de semillas en México, y se eliminó el capítulo sobre el Programa Nacional de Reforestación, cuya información ya no es vigente.

La tarea central de organizar el evento, reunir los documentos para su primera edición, y contactar a los autores para valorar la necesidad de actualizar sus contribuciones fue realizada por los editores. Sin embargo, en el periodo transcurrido desde la primera edición, algunos autores ya se habían retirado y otros, como es el caso del Dr. Basilio Bermejo Velásquez, ya habían fallecido, por lo que fue imposible cumplir cabalmente con el propósito inicial. De cualquier manera, se decidió continuar con el proyecto, como un reconocimiento póstumo a las actividades desarrolladas por el Dr. Bermejo en el área de los recursos genéticos forestales de México. Expresamos nuestro agradecimiento también a los integrantes del Grupo de Trabajo en esa época, que apoyaron en forma entusiasta la idea original. Además de su participación directa en el Seminario, los representantes de Canadá (Judy Loo, Kurt Johnsen y Barry Jaquish) y Estados Unidos (Glenn Furnier y Tom Ledig), apoyaron la participación de otros especialistas invitados procedentes de esos países (Ben Wang, Tom Conkle, James Jenkinson, Jay Kitzmiller y María Magallanes), en algunos casos con fondos económicos de sus propios proyectos de investigación.

El apoyo gubernamental y de otras instituciones de los tres países integrantes de la Comisión Forestal para América del Norte fue fundamental a lo largo de todo el proceso. El Servicio Forestal de Canadá y su similar en los Estados Unidos aportaron recursos económicos para facilitar la participación de los especialistas en el Seminario. El Servicio Forestal de los Estados Unidos, junto con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Subsecretaría de Recursos Naturales de la SEMARNAP, en México, proporcionaron el apoyo económico para la publicación de estos documentos.

La Universidad Autónoma Chapingo, el Colegio de Postgraduados, y la Comisión Nacional Forestal también aportaron recursos para la realización de esta obra, incluyendo el apoyo logístico y de comunicaciones durante la organización y desarrollo del seminario, así como los recursos humanos y materiales durante la fase de traducción y formato de los manuscritos, y durante la preparación de la segunda edición. A todas las personas que intervinieron en esta etapa les manifestamos nuestro reconocimiento.

J. Jesús Vargas Hernández, Basilio Bermejo Velásquez† y F. Thomas Ledig

CONTENIDO

CAPÍTULO I.	Conservación y Manejo de Recursos Genéticos Forestales <i>F. Thomas Ledig</i>	2
CAPÍTULO II.	Métodos para Medir Variación Genética en las Plantas <i>Glenn R. Furnier</i>	20
CAPÍTULO III.	Análisis de la Estructura Genética en Poblaciones de Árboles Forestales <i>Basilio Bermejo Velázquez</i>	32
CAPÍTULO IV.	Manejo de Germoplasma en Programas de Mejoramiento de Árboles <i>Judy Loo</i>	44
CAPÍTULO V.	Zonificación de Semillas en México <i>M. Thompson Conkle</i>	58
CAPÍTULO VI.	Zonificación Estatal y Altitudinal para la Colecta y Movimiento de Semillas de Coníferas en México <i>Cuaubtémoc Sáenz-Romero</i>	72
CAPÍTULO VII.	Abasto y Manejo de Semillas a Partir de la Recolección en Rodales Naturales, Áreas de Producción y Huertos Semilleros <i>Barry C. Jaquish</i>	88
CAPÍTULO VIII.	Almacenamiento y Manejo de Germoplasma <i>B.S.P. Wang y Tannis Beardmore</i>	102
CAPÍTULO IX.	Diseños Genéticos y Métodos Estadísticos en la Evaluación de Germoplasma de Especies Forestales <i>J. Jesús Vargas-Hernández y Javier López-Upton</i>	128
CAPÍTULO X.	Diseño y Manejo de Base de Datos y Sistemas Computarizados <i>Jay H. Kitzmiller</i>	146
CAPÍTULO XI.	Técnicas Ecofisiológicas en la Evaluación de Germoplasma <i>Kurt H. Johnsen y John E. Major</i>	158
CAPÍTULO XII.	Promoción de Plantaciones de Rápido Establecimiento en Bosques de Ladera de California-Oregon <i>James L. Jenkinson</i>	184
CAPÍTULO XIII.	Aplicación de la Tecnología del Cultivo <i>In Vitro</i> en la Propagación de Especies Forestales <i>María E. Magallanes-Cedeño</i>	200

1

MANEJO DE RECURSOS GENÉTICOS FORESTALES

F. Thomas Ledig

Introducción

Los valores económicos de los recursos genéticos

Conservación de recursos genéticos

Manejo y conservación forestal

CONSERVACIÓN Y MANEJO DE RECURSOS GENÉTICOS FORESTALES

F. Thomas Ledig

Institute of Forest Genetics, Pacific Southwest Research Station,
U.S.D.A Forest Service, Placerville, California 95667, E.U.A.

Introducción

Para iniciar la introducción a este Seminario-Taller sobre el Manejo de Recursos Genéticos Forestales, voy a describir la historia de un país en desarrollo -- un país del tamaño de México (cerca de 2.01 millones de Km² comparados con los cerca de 1.97 millones de Km² de México). Igual que México, este país fue conquistado por europeos. En lugar de decirles de que país se trata, dejaré que ustedes lo adivinen. En el tiempo de la conquista europea, este país estaba casi enteramente cubierto por bosques. En los siguientes 250 años, los bosques se cortaron a una velocidad promedio de cerca de 803 mil hectáreas (8,030 Km²) por año. Esto es más de 2,200 hectáreas (22 Km²) por día. La mayor parte de los bosques se eliminó para la agricultura, por la necesidad de alimentar a una población en expansión. Los árboles se derribaron y quemaron para librarse de ellos. Los residuos de las cenizas se utilizaron como fertilizante. Los bosques que no fueron convertidos a la agricultura, se cortaron una, dos o quizás hasta seis veces. Primero se eliminaron las especies de mayor valor -- las especies de coníferas más altas--, con troncos grandes para postes y madera de construcción y los mejores árboles de especies latifoliadas para la fabricación de muebles de sus hogares. Después de que se terminaron las especies de coníferas y latifoliadas de mayor valor, la siguiente generación de madereros regresó por las especies de menor valor. Cada generación tomó los árboles mejor formados y dejó los enfermos, torcidos y de lento crecimiento. Los bosques se degradaron en forma progresiva. Menos de un centésimo de 1% (únicamente 0.0025%) de los bosques primarios quedó como remanente.

El bosque desapareció y lo mismo ocurrió con la fauna. Las poblaciones de ciervo se redujeron, los pavos se eliminaron en muchas regiones del país, y especies enteras se extinguieron a causa de la pérdida de hábitat y la presión de la cacería. Nunca se consideró la necesidad de conservación. ¿Donde se encuentra este país pródigo primitivo? ¿En África, Asia, en los bosques Atlánticos de Brasil? No, se trata de los Estados Unidos de América originales.

Conforme los Estados Unidos se expandieron hacia el oeste, alguna gente comenzó a preocuparse por la pérdida de los bosques nativos. No obstante, los bosques se cortaron hasta las costas del Pacífico, sin ninguna preocupación por la necesidad de regeneración. Muchas áreas en el oeste del país se cortaron en el período de hace 100 a 50 años y nunca se ha restablecido el bosque (Shoup y Baker 1981).

A principios de 1900, el movimiento de conservación ya había ganado una fortaleza considerable. Presionó al gobierno para establecer áreas de reserva para conservar los recursos maderables y otros tesoros nacionales escénicos. Estos primeros conservacionistas en ningún momento pensaron sobre la diversidad genética, aunque la diversidad genética sea el elemento básico de todos los recursos renovables. Sólo en fechas recientes hemos comenzado a considerar la necesidad de conservación de los recursos genéticos, y es todavía una idea novedosa para la mayoría de los conservacionistas y políticos. El punto central de todo esto es que nuestras ideas sobre la conservación han cambiado y aún están en proceso de evolución. No debemos repetir los errores pasados -por lo menos, no a causa de la ignorancia.

América del Norte es un continente rico en diversidad climática y topográfica, y por lo tanto, rico en recursos biológicos. Los recursos genéticos en nuestros bosques son la base de la silvicultura en plantaciones en la mayor parte del mundo. *Picea sitchensis* (Bong.) Carr., *Pinus tadea* L., *Pinus radiata* D. Don, y *Pinus oocarpa* Schiede se plantan en cientos de miles de hectáreas en África, Asia, Australia, Europa, y Sudamérica; y de los tres países que coexisten en América del Norte, México es el más rico. Los Estados Unidos y Canadá tienen cerca de 650 especies leñosas (Little. 1979) mientras que México tiene entre 2,000 y 3,000 (J. Rzedowski. 1989, comunicación personal). De un total de 22,000 especies vegetales en México, 4,000 son endémicas, y seguramente más se descubrirán. Muchos de los taxa de México representan una riqueza de diversidad genética. Uno de los regalos de México al mundo es el maíz, por supuesto, pero otro son los pinos. México es un centro de diversificación de los pinos, ya que es el hábitat de más de la mitad de las especies de este género en el mundo.

La parte triste es que se estima que 17% de las especies vegetales mexicanas, este rico patrimonio, se considera en peligro de extinción. Pero el peligro más grave puede ser la pérdida de poblaciones y recursos genéticos dentro de especies -- lo que yo llamo las "extinciones ocultas" (Ledig. 1993). La pérdida de los recursos genéticos forestales ocurre principalmente como resultado de la conversión de terrenos forestales a otros usos, fundamentalmente pastoreo y agricultura. La deforestación en México está avanzando a una gran velocidad, cerca de 5% de la superficie forestal se modificó durante el período quinquenal 1981-1984 (Office of Technology Assessment 1984).

La diversidad genética de nuestros países es motivo de orgullo, pero las pérdidas de recursos genéticos son tragedias nacionales. Estas pérdidas nos disminuyen a cada uno de nosotros. José Ortega y Gasset (1914) escribía sobre bosques figurativos y reales cuando señaló: "Yo soy yo y mi circunstancia, y si no la salvo a ella no me salvo yo". Ortega y Gasset escribió en un español algo arcaico, pero lo que él quería decir es que lo que nosotros somos es en gran medida un producto tanto de nuestro medio como de nuestro cuerpo, y si nosotros no salvamos nuestro ambiente, también perdemos parte de nosotros mismos.

Con frecuencia he señalado que los recursos genéticos tienen valores múltiples: valores económicos, ecológicos, estéticos y éticos. La diversidad genética ciertamente tiene un valor estético, como lo sugirió Ortega y Gasset, pero en este Seminario voy a hablar de los usos materiales, el valor económico, de los recursos genéticos y posteriormente me referiré a las técnicas para la conservación. Espero que esto prepare el camino para los aspectos y comentarios más detallados que se presentarán en los siguientes documentos.

Los valores económicos de los recursos genéticos

Es obvio que nuestros bosques comerciales en América del Norte son un recurso económico. Sin embargo, es menos obvio que la diversidad genética dentro de estos bosques es el fundamento de su valor económico.

Las especies como *Pinus ponderosa* Dougl. ex Laws. o *P. cooperi* Blanco, no son una población homogénea. Las especies con una amplia distribución natural son comúnmente una colección de poblaciones. Las poblaciones locales están comúnmente adaptadas a su ambiente. Si esas poblaciones se eliminaran, la productividad forestal se reduciría. Por ejemplo, si los sitios de *Pinus ponderosa* a 825 m de elevación en la Sierra Nevada de California se replantaran con la semilla de una elevación de 600 m menor la reducción en el volumen a la edad de 50 años sería de alrededor de 5% (Figura 1). Si se replantara con la semilla de una elevación 600 m mayor, la reducción sería de alrededor de 20%. Podemos dibujar curvas similares para sitios de plantación en otras elevaciones, y el pico de la curva coincidiría en forma bastante precisa con la elevación local. Por lo tanto, los recursos genéticos locales contribuyen a la productividad del bosque que, por supuesto, es un valor económico básico, y si esos recursos se pierden podría ser difícil o imposible reemplazarlos.

Nuevos ambientes

El cambio climático global es una razón urgente para conservar una gama de recursos genéticos en las especies comerciales. Los modelos climáticos proyectan hasta un aumento de 5°C en la temperatura global en los próximos 50 años como resultado del "efecto de invernadero" (por ejemplo, debido a un aumento en 100% en la concentración atmosférica del bióxido de carbono). En episodios previos de calentamiento, las especies forestales y las poblaciones dentro de las especies se movieron hacia mayores elevaciones. Para mantener la productividad en un clima más cálido tendríamos que mover poblaciones de menores a mayores elevaciones. Con base en la ley de Hopkins, la temperatura disminuye cerca de 1.4°C por cada 305 m de aumento en elevación. Por lo tanto, para el clima proyectado dentro de 50 años, tendríamos que plantar sitios con fuentes de semilla de elevaciones 550 m más bajas (Figura 2; Ledig y Kitzmiller. 1992). ¿Pero, qué pasaría si las fuentes de semilla de esas elevaciones menores se han destruido, y los recursos genéticos se perdieron? Esta ha sido la situación en los Estados Unidos y todavía ocurre en México, en aquellos lugares donde los bosques en la parte baja de las montañas se eliminan para usar los terrenos en la agricultura.

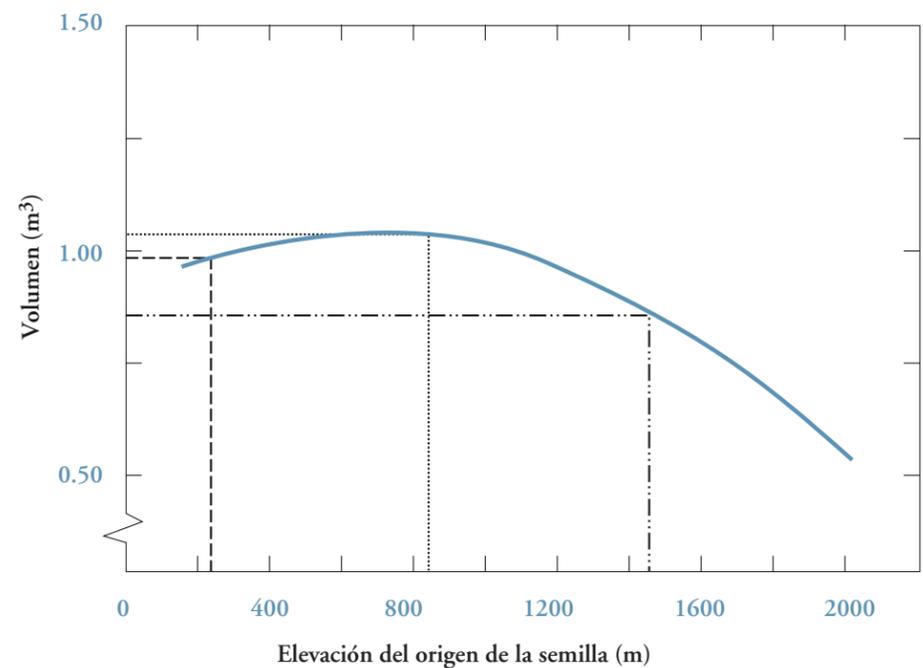


Figura 1. Volumen por árbol de fuentes de semilla de *Pinus ponderosa* en un sitio a 825 m de elevación en la Sierra Nevada de California. Este tipo de datos se puede usar para calcular la pérdida (o ganancia) en el volumen debido a la plantación de fuentes de semilla no locales. Plantar con una fuente de semilla de una elevación 600 m menor en lugar de usar la semilla local resultaría en aproximadamente 5% menos volumen. Plantar con una fuente de semilla de una elevación 600 m mayor resultaría en cerca de 20% menos volumen (M. T. Conkle, datos inéditos).

Nuevos mercados

Los nuevos mercados son otra razón para conservar los recursos genéticos, los cuales son necesarios para generar variedades nuevas. Por medio de cruzamiento podemos producir variedades con mayor velocidad de crecimiento, o cambiar de objetivos para satisfacer nuevas demandas en el mercado. Por ejemplo, los primeros mejoradores de *Pinus taeda* en el sur de los Estados Unidos seleccionaron árboles con una gravedad específica de la madera alta porque esta especie se usó para elaborar bolsas de papel Kraft y cajas de cartón corrugado, y la madera de mayor gravedad específica producía mayores rendimientos de pulpa y bolsas con mayor resistencia al rasgado.

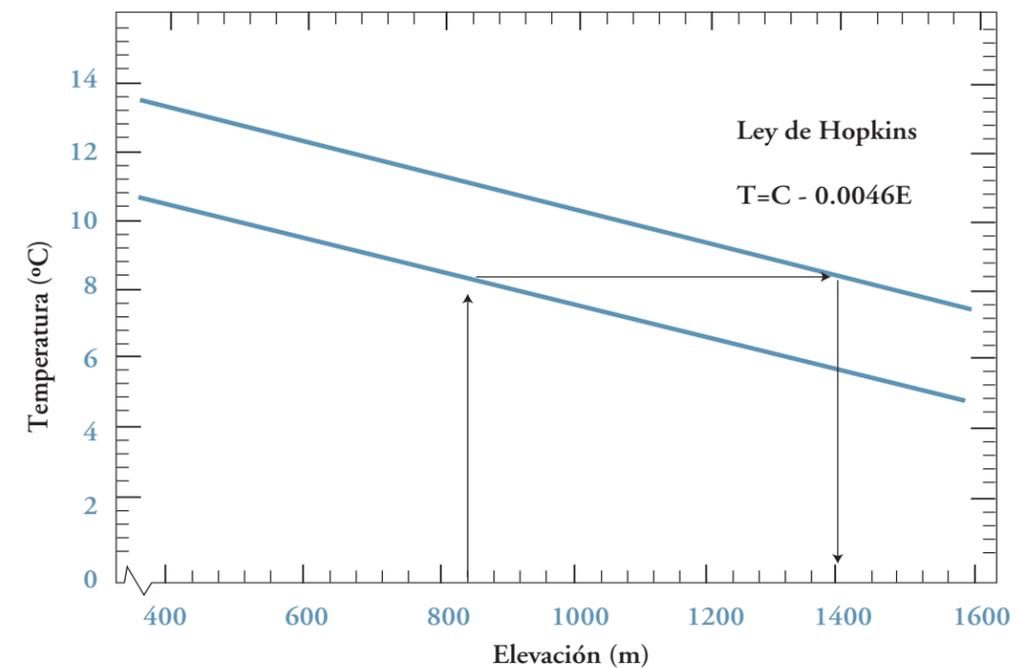


Figura 2. La ley de Hopkins define la regla básica de que la temperatura disminuye cerca de 2.5°F por cada 1,000 pies de elevación (1.4°C por cada 305 m). La temperatura actual se representa por la línea inferior, y la línea superior muestra la tendencia, suponiendo un aumento de 2.5°C en la temperatura global. Una procedencia a 850 m, creciendo en la actualidad en un ambiente que tiene una temperatura anual promedio de cerca de 8°C encontraría esas condiciones cerca de los 1,400 m, o sea, 550 m arriba en la pendiente después del cambio global.

Sin embargo, el mercado cambió y la demanda por papel sanitario, papel periódico y papel de impresión aumentó. Para estos productos se prefiere una madera de menor gravedad específica. Afortunadamente, los recursos genéticos de *Pinus taeda* eran suficientes para permitir a los genetistas seleccionar árboles con madera de gravedad específica más baja. De hecho, las cooperativas de mejoramiento genético forestal en el sureste de los Estados Unidos habían conservado árboles de *Pinus taeda*, de crecimiento rápido con madera de gravedad específica más baja en blancos clonales. Estos clones estaban fácilmente disponibles para producir papel higiénico y de escritura de alto valor cuando el mercado cambió. Sin la variación genética disponible los genetistas pueden hacer muy poco (Figura 3). Un programa de mejoramiento genético en *Pinus resinosa* Ait fracasaría porque la especie carece de variación genética. Nosotros deseamos proteger los recursos genéticos y evitar que una especie genéticamente variable se convierta en un *Pinus resinosa* empobrecido genéticamente.

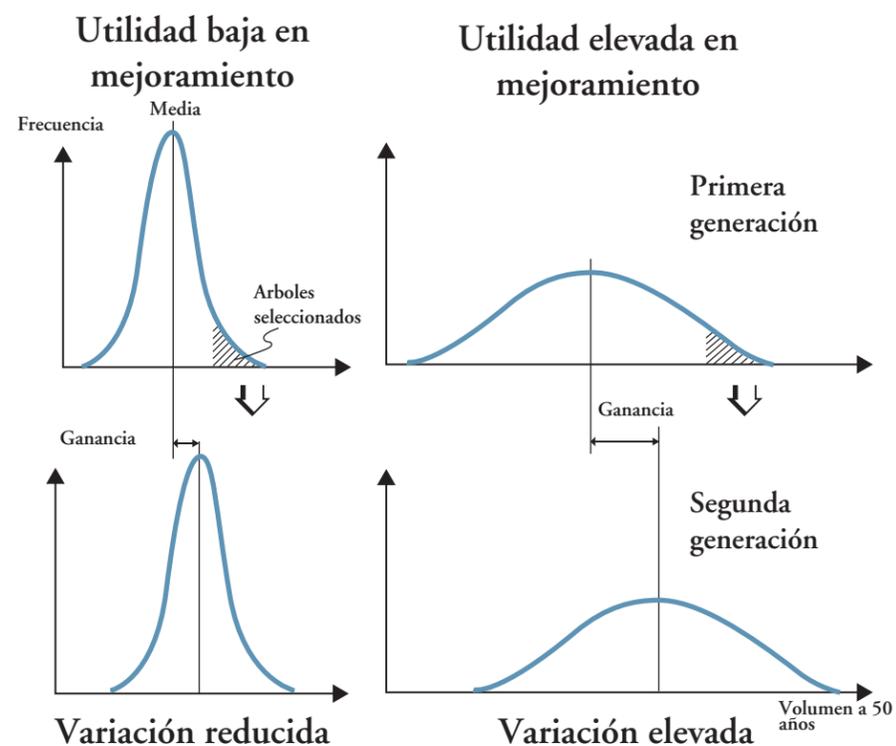


Figura 3. Cuando una especie tiene poca variación genética para una característica (como volumen a los 50 años), la selección resultará en un avance pequeño. Cuando la variación es grande, el mejoramiento (la ganancia obtenida por selección) será mucho mayor.

Nuevas amenazas

Las nuevas plagas de insectos y patógenos son una amenaza constante en la agricultura. Los agrónomos deben generar variedades nuevas de cultivos vegetales cada unas pocas generaciones para mantenerse adelante de las plagas en evolución. Lo mismo es cierto en la silvicultura. La variación genética necesaria podría no encontrarse en todas las poblaciones. Por ejemplo, la frecuencia de una de forma de resistencia genética a la roya de los pinos blancos en *Pinus lambertiana* Dougl es casi cero en las poblaciones del norte, pero se encuentra en mayores frecuencias (8%) en las poblaciones de la Sierra Nevada Central (Kinloch, 1992).

Nuevos productos

Todo lo que se ha mencionado en párrafos anteriores pertenece a especies que tienen un valor comercial actual. Pero nuestro interés en los recursos genéticos en América del Norte debería incluir especies forestales que actualmente se consideran como malezas, porque podríamos descubrir nuevos usos para ellas en el futuro. *Taxus brevifolia* Nutt era una especie sin valor hace diez años, pero se encontró que el taxol de los extractos de corteza era altamente efectivo contra el cáncer en pruebas realizadas por el Instituto Nacional del Cáncer en E.U.A. En cuestión de años, esta especie de *Taxus* llegó a ser tan altamente deseada, que los conservacionistas comenzaron a preocuparse por su posible eliminación de los bosques del noroeste de Estados Unidos.

Nuevos productos vegetales están por descubrirse: productos químicos que pueden ser agentes medicinales efectivos, insecticidas, fungicidas, o herbicidas. La tarea de descubrir estas propiedades es lenta, pero actualmente casi 25% de las medicinas de prescripción (un mercado de varios millones de dólares) en los Estados Unidos proviene de las plantas. Merck & Compañía, Ltd. ha establecido un acuerdo de \$1.1 millones de dólares con el Instituto Nacional de la Diversidad Biológica de Costa Rica, (INBIO) para explorar posibles químicos nuevos en las reservas y parques nacionales de Costa Rica. (Reid, 1993). El INBIO recibirá los derechos de autor sobre cualquier producto nuevo que se desarrolle.

No sólo debemos estar preocupados por las especies leñosas forestales, sino por los bosques mismos, porque son el hábitat de un conjunto tremendo de diversidad biológica. Si no conservamos estos recursos genéticos, estamos eliminando industrias futuras de gran valor. No todas las especies vegetales o animales de los bosques tienen las propiedades únicas deseadas, pero no podemos predecir cuál de ellas las tiene. A pesar de esta incertidumbre, Farnsworth y Soejarto (1985) pudieron calcular que cada especie de planta que se extingue es una pérdida de \$204 millones de dólares.

Nuevo entorno económico

Independientemente del sistema económico, comunista o capitalista, los contadores nunca han considerado todos los costos - los costos ocultos - de hacer negocios. Ellos han descuidado los costos ambientales, dejando que alguien más o alguna generación futura pague la cuenta. Estos costos no registrados incluyen los costos médicos ocasionados por la contaminación del aire debido a industrias que usan la atmósfera como un recurso libre. Estos son los costos desde el punto de vista de oportunidades perdidas de una generación futura que podría haber usado una especie que el desarrollo condujo a la extinción.

La atmósfera que respiramos ahora, los climas que disfrutamos ahora, el desarrollo del suelo y la estabilización de pendientes o taludes, dependen de la cubierta forestal. Mucho se ha escrito sobre el valor de los bosques para captar bióxido de carbono. El aumento proyectado en la temperatura global se basa en la duplicación del bióxido de carbono en la atmósfera. Este es sólo un nivel de referencia conveniente. No hay razón para suponer que las emisiones de bióxido de carbono disminuirán después de alcanzar un nivel de bióxido de carbono del doble de los niveles preindustriales. En el próximo siglo, la sociedad todavía quemará combustibles fósiles que tenían capturado el bióxido de carbono durante millones de años como depósitos de carbón y petróleo. Los servicios de apoyo a la vida proporcionados por los bosques podrían exceder en gran medida su valor como fuente de madera y fibra.

La diversidad genética, los recursos genéticos dentro de especies, podrían ser cruciales para la salud de los ecosistemas. La pérdida de diversidad genética o inclusive los cambios en la estructura genética sin una disminución en la diversidad podrían conducir plausiblemente a cambios en el flujo de energía y nutrientes en el ecosistema (Ledig, 1991). Al nivel de las especies, esto es seguramente cierto. Investigaciones recientes en el ecotrópico del Colegio Imperial (Londres), un banco de 16 cámaras con atmósfera - y clima - controlados, ha demostrado que los ecosistemas ricos en especies asimilan bióxido de carbono a una mayor velocidad que los ecosistemas menos diversos (Naeem *et al.* 1994).

Conservación de recursos genéticos

El manejo de recursos genéticos de las plantas agrícolas cultivadas se divide en ocho componentes (Cuadro 1).

Cuadro 1. Componentes del manejo de recursos genéticos en la agricultura

1. Recolección
2. Documentación
3. Caracterización
4. Almacenamiento
5. Evaluación
6. Multiplicación
7. Distribución
8. Utilización

En esta introducción al Seminario-Taller, mencionaré brevemente sobre el almacenamiento, evaluación y utilización de los recursos genéticos. Debido a que la silvicultura difiere de la agricultura, la lista en el Cuadro 1 no se ajusta bien a nuestra situación. Es más, la mayor parte de la actividad forestal todavía depende de especies silvestres que crecen en poblaciones que se regeneraron en forma natural. Por lo tanto, el manejo de los rodales naturales es un aspecto de conservación único a la silvicultura. Yo mencionaré ese aspecto de manejo de germoplasma porque podría no ser cubierto en forma detallada en los otros documentos.

La recolección, la documentación y la caracterización generalmente se realizan en forma simultánea en la silvicultura, pero yo no dedicaré mucha atención a esos temas. En otro documento he planteado un enfoque sistemático a la recolección de recursos genéticos representativos para la conservación *ex situ* de las especies forestales en los Estados Unidos (ver Ledig, 1992).

Consideraré la regeneración y utilización como un tema refiriéndome principalmente a otros documentos en esta publicación. En la silvicultura, la distribución (por ejemplo, la infraestructura para mover plantas de la fase de regeneración a la de utilización) es prácticamente una parte integral de los sistemas de viveros y reforestación, por lo que yo la ignoraré. La distribución presenta problemas, pero por ahora no los consideraremos. Además del manejo de rodales naturales, mencionaré el almacenamiento, la evaluación, y la utilización de recursos genéticos forestales. Esto sigue el guión del Seminario-Taller propuesto por Jesús Vargas y Basilio Bermejo. Este es un resumen práctico y excelente para considerar el manejo de recursos genéticos forestales. Yo les agradezco por concebir este programa en el seminario.

Manejo y conservación forestal

Hace cuatro años en el Congreso Mundial de Silvicultura en París, Teobaldo Eguiluz dijo algo tan importante que yo lo anoté: “La conservación no debería ser un árbol aislado en el vasto campo de los bosques”. La conservación de recursos genéticos debería ser una parte integral del mejoramiento forestal, como Judy Loo lo señalará posteriormente en esta mañana. Además, la conservación no debe y no puede considerarse en forma aislada en ningún sentido del manejo o cultivo de los bosques.

Casi por definición, conservación significa reducir la presión sobre los recursos. El crecimiento de la población es el problema primario que conduce a la pérdida de recursos genéticos, el mismo problema que enfrentan todos los aspectos de la sociedad moderna. Si nosotros deseamos conservar los recursos genéticos o preservar aunque sea una parte pequeña de la diversidad biológica de la que depende nuestra subsistencia, debemos estabilizar la población mundial, y de hecho, inclusive reducirla. En el corto plazo el reciclado o la reducción del consumo es un paso positivo. Los países ricos industrializados son los más grandes consumidores; por ejemplo, el consumo *per cápita* de energía es seis veces mayor en los Estados Unidos que en México y el consumo de energía en México es 70 veces mayor que en Etiopía (Anónimo, 1994). Estas tasas tan altas de consumo significan que cada nacimiento en los Estados Unidos es equivalente a seis nacimientos en México. Sin embargo, los forestales tienen poco control sobre las políticas que influyen sobre los patrones de crecimiento o consumo de la población.

Una manera en que los forestales pueden reducir la presión sobre los recursos genéticos es mediante el manejo forestal y la silvicultura. Los programas de reforestación y el manejo activo de plantaciones pueden aumentar la productividad a niveles superiores de aquellos obtenidos en el bosque natural. Si las necesidades de productos forestales se pueden satisfacer con unas pocas hectáreas de plantación, entonces el bosque natural puede destinarse para la conservación *in situ* de recursos genéticos, la protección de la diversidad biológica y el disfrute estético. Consideremos los datos estadísticos de Brasil, que tiene 396'000,000 de ha de bosque natural y sólo 6'500,000 ha de plantaciones industriales (sólo 2% de su área forestal total). No obstante, Brasil obtiene 60% de su abasto industrial de madera de sus plantaciones; esto es, 60% de sólo 2% de los terrenos con vocación forestal (Anónimo, 1993). Rocca Calienes (1985) acreditó la introducción de especies de eucalipto de rápido crecimiento (*Eucalyptus globulus* Labill.) en 1973 con una reducción en la tasa de eliminación del bosque nativo en los Andes. Bill Gladstone y yo (Gladstone y Ledig, 1990) presentamos las diferentes maneras en que la silvicultura intensiva ha beneficiado la conservación mediante el aumento en productividad forestal y en el número de empleos. El manejo forestal debe ser parte de cualquier solución a la conservación de la diversidad biológica en general y de los recursos genéticos en particular.

La conservación de recursos genéticos puede ser efectiva a pesar de que se utilice regeneración artificial, si seguimos una regla sencilla: replantar con la fuente local de semilla. La semilla local puede significar la semilla del rodal que se está cosechando, como lo sugerí cuando propuse la creación de Unidades de Manejo de Recursos Genéticos (UMRG), o podría tener una definición más amplia (Ledig, 1988). M. T. Conkle analiza y discute el problema de cómo definir “zonas locales de semilla” en su documento presentado en este volumen. Además de la posible reducción en productividad que resulta del uso de fuentes de semilla no adaptadas, la contaminación de recursos genéticos locales también puede ser un problema. La migración de polen de plantaciones no adaptadas hacia el bosque natural podría incidir negativamente sobre los recursos genéticos mediante depresión exogámica. Independientemente de los límites que se utilicen para zonificar el movimiento de semilla, las fuentes de abastecimiento de semilla se pueden proteger mediante la creación de áreas de producción de semilla (Figura 4). Las áreas de producción de semilla también aumentan la eficiencia de la recolección y, si se seleccionan cuidadosamente, aseguran que la fuente de semilla contenga árboles superiores al promedio de la población.



Figura 4. Área de producción de semilla cerca de El Salto, Durango. Un rodal de árboles bien conformados de *Pinus cooperi* se aclaró para dejar los árboles mejor conformados, de mayor crecimiento, para estimular la producción de semilla y mejorar el acceso para la recolección de conos. Si se establecen suficientes áreas de producción de semilla se asegurará un abasto de semilla local de árboles superiores al promedio de la población.

Es importante reducir la autofecundación y promover la polinización cruzada en las áreas de producción de semilla; Basilio Bermejo y Glenn Furnier presentan en este volumen algunas de las técnicas utilizadas para cuantificar el sistema de apareamiento y controlar el grado de autofecundación. La genética de poblaciones tiene un papel importante en la selección y manejo de áreas de producción de semilla.

En resumen, el uso de un manejo y una silvicultura apropiados, es la clave para la conservación de recursos genéticos en el manejo forestal. De hecho, parte de lo que yo he discutido en párrafos anteriores se podría categorizar como conservación *in situ*.

Conservación *in situ*

Las medidas de conservación que se discuten en este Seminario pueden clasificarse como *in situ* y *ex situ*. *In situ* significa “en el lugar” o “en la posición natural” y *ex situ* significa “fuera de la posición natural”. Los dos métodos tienen su papel y deberían emplearse como partes integrales de una estrategia de conservación.

Los métodos *in situ* se asocian frecuentemente con reservas estrictas; por ejemplo, reservas que protegen el bosque de cualquier uso extractivo. Si el manejo de los recursos genéticos es el objetivo, la conservación *in situ* tiene la ventaja teórica de permitir el cambio evolutivo -- una conservación dinámica a diferencia de la situación estática en la mayoría de las aplicaciones de métodos de conservación *ex situ*. El diseño de un sistema de reservas (por ejemplo: número, tamaño y distribución de reservas) debe tomar en cuenta las características de la historia biológica de las especies en cuestión, la estructura de sus poblaciones, su biología reproductiva y su ecología. Basilio Bermejo y Glenn Furnier describen estos temas, particularmente los aspectos de genética de poblaciones, en sus documentos.

De hecho, las reservas estrictas, tales como los parques nacionales en los Estados Unidos, pueden tener un valor limitado para la conservación de recursos genéticos a menos de que sean lo suficientemente grandes. Muchas especies son típicas de etapas tempranas en la sucesión, forman rodales coetáneos, y no se reemplazan a sí mismos, excepto como resultado de perturbaciones catastróficas, por ejemplo, el caso de las especies de *Populus*. El término actual para la descripción del proceso migración de especies en espacio y tiempo es “dinámica de manchones”. El manejo puede crear condiciones que reduzcan el elemento de aleatoriedad y fomenten el reemplazo de especies deseadas. Por lo tanto, los bosques manejados pueden ser una mejor alternativa de conservación de recursos genéticos *in situ* que las reservas estrictas, aunque esto no significa que las reservas estrictas no tienen su propio valor.

En California, C. I. Millar y R. W. Westfall trabajan con el grupo de bosques nacionales para establecer Unidades de Manejo de Recursos Genéticos (UMRG). En éstas, se permite la cosecha de madera, siempre y cuando se realice en una forma que garantice la protección y perpetuación de los recursos genéticos. El sistema silvícola de cortas de protección es un método de regeneración que permite la cosecha de madera y tiene efectos colaterales mínimos sobre los recursos genéticos.

Conservación *ex situ*

La conservación *ex situ* puede hacerse de muchas formas, tales como bancos de germoplasma, archivos genéticos en campo y almacenamiento de tejidos en instalaciones especiales. Los bancos de semilla son los conductos más familiares para este tipo de conservación. Especies forestales como los pinos tienen semilla que puede almacenarse por períodos largos, quizás un siglo, si se colecta en la etapa apropiada de maduración, se maneja cuidadosamente, se seca a un contenido de humedad bajo y se almacena a temperaturas bajas. El documento presentado por B. S. P. Wang y T. Beardmore menciona los bancos de semilla en forma detallada.

Sin embargo, otras taxa tienen semilla que es recalcitrante y no se almacena bien en el mejor de los casos. Estas especies pueden conservarse *ex situ* en archivos genéticos en el campo. En este caso, los bancos genéticos son simplemente plantaciones para conservar procedencias, familias, o clones específicos. Los ensayos de procedencias y las pruebas de progenie tradicionales pueden servir como archivos genéticos al mismo tiempo que como pruebas de evaluación. Los archivos o bancos clonales, igual que los huertos semilleros, también funcionan como bancos genéticos de campo. El documento de

Barry Jaquish aborda esencialmente el manejo de estos bancos de germoplasma en campo.

Actualmente se están desarrollando nuevas tecnologías para permitir el almacenamiento, a largo plazo, de tejidos, como es el caso de cultivos de callos o células en suspensión por períodos largos. Sin embargo, aún no se desarrollan las técnicas para muchas especies y las instalaciones son relativamente complejas y caras comparadas con aquellas que se utilizan en el almacenamiento de semilla.

Evaluación

Encerrar simplemente las semillas en un banco de germoplasma o establecer las reservas no es la meta final en la conservación de recursos genéticos. Eso sería algo similar a abastecer una biblioteca con libros pero sin crear nunca un catálogo de ellos o sin permitir que los libros se tomen de los estantes y se lean. Si la información no se puede almacenar y recuperar, o si nadie sabe que ésta existe, entonces el esfuerzo es prácticamente inútil por más que se proteja.

Los bancos de germoplasma de cultivos agrícolas están repletos de accesiones, algunas de las cuales deben duplicarse entre sí. El Laboratorio Nacional de Semilla de los Estados Unidos de América en Fort Collins, Colorado, tiene más de 46,000 accesiones de trigo únicamente; el Instituto Vavilov en Rusia tiene 63,000, y el Instituto Internacional de Investigaciones en Arroz en las Filipinas tiene 83,000 accesiones de arroz (Chang, 1989). Si existe la necesidad de localizar genes de resistencia para una plaga nueva, la selección (esto es, la evaluación) de estas colecciones gigantes es un problema importante (Spagnoletti y Qualset, 1993). La silvicultura ha seguido un modelo diferente. En el área forestal generalmente hemos comenzado con la evaluación, tales como los ensayos de procedencias, y es hasta ahora cuando se siente la necesidad de iniciar actividades de conservación más formales.

Las pruebas de procedencias y de progenie son ejemplos de lo que ahora se conoce también como estudios de ambiente uniforme o de ambiente común. En la práctica, nosotros hacemos el ambiente tan uniforme como sea posible por medio de prácticas de cultivo y luego acomodamos las procedencias o progenies de acuerdo con un diseño experimental aleatorizado. En este caso se busca eliminar la posibilidad de que el ambiente ocasione sesgos en la estimación de diferencias entre procedencias. El objetivo consiste en promediar a cero cualquier variación ambiental que no pueda controlarse; entonces, por convención, las diferencias restantes son de origen genético. El diseño de las pruebas de procedencias y progenies demanda tanto experiencia estadística como práctica.

Cuando los ensayos se repiten en varios sitios de plantación, la información se aumenta al máximo. Por ejemplo, Csaba Mátyás y Jay Kitzmiller analizaron una serie de ensayos de *Pinus ponderosa* en California y desarrollaron una imagen completa del desempeño de las procedencias en todo un gradiente altitudinal y latitudinal en la Sierra Nevada (Figura 5). Esto se llama la “norma de reacción”.

El documento de Jesús Vargas describe el diseño y análisis de este tipo de pruebas. Un punto importante a recordar es que estas pruebas, si se mantienen y protegen adecuadamente, son en sí mismas un mecanismo para la conservación *ex situ* de los recursos genéticos. Ellas pueden ser un medio para almacenar germoplasma durante un siglo o más, y en algunos casos estos ensayos son el único método de conservación *ex situ* actualmente disponible.

Además de los ensayos clásicos de procedencias y progenies, las técnicas fisiológicas y moleculares desarrolladas recientemente también contribuyen a nuestra capacidad para evaluar la variación genética. Realmente, los marcadores moleculares, tales como isoenzimas, polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP'S), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPDS), o las secuencias de ADN proporcionan medios para caracterizar el germoplasma, más que para evaluarlo.

Yo señalo caracterizarlo más bien que evaluarlo, porque comúnmente no sabemos el valor o el papel de estos marcadores en relación con características tales como velocidad de crecimiento y adaptabilidad de los árboles. No obstante, estos marcadores son valiosos en distinguir procedencias, progenies, e incluso individuos, y en proporcionar conocimiento sobre la historia evolutiva reciente.

Los estudios fisiológicos son valiosos para evaluar germoplasma en relación con factores como resistencia a la contaminación, resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia a sequía y a bajas temperaturas, tolerancia a la inundación y muchos otros factores. El documento de K. H. Johnsen y J. E. Major en este volumen discute el papel de estudios ecofisiológicos en la evaluación de germoplasma.

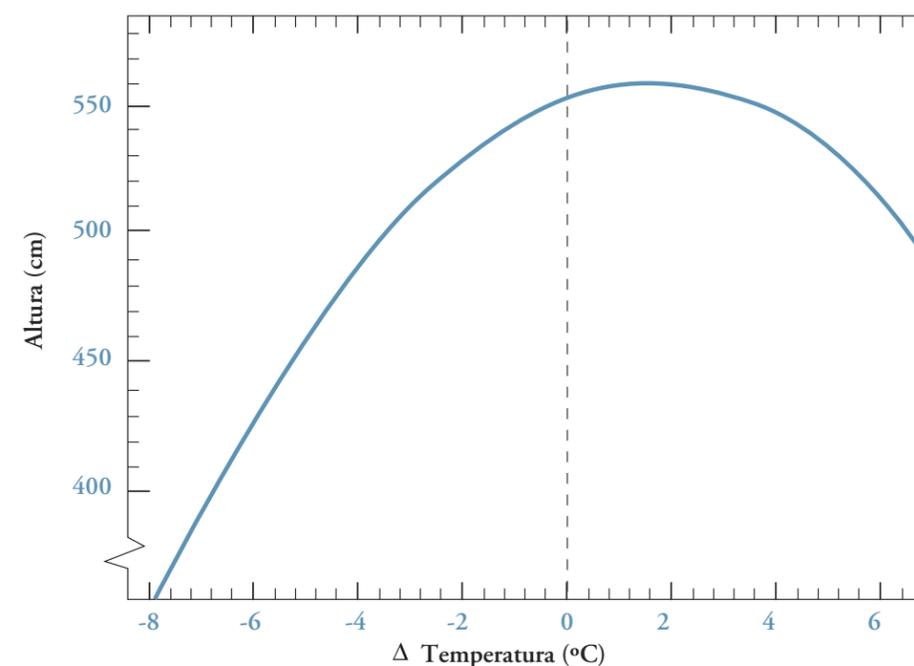


Figura 5. La altura de fuentes de semilla de *Pinus ponderosa* a los 12 años de edad en la Sierra Nevada de California depende de la diferencia entre la temperatura anual promedio en el sitio de plantación y en el sitio de origen de la semilla ($\text{Temp}_{\text{sitio de plantación}} - \text{Temp}_{\text{sitio de origen}}$), ilustrada en esta figura para un índice de sitio de 525 cm. La relación es análoga a una “norma de reacción” para la especie, y se puede aplicar en gradientes latitudinales o altitudinales, o en la escala de variación de micrositos locales para calcular la pérdida en crecimiento asociada con el traslado de semilla (C. Mátyás y J. H. Kitzmiller, análisis inédito).

La evaluación en sí misma crea otro problema, porque genera una gran cantidad de datos rápidamente. Las mediciones de altura, diámetro, fenología, floración, forma del tronco y otras características se deben almacenar en una forma fácilmente recuperable y capaz de análisis o reanálisis conforme aparecen nuevas preguntas o se generan otras técnicas estadísticas disponibles. Pero también deben almacenarse otros datos: los que corresponden al origen y la paternidad de los árboles en la prueba, de la ubicación del germoplasma entre y dentro de sitios de prueba, y de otros factores que Jay Kitzmiller describe en su escrito en este volumen. Obviamente, es necesario analizar cuidadosamente qué tipo de información se debe almacenar y cómo se utilizará dicha información, pero es difícil prever todo. La mejor decisión consiste en almacenar tanta información como sea posible en un formato flexible.

Utilización de recursos genéticos

El valor de los recursos genéticos se mide por el grado en que se usan. La mayoría de la gente piensa en el “uso” desde el punto de vista de cantidades medibles, como volumen de madera y toneladas de pulpa. Yo creo que la diversidad genética tiene valores filosóficos también, y que estos valores se pueden discutir desde el punto de vista de beneficios emocionales e intelectuales. Algunos conservacionistas incluso insistirían en que la diversidad tiene valores que no dependen para nada de un punto de vista antropogénico. Pero nuestro propósito en este Seminario-Taller es hablar de valores económicos básicos; esto es, valores relacionados con el aumento en el nivel de vida en una manera sustentable.

Así, el germoplasma en un banco de semillas o banco clonal tiene valor **potencial**, pero este valor se materializa únicamente cuando estos materiales se ponen en un uso productivo. Para hacer esto, los recursos genéticos algunas veces deben recombinarse en paquetes nuevos, y en todos los casos deben multiplicarse. Los bancos de germoplasma para la conservación de recursos genéticos nunca podrán almacenar el material suficiente para satisfacer todas las necesidades potenciales. Ese no es su propósito. De hecho, esperamos que las colectas del núcleo de conservación nunca se necesiten. Pero cuando es necesario regresar a nuestras colecciones de germoplasma, las semillas deben germinarse y cultivarse en viveros para producir plántulas, o se deben cosechar las semillas de bancos genéticos en el campo, o se deben propagar vegetativamente los clones por medio de enraizado de estacas.

La micropropagación ha extendido nuestra capacidad de multiplicar vegetativamente especies leñosas. La propagación vegetativa ofrece algunas ventajas que la propagación por semilla no tiene (Libby y Rauter. 1984). Un individuo particularmente valioso (un genotipo) puede multiplicarse directamente por propagación vegetativa, mientras que la reproducción sexual produce un conjunto de progenie que se parecerá a los padres pero, en general, retrocederá hacia la media de la población. El documento de María Magallanes aborda las técnicas de propagación clonal que abren posibilidades completamente nuevas para el uso de germoplasma forestal.

Por ahora, sin embargo, muchos de nuestros materiales seleccionados se propagarán por semilla. La calidad genética de esta semilla es importante y de hecho es el tema principal de este Seminario-Taller. Sin embargo, no podemos descuidar la influencia del ambiente al momento de utilizar los recursos genéticos forestales. En el pasado, éstos se han utilizado en una forma incorrecta. Un árbol es el resultado de una **interacción** entre el genotipo y el ambiente, un tema que se discute en el documento de Jim Jenkinson en este volumen. El Dr. Jenkinson recibió el prestigioso Premio Honorífico del U.S.D.A. y el Premio Francis H. Raymond por su trabajo sobre métodos óptimos de siembra, producción y extracción de planta por fuente de semilla y fechas de plantación adecuadas, como componentes clave del éxito en el establecimiento de plantaciones. Su trabajo condujo a ahorros de varios millones de dólares tan sólo en California. Su documento sobre la producción de planta en vivero es la culminación de por lo menos dos décadas de experiencia. Considerados en forma conjunta, todos estos documentos constituyen un libro sobre el manejo de recursos genéticos. Si se aplican correctamente, deben facilitar al lector definir la estrategia más adecuada y útil para conservar y usar la riqueza de recursos genéticos forestales de México para satisfacer sus esfuerzos de reforestación a largo plazo.

Literatura citada

- Anónimo. 1989. Mexico's natural resources reviewed. *ISTF News* (International Society of Tropical Foresters) 10(3): 2.
- Anónimo. 1993. Plantation area reviewed. *ISTF News* (International Society of Tropical Foresters) 14(3): 2.
- Anónimo. 1994. The demographic facts of life. *ZPG Reporter* (Zero Population Growth) 26(3): 3.
- Chang, T.T. 1989. The case for large collections, *In*: A.H.D. Brown, O.H. Frankel, D.R. Marshall, and J.T. Williams (eds.), *The use of plant genetic resources*. Cambridge University Press, Cambridge. pp: 123-135
- Farnsworth, N.R. and D.D. Soejarto. 1985. Potential consequences of plant extinction in the United States on the current and future availability of prescription drugs. *Economic Bot.* 39: 231-240.
- Gladstone, W.T. and F.T. Ledig. 1990. Reducing pressure on natural forests through high-yield forestry. *For. Ecol. Manage.* 35: 69-78.
- Kinloch, B.B. 1992. Distribution and frequency of a gene for resistance to white pine blister rust in natural populations of sugar pine. *Can. J. Bot.* 70: 1319-1323.
- Ledig, F.T. 1988. The conservation of diversity in forest trees. *BioScience* 38: 471-479.
- Ledig, F.T. 1991. The role of genetic diversity in maintaining the global ecosystem, *In*: *Proceedings of the Tenth World Forestry Congress, Paris, 1991*. Vol. 2 *Revue Forestière Française*, Nancy, France. pp: 71-78.
- Ledig, F.T. 1992. A comprehensive strategy for the conservation of forest genetic resources, *In*: *New horizons in agricultural sciences: Proceedings of the First International Symposium on the Development of Natural Resources and Environmental Preservation, October 13-18, 1992*. Institute of Natural Resources, Korea University, Seoul, Korea. pp: 325-344.
- Ledig, F.T. 1993. Secret extinctions: the loss of genetic diversity in forest ecosystems, *In*: M.A. Fenger, E.H. Miller, J.A. Johnson, E.J.R. Williams (eds.), *Our living legacy: Proceedings of a symposium on biological diversity*. Royal British Columbia Museum, Victoria, British Columbia. pp: 127-140.
- Ledig, F.T. and J.H. Kitzmiller. 1992. Genetic strategies for reforestation in the face of global climate change. *For. Ecol. Manage.* 50: 153-169.
- Libby, W.J. and R.M. Rauter. 1984. Advantages of clonal forestry. *For. Chron.* 60(3): 145-149.

- Little, E.L., Jr. 1979. Checklist of United States trees (native and naturalized). Agricultural Handbook No. 541, U.S.D.A., Forest Service, Washington, DC. 375 p.
- Naeem, S., L.J. Thompson, S.P. Lawler, J.H. Lawton, and R.M. Woodfin. 1994. Declining biodiversity can alter the performance of ecosystems. *Nature* 368: 734-737.
- Office of Technology Assessment. 1984. Technologies to sustain tropical forest resources. OTA-F-214. U.S. Congress, Office of Technology Assessment, Washington, DC. 344 p.
- Ortega y Gasset, J. 1914. *Meditaciones del Quijote*. Publicaciones Residencia de Estudios, series II, Vol. 1, Madrid.
- Reid, W.V. 1993. Bioprospecting: a force for sustainable development. *Environmental Sci. Technol.* 27: 1730-1732.
- Rocca Caliennes, L. 1985. Introducción de *Eucalyptus globulus* en la Sierra Peruana, *In*: R. Salazar (ed.), *Actas de los simposios sobre técnicas de producción de leña en fincas pequeñas y recuperación de sitios degradados por medio de la silvicultura intensiva*. CATIE, Turrialba, Costa Rica. pp: 153-160.
- Shoup, L.H. and S. Baker. 1981. Speed power, production, and profit: railroad logging in the Gooseneck District, Klamath National Forest 1900-1956. Prepared in fulfillment of U.S. Forest Service Contract No. 00-91W8-0-1911. Klamath National Forest, Yreka, California. 202 p.
- Spagnoletti Z., P.L. and C.O. Qualset. 1993. Evaluation of five strategies for obtaining a core subset from a large genetic resource collection of durum wheat. *Theor. Appl. Genet.* 87: 295-304.

2

MÉTODOS PARA MEDIR VARIACIÓN GENÉTICA EN LAS PLANTAS

Glenn R. Furnier

- Resumen
- Importancia de la variación genética
- Terminología genética
- Las fuerzas evolutivas
- Variación morfológica
- Marcadores genéticos moleculares
- Comparación entre métodos
- Implicaciones para el manejo de recursos genéticos

MÉTODOS PARA MEDIR VARIACIÓN GENÉTICA EN LAS PLANTAS

Glenn R. Furnier

Department of Forest Resources and Plant Biology, University of Minnesota,
1530 Cleveland Avenue N., St. Paul, Minnesota 55108-1027, E.U.A.

Resumen

La información sobre los niveles y patrones de variación genética es importante para la conservación y el manejo de los recursos genéticos. Existe una variedad de métodos para medir la variación genética en plantas, desde medidas de la morfología hasta marcadores genéticos moleculares, y cada método tiene ventajas y desventajas. Los métodos frecuentemente no nos dan resultados concordantes porque los patrones de la variación para marcadores moleculares generalmente están más influenciados por la deriva génica y el flujo génico, y los caracteres morfológicos están más influenciados por la selección natural. Cada carácter puede darnos información distinta con respecto a la conservación y el manejo de los recursos genéticos, por lo que la mejor estrategia es usar varios métodos.

Importancia de la variación genética

La biodiversidad del mundo es un producto de millones de años de evolución y las fuerzas evolutivas que nos han conducido al estado actual siguen operando y crearán la biodiversidad del futuro (o su ausencia). La biodiversidad está compuesta de los recursos genéticos del mundo y para manejarlos efectivamente tenemos que poder medir sus niveles y patrones de variación (Frankel 1983; Frankel *et al.* 1995). La mayor parte de la gente piensa que la biodiversidad es el número de especies (riqueza de especies) en un área, lo cual ciertamente es un componente muy importante de la variación, pero hay otros también. Una gran cantidad de la variación genética reside dentro de especies, entre y dentro de poblaciones. Los procesos evolutivos que moldean la variación dentro de especies son los mismos que crean la diversidad entre especies.

Los niveles de variación genética dentro de especies y poblaciones nos interesan en el manejo de recursos genéticos, porque la variación sirve como materia prima de la evolución y está relacionada con la habilidad de las poblaciones para adaptarse a cambios ambientales (Fisher 1930). Los patrones de variación dentro de especies nos interesan, ya que determinan la manera en que explotamos y conservamos estos recursos. Si hay pocas diferencias entre poblaciones, la pérdida de cualquier población no es tan grave debido a que no perdemos una unidad única genéticamente. Por otra parte, si las poblaciones son muy diferenciadas, cada una representa un recurso único y tendremos que mantener más poblaciones en programas de conservación y mejoramiento, algo que nos costará más.

Terminología genética

Empecemos con algunas definiciones de la terminología genética. Una población es un grupo de individuos que pueden entrecruzarse libremente. Es muy fácil definirla teóricamente, pero es muy difícil hacerlo en el campo porque normalmente no tenemos conocimiento de los patrones de apareamiento en la naturaleza. Un gen es un segmento de ADN que lleva la información necesaria para producir una proteína (y en unos casos ARN), la materia con la que están contruidos los organismos. Un alelo es la secuencia particular presente en un gen. Por ejemplo, hay alelos de genes en muchas plantas que codifican para resistencia a plagas o su forma alternativa, susceptibilidad. En un organismo, la suma de todos los genes es su genotipo y la apariencia física es su fenotipo, que está controlado por el genotipo y los efectos del ambiente. Por ejemplo, algunos genotipos producen una tasa de crecimiento alta y otros una tasa baja, pero si plantamos el genotipo de crecimiento rápido en un ambiente pobre con poca agua y pocos nutrientes, no va a crecer rápidamente.

Mayoritariamente, las plantas son diploides, lo cual quiere decir que tienen dos copias de cada gen, una de la madre y otra del padre. Si los alelos recibidos de los padres son iguales, el gen se llama homocigo y si son diferentes, se llama heterocigo. Los alelos de un heterocigo pueden interactuar de varias maneras. En algunos casos, el heterocigo tiene una morfología intermedia entre los dos homocigos. Puede ocurrir que una plántula sea homocigótica para un alelo no funcional. Si ese alelo produce una proteína esencial en la biosíntesis de clorofila, la plántula va a ser albina (y morirá poco después de la germinación), el homocigótico alternativo será verde (normal) y el heterocigótico será amarillo. En otros casos, un alelo es dominante sobre otro (el recesivo). El albinismo demuestra este tipo de interacción entre alelos en otras especies, en que un homocigo es albino, el otro verde y el heterocigo también es verde. Esto ocurre porque sólo una copia del alelo funcional es suficiente para producir una plántula normal.

Las fuerzas evolutivas

Medir e interpretar los niveles y patrones de variación genética necesita un entendimiento de las fuerzas evolutivas que moldean la variación (Hartl y Clark. 1989; Molina. 1992). La primera fuerza evolutiva es la mutación, que es un cambio heredable en el ADN. Las mutaciones ocurren con una frecuencia baja, por lo cual es una fuerza relativamente poco importante en el corto plazo. Sin embargo, en el largo plazo es una fuerza muy importante porque es la fuente de toda variación genética.

La selección es la fuerza más conocida y es simplemente la reproducción diferencial de genotipos diferentes. Los genotipos con mayor adecuación son los que producen más progenie, pasando más copias de sus genes a las generaciones posteriores. Así, las frecuencias de sus alelos aumentan en la población y las

de otros con menor adecuación disminuyen. La selección puede diferenciar u homogeneizar poblaciones, dependiendo de la naturaleza del ambiente. Si las poblaciones se encuentran en ambientes diferentes, van a diferenciarse, y si están en ambientes muy parecidos, la selección puede actuar para homogeneizarlas.

El flujo génico (migración) es el movimiento de alelos de una población a otra. En plantas, éste ocurre por medio del movimiento de polen y semillas entre poblaciones. El efecto de flujo génico es hacer las dos poblaciones más parecidas. El flujo génico también puede ocurrir entre especies por medio de hibridación, seguido por cruces entre el híbrido y una o ambas de las especies paternas (introgresión).

La deriva génica es un proceso aleatorio que es particularmente importante en poblaciones pequeñas. Consideremos una botella grande llena de canicas, la mitad rojas y la otra mitad blancas. No nos sorprendería si escogiéramos 100 canicas y 50, 53 o aun 60 fueran rojas. Por otra parte, si hubiéramos escogido 0 ó 100 canicas rojas, estaríamos muy sorprendidos o sospecharíamos que no escogimos las canicas al azar. Ahora, si escogiéramos sólo cinco canicas de la botella y obtuviéramos 0 ó 5 canicas rojas, no nos sorprendería mucho. En muestras pequeñas, los procesos aleatorios tienen un efecto mucho más fuerte. El proceso de reproducción de los organismos vivos es muy parecido al ejemplo de la botella con canicas. En cada generación muestreamos alelos del pozo de todos los alelos para constituir la próxima generación. Si tomamos una muestra pequeña, la próxima generación puede ser muy diferente de la anterior, debido a los procesos aleatorios. En el caso extremo, la población puede perder un alelo y así la deriva génica puede causar la pérdida de variación genética. Debido a que la deriva es un proceso aleatorio, el resultado no es el mismo en cada población y así puede causar la diferenciación entre poblaciones.

Otro ejemplo de deriva génica es el efecto fundador. Si una nueva población está fundada por pocos individuos y, debido a los procesos aleatorios, estos fundadores no son representativos de la población de donde vienen, entonces la nueva población que fundan será diferente de la población original. Estas diferencias se mantendrán a menos que estén cambiadas por la evolución.

El sistema de entrecruzamiento es otra fuerza importante. No cambia las frecuencias alélicas, pero la recombinación durante el ciclo sexual puede generar una gran cantidad de variación al crear nuevas combinaciones de alelos en los individuos. Por ejemplo, con sólo diez genes y dos alelos por gen, el número posible de genotipos es 59049. La endogamia es el entrecruzamiento entre individuos relacionados y disminuye mucho el gran poder de recombinación. En muchas especies que normalmente practican entrecruzamiento, la endogamia puede causar la pérdida de vigor (depresión endogámica) (Hartl y Clark. 1989). La mayoría de los individuos normalmente tiene algunos alelos recesivos deletéreos, pero estos alelos no tienen ningún efecto porque los individuos son heterocigóticos a estos genes. Sin embargo, la endogamia aumenta la frecuencia de homocigos y así produce más individuos con dos copias de un alelo recesivo deletéreo. Esto puede ser un problema, particularmente en poblaciones pequeñas donde es menos probable encontrar una pareja no relacionada. Sin embargo, hay muchas especies de plantas que se reproducen exclusivamente por autofertilización, la forma más extrema de endogamia, sin ninguna pérdida aparente de vigor. Esto probablemente es el resultado de una larga historia de selección que ha eliminado la gran parte de los alelos recesivos deletéreos de la especie.

Variación morfológica

Cuando vemos una planta, vemos su fenotipo, que es el resultado de la interacción entre genotipo y ambiente. Este mismo genotipo puede producir fenotipos diferentes cuando se encuentra en ambientes distintos (por ejemplo, un sitio rico en nutrientes vs. uno pobre en nutrientes). Por eso, cuando vemos dos individuos de la misma especie que se encuentran en dos sitios distintos, es difícil decir

qué tan diferentes son genéticamente porque esto está confundido con diferencias ambientales entre los sitios. Esto puede ocurrir aun dentro de un sitio donde hay diferencias microambientales muy sutiles. La variación que vemos entre poblaciones es debida en parte a diferencias genéticas y en parte a diferencias ambientales. Normalmente no sabemos las contribuciones relativas de los dos factores y esto es el gran reto que nos enfrenta en nuestro intento de medir los niveles y patrones de variación genética.

La manera más fácil de medir los niveles y patrones de variación genética es medir directamente la morfología en el campo. Simplemente medimos uno o más caracteres en el campo y analizamos la variación. Este método es relativamente barato, rápido y sencillo, pero sufre del problema mencionado anteriormente, de que la variación genética está confundida con la variación ambiental. Sin embargo, hay algunos caracteres que son poco afectados por el ambiente. Un ejemplo es el color de las flores en muchas especies, en las cuales un genotipo va a producir flores de un cierto color insensible a su ambiente. En este caso, podemos medir directamente en el campo los niveles y patrones de variación genética. Desafortunadamente, hay relativamente pocos caracteres con herencia sencilla y poco afectados por el ambiente.

Muchos caracteres de gran importancia adaptativa, como tasas de crecimiento o reproducción, están afectados fuertemente por el ambiente. Es mucho más difícil medir variación genética de estos caracteres porque no podemos simplemente medir el carácter en el campo con la confianza de que estamos midiendo solamente la variación genética. Una opción que tenemos es plantar genotipos diferentes (por medio de semillas o propágulos vegetativos) en un solo sitio con un ambiente uniforme. Así, todos los genotipos experimentan el mismo ambiente y cualquier diferencia que vemos entre las plantas se debe sólo a diferencias genéticas. Tales estudios de jardín común nos han revelado mucha información sobre los niveles y patrones de variación genética en las plantas.

Un ejemplo de un estudio de jardín común es el trabajo reciente de Rehfeldt (1993) sobre patrones de variación genética en *Pinus ponderosa*, *P. arizonica* y *P. engelmannii* en Arizona y Nuevo México y el sur de los estados de Colorado y Utah. Rehfeldt colectó semillas de diez árboles de cada una de las 97 poblaciones (95 de *P. ponderosa* y una de cada una de las otras especies). Las semillas fueron sembradas y las plántulas crecidas hasta los cuatro años en jardines comunes en tres sitios distintos. Midió una variedad de caracteres, incluyendo altura, diámetro y mortalidad en cada año, las fechas de comienzo y terminación del crecimiento, el largo y ancho de las hojas y el color del tallo. En un análisis de varianza, observó diferenciación significativa entre poblaciones para 27 de los 28 caracteres analizados. Para diez caracteres, las diferencias entre poblaciones representaron más de 40% de la variación total (72% para un carácter). Las regresiones demostraron una relación significativa entre varios de estos caracteres y variables ambientales, como latitud, longitud y altitud de los sitios donde colectó las semillas. Estas relaciones sugieren que la selección tiene un papel muy importante en determinar los patrones de variación genética de *P. ponderosa* en esta región. También encontró evidencia para introgresión entre *P. ponderosa* y *P. arizonica* en una población.

Marcadores genéticos moleculares

En los últimos 25 años ocurrieron muchos desarrollos nuevos en la biología molecular, y muchos de ellos han sido muy útiles para gente que trabaja en genética poblacional, evolución, biología de la conservación y mejoramiento de plantas (Avice. 1994; Clegg. 1989; Schaal *et al.* 1991). Estos avances nos permiten medir directamente la variación al nivel de proteínas y de ADN. El método de las “huellas digitales” del ADN probablemente es el más conocido por el público, pero hay otros también.

Las isoenzimas son los marcadores moleculares más usados (Wendel y Weeden. 1989). Uno simplemente colecta el tejido de la planta de interés, lo muele en un buffer, pone el extracto en un gel (de almidón, poliacrilamida o acetato de celulosa) y aplica una corriente eléctrica al gel. Las proteínas migran por el gel a tasas diferentes, según sus tamaños y cargas. Después uno puede teñir el gel con una tinción específica para una proteína y ver las diferencias entre individuos en la tasa de migración de esa proteína. Las diferencias observadas se deben a diferencias en la secuencia de aminoácidos de las proteínas, que tienen su raíz en diferencias en las secuencias del ADN. Estas diferencias en tasas de migración de las proteínas raramente están afectadas por el ambiente del sitio en donde las plantas están colectadas. Así podemos medir directamente la variación genética sin tener que plantar un jardín común.

Más recientemente hubo un desarrollo de métodos que nos permiten observar directamente diferencias entre plantas al nivel del ADN, lo cual nos ha dado la oportunidad de ver la variación en su origen (Avice. 1994; Clegg. 1989; Schaal *et al.* 1991). Estos análisis incluyen análisis de la variación en la longitud de fragmentos de restricción del ADN (RFLP por sus siglas en inglés, “Restriction Fragment Length Polymorphism”) y variación en fragmentos de ADN amplificados al azar (RAPD por sus siglas en inglés, “Randomly Amplified Polymorphic DNA”). Estos métodos involucran la extracción del ADN de la planta, su tratamiento con enzimas y la separación de los fragmentos de ADN por tamaño en un gel. Debido al hecho de que medimos directamente variación al nivel del ADN, no nos preocupan los efectos del ambiente.

Hay muchos modelos evolutivos que consideran datos de genes individuales (Avice. 1994; Hartl y Clark 1989; Molina Galán. 1992; Weir. 1990) y marcadores genéticos moleculares y caracteres morfológicos con herencia sencilla (por ejemplo, color de la flor) proveen este tipo de información. Es mucho más difícil analizar datos cuantitativos (por ejemplo, altura) con estos modelos porque normalmente no sabemos el número de genes que controlan estos caracteres y por eso no podemos especificar precisamente el genotipo. Marcadores con herencia sencilla y sin dominancia (por ejemplo, isoenzimas, RFLP y algunos marcadores moleculares) también nos permiten estimar los niveles de endogamia en poblaciones naturales.

Estimamos mejor los niveles y patrones de variación genética cuando muestreamos más caracteres. El número de caracteres morfológicos con herencia sencilla que no son afectados por el ambiente es relativamente pequeño. Por otra parte, normalmente es posible muestrear 10-35 isoenzimas y dicho número está limitado principalmente por la cantidad de enzimas para las cuales tenemos tinciones. El número de marcadores de ADN disponible es mucho mayor, siendo sólo limitado por el tiempo y dinero que tiene el investigador. Esta ventaja tiene un costo mayor en dinero y tiempo, pero el rápido desarrollo de las técnicas en biología molecular podría eliminar este problema.

Los marcadores genéticos moleculares generalmente no están muy afectados por la selección. De vez en cuando encontramos un marcador molecular con una gran importancia adaptativa, como una mutación que elimina la función de una enzima necesaria, pero en la gran mayoría de los casos hay muy poca diferencia en la adecuación entre los alelos alternativos. Por eso, los marcadores genéticos moleculares generalmente no demuestran una fuerte asociación con las variables del ambiente del sitio donde las plantas fueron colectadas. Como no están muy influenciados por la selección, estos marcadores son particularmente útiles para revelar los efectos de flujo génico y deriva génica. Si la diferenciación entre poblaciones ocurre principalmente debido a deriva génica y/o falta de flujo génico, es probable que lo vayamos a detectar con marcadores genéticos moleculares. Por otra parte, si la diferenciación entre poblaciones ocurre principalmente debido a la selección basada en diferencias ambientales entre los sitios, es poco probable que vayamos a ver mucha diferenciación con marcadores genéticos moleculares.

Comparación entre métodos

Los distintos métodos varían en el tiempo y dinero requerido y en la calidad de los datos. Podemos coleccionar datos morfológicos en el campo sin la necesidad de tener equipo caro o gente con mucha formación técnica, pero el número de caracteres que podemos muestrear genéticamente es limitado. Los estudios de jardín común tampoco requieren equipo caro y no es difícil coleccionar los datos, pero sí requieren el espacio y tiempo para crecer las plantas hasta que podamos medirlas. Los árboles son grandes y tienen vidas largas y por eso los estudios de jardín común son mucho más caros. También se necesitan semillas o propágulos vegetativos para estudios de jardín común, algo que puede ser difícil para algunas especies porque producen semillas infrecuentemente y no pueden ser propagadas vegetativamente. Sin embargo, estos estudios pueden darnos información muy valiosa sobre los patrones de variación adaptativa.

Obtener datos moleculares requiere equipo y reactivos más caros y técnicos bien formados, sin embargo, podemos coleccionar estos datos rápidamente (por ejemplo, sólo un día para isoenzimas). Estos métodos no requieren la habilidad de propagar las plantas, sólo tenemos que coleccionar tejido. Los datos pueden darnos información muy valiosa con respecto a niveles de flujo génico, deriva génica y endogamia, sin embargo, en muchos casos no nos revelan patrones de variación adaptativa.

No debemos esperar los mismos patrones de variación para cada carácter porque las fuerzas evolutivas actúan diferentemente entre caracteres (Endler, 1986). En algunos casos vemos diferencias entre los niveles y patrones de variación morfológica e isoenzimática y en otros casos no (Hamrick, 1989; Price *et al.* 1984). Las diferencias son menos pronunciadas en plantas que se autofertilizan porque la endogamia tiende a mantener ligamiento genético (asociaciones) entre caracteres y así el genotipo de un marcador molecular puede estar asociado con el genotipo de los genes que controlan un carácter morfológico (Brown y Burdon, 1987; Hamrick, *et al.* 1991; Price *et al.* 1984). Consideremos algunos ejemplos de comparaciones entre datos morfológicos e isoenzimáticos de especies arbóreas con altas tasas de entrecruzamiento.

Hay varios estudios sobre la variación genética en *Pseudotsuga menziesii* en una región de aproximadamente 200 km por 200 km en el suroeste de Oregon, E.U.A. Es una zona muy montañosa con una gran variación en temperatura, precipitación y duración de la temporada de crecimiento, debido a los gradientes de altitud, latitud y distancia del Océano Pacífico. Estudios de jardín común muestran diferencias genéticas muy significativas entre poblaciones en esta región para tamaño de semilla, tasa de germinación, tasa de crecimiento, fenología y el cociente tallo/raíz (Campbell, 1986, 1991; Sorensen, 1983). Esta variación genética está correlacionada con variables ambientales. Sin embargo, menos de 1% de la variación isoenzimática es debida a diferencias entre poblaciones, y esta poca diferenciación no muestra ninguna correlación con variables ambientales ni con distancia entre poblaciones (Merkle y Adams, 1987).

Otros estudios también han encontrado diferencias marcadas entre datos morfológicos e isoenzimáticos. En un estudio de 22 poblaciones de *Picea glauca*, sólo 3.8% de la variación isoenzimática fue atribuible a diferencias entre poblaciones, y el resto representó variación entre árboles dentro de poblaciones. Por otra parte, diferencias entre poblaciones representaron 48% de la variación en altura a los nueve años en un jardín común (Furnier, *et al.* 1991). En un estudio sobre toda la distribución geográfica de *Pinus contorta*, las diferencias entre poblaciones representaron 6% de la variación isoenzimática y 38% de la variación morfológica (Wheeler y Guries, 1982). Lund, *et al.* (1992) no encontraron diferencias significativas en frecuencias alélicas de isoenzimas entre nueve poblaciones de *Populus tremuloides* en Minesota, E.U.A. En la misma región, esta especie demuestra diferencias muy significativas entre

poblaciones para la tasa de crecimiento (Anderson, *et al.* 1990).

Es bastante fácil explicar la falta de concordancia entre los patrones de variación morfológica e isoenzimática. Caracteres como el tamaño de semilla, la tasa de crecimiento, las fechas de inicio y término del crecimiento vegetativo y el cociente tallo/raíz pueden afectar fuertemente la supervivencia y éxito reproductivo. Por eso, estos caracteres son de alta importancia adaptativa y probablemente están muy afectados por selección. En contraste, la selección casi no tiene un efecto diferencial entre los distintos alelos isoenzimáticos, lo que quiere decir que la sustitución de un alelo por otro no (o casi no) afecta la adecuación de la planta. Así, las fuerzas evolutivas probablemente están actuando de maneras distintas sobre los distintos caracteres. La poca diferenciación inter-específica para isoenzimas probablemente refleja niveles significativos de flujo génico entre poblaciones, algo esperado en árboles con polen dispersado por viento. A pesar de este flujo génico, la selección está diferenciando las poblaciones con respecto a caracteres morfológicos de importancia adaptativa.

La falta de concordancia entre los patrones de variación morfológica e isoenzimática no implica que una u otra es mejor. Ambos nos dan información útil. En los ejemplos previamente presentados, los datos isoenzimáticos nos dicen que hay niveles significativos de flujo génico entre poblaciones, algo que no queda muy claro en los datos morfológicos, los cuales nos dan información valiosa sobre la adaptación local, algo que no detectamos en los análisis isoenzimáticos.

Los marcadores de ADN apenas comienzan a ser usados como herramienta de la genética poblacional y por eso hay relativamente pocos estudios que directamente comparen estimaciones de variación genética obtenidas con ellos e isoenzimas. Estos estudios nos han dado resultados variables, con estimaciones de variación obtenidas con isoenzimas menores (Liu y Furnier, 1993; McGrath y Queiros, 1992; Messme, *et al.* 1991), iguales (Chase, *et al.* 1991; Liu y Furnier, 1993) o mayores (Brubaker y Wendel, 1993) que las de RFLP. Liu y Furnier (1993) encontraron niveles de variación relativamente similares para isoenzimas, RFLP y RAPD en *Populus tremuloides*, pero niveles mucho más altos para RAPD en *Populus grandidentata*. Estos resultados sugieren cautela en la comparación de estimaciones obtenidas para especies diferentes con marcadores diferentes.

Implicaciones para el manejo de recursos genéticos

Muchas especies arbóreas son de importancia porque tienen un valor económico, o son necesarias para la supervivencia de otras especies o su conservación frenaría el desarrollo económico. En estos casos quizá tendremos los recursos económicos para analizarlas genéticamente, pero nunca tendremos suficientes recursos para medir los niveles y patrones de variación genética en todas las especies. Por esto es importante sintetizar los datos existentes para ver lo que podemos inferir con respecto a especies para las cuales no tenemos datos genéticos.

Hamrick y sus colegas (Hamrick y Godt, 1989; Hamrick *et al.* 1991) han demostrado una correlación significativa entre los niveles y patrones de variación isoenzimática y una variedad de características de las especies, incluyendo estatus taxonómico, distribución, forma de vida, modo de reproducción, sistema de apareamiento, modo de dispersión de semillas y estatus sucesional. Estas relaciones nos dan la habilidad de predecir, pero todavía tenemos que proceder con cuidado porque también encontraron mucha variación no explicada por esas características.

Es bastante peligroso formular estrategias de manejo basadas en información incompleta, pero a veces tenemos que hacerlo. En los ejemplos previamente presentados, si hubiéramos usado sólo los datos isoenzimáticos, podríamos haber concluido que había poca diferenciación entre poblaciones y es por

eso que podríamos conservar la mayor parte de la variación genética en cada especie con una muestra de pocas poblaciones. Sin embargo, los datos morfológicos nos muestran que eso sería un gran error, porque hay mucha diferenciación adaptativa entre las poblaciones. La mejor opción para medir los niveles y patrones de variación genética es el uso de una combinación de métodos.

Agradecimientos

Les agradezco a Aída Castillo Flores y Luis Eguiarte Fruns por sus sugerencias sobre este manuscrito.

Literatura citada

- Anderson, N.A., D.W. French, G.R. Furnier, W.P. Hackett, and C.A. Mohn. 1990. A summary of aspen genetic improvement research at the University of Minnesota. *In*: R.D. Adams (ed.), Proceedings of Aspen Symposium '89. July 25-27, 1989, Duluth, Minnesota. U.S.D.A. Forest Service, General Technical Report NC-140. pp: 231-235.
- Avise, J.C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York. 511 p.
- Brown, A.H.D and J.J. Burdon. 1987. Mating systems and colonizing success in plants. *In*: A.J. Gray, M.J. Crawley, and P.J. Edwards (eds.), Colonization, succession and stability. Blackwell Scientific, Oxford. pp: 115-131.
- Brubaker, C.L. and J.F. Wendel. 1993. RFLP diversity in *Gossypium hirsutum* L. and new insights into the domestication of cotton. *Am. J. Bot.* 80 (suppl): 71.
- Campbell, R.K. 1986. Mapped genetic variation of Douglas-fir to guide seed transfer in southwest Oregon. *Silvae Genet.* 35: 85-96.
- Campbell, R.K. 1991. Soils, seed-zone maps, and physiography: guidelines for seed transfer of Douglas-fir in southwestern Oregon. *For. Sci.* 37: 973-986.
- Chase, C.D., V.M. Ortega, and C.E. Vallejos. 1991. DNA restriction fragment length polymorphisms correlate with isozyme diversity in *Phaseolus vulgaris* L. *Theor. Appl. Genet.* 81: 806-811.
- Clegg, M.T. 1989. Molecular diversity in plant populations. *In*: A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Khaler, and B.S. Weir (eds.), Plant population genetics, breeding, and genetic resources. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. pp: 98-115.
- Endler, J.A. 1986. Natural selection in the wild. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 336 p.

- Fisher, R.A. 1930. The genetical theory of natural selection. Clarendon Press, Oxford. 272 p.
- Frankel, O.H. 1983. The place of management in conservation. *In*: C.M. Schonewald-Cox, S.M. Chambers, B. MacBryde, and L. Thomas (eds.), Genetics and conservation. Benjamin-Cummings, Menlo Park, California. pp: 1-14.
- Frankel, O.H., A.H.D. Brown, and J.J. Burdon. 1995. The conservation of plant biodiversity. Cambridge University Press, Cambridge. 299 p.
- Furnier, G.R., M. Stine, C.A. Mohn, and M.A. Clyde. 1991. Geographic patterns of variation in allozymes and height growth in white spruce. *Can. J. For. Res.* 21: 707-712.
- Hamrick, J.L. 1989. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. *In*: D.E. Soltis and P.S. Soltis (eds.), Isozymes in plant biology. Dioscorides Press, Portland, Oregon. pp: 87-105.
- Hamrick, J.L. and M.J.W. Godt. 1989. Allozyme diversity in plant species. *In*: A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler, and B.S. Weir (eds.), Plant population genetics, breeding, and genetic resources. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. pp: 43-63.
- Hamrick, J.L., M.J.W. Godt, D.A. Murawski and M.D. Loveless. 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. *In*: D.A. Falk and K.E. Holsinger (eds.), Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press, New York. pp: 75-86.
- Hartl, D.L. and A.G. Clark. 1989. Principles of population genetics, second edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 682 p.
- Liu, Z. and G.R. Furnier. 1993. Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. *Theor. Appl. Genet.* 87: 97-105.
- Lund, S.T., G.R. Furnier, and C.A. Mohn. 1992. Isozyme variation in quaking aspen in Minnesota. *Can. J. For. Res.* 22: 521-524.
- McGrath, J.M. and C.F. Queiros. 1992. Genetic diversity at isozyme and RFLP loci in *Brassica campestris* as related to crop type and geographical origin. *Theor. Appl. Genet.* 83: 783-790.
- Merkle, S.A. and W.T. Adams. 1987. Patterns of allozyme variation within and among Douglas-fir breeding zones in southwest Oregon. *Can. J. For. Res.* 17: 402-407.
- Messmer, M.M., A.E. Melchieger, M. Lee, W.L. Woodman, E.A. Lee, and K.R. Lamkey. 1991. Genetic diversity among progenitors and elite lines from the Iowa Stiff Stalk Synthetic (BSSS) maize populations: comparisons of allozyme and RFLP data. *Theor. Appl. Genet.* 83: 97-107.

- Molina G., J.D. 1992. Introducción a la genética de poblaciones y cuantitativa. AGT Editor, México, D.F. 349 p.
- Price, S.C., K.N. Schumaker, A.L. Kahler, R.W. Allard, and J.E. Hill. 1984. Estimates of population differentiation obtained from enzyme polymorphisms and quantitative characters. *J. Heredity* 75: 141-142.
- Rehfeldt, G.E. 1993. Genetic variation in the Ponderosae of the Southwest. *Am. J. Bot.* 80: 330-343.
- Schaal, B.A., W.J. Leverich, and S.H. Rogstad. 1991. A comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology. *In: D.A. Falk and K.E. Holsinger (eds.), Genetics and conservation of rare plants.* Oxford University Press, New York. pp: 123-134.
- Sorensen, F.C. 1983. Geographic variation in seedling Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) from the western Siskiyou Mountains of Oregon. *Ecology* 64: 696-702.
- Weir, B.S. 1990. Genetic data analysis. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Wendel, J.F. and N.F. Weeden. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. *In: D.E. Soltis and P.S. Soltis (eds.), Isozymes in plant biology.* Dioscorides Press, Portland, Oregon. pp: 87-105.
- Wheeler, N.C. and R.P. Guries. 1982. Population structure, genic diversity, and morphological variation in *Pinus contorta* Dougl. *Can. J. For. Res.* 12: 595-606.

3

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA EN POBLACIONES DE ÁRBOLES FORESTALES

Basilio Bermejo-Velázquez

Introducción

Estimaciones de los niveles de variación

Distribución de la variación entre y dentro de poblaciones

El sistema de apareamiento y las estimaciones de la tasa de cruzamiento

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA EN POBLACIONES DE ÁRBOLES FORESTALES

Basilio Bermejo-Velázquez

Centro de Genética Forestal, A.C. Km. 3 Carr. Chapingo-Tequexquinahuac, Chapingo, Estado de México. C.P. 56230 y División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 33.5 Carr. México-Texcoco. Chapingo, Estado de México. C.P. 56230

Introducción

Las técnicas de isoenzimas proveen una metodología rápida para determinar la variación genética en un amplio rango de especies de plantas y animales (Avice. 1975; Gottlieb. 1977; Soltis *et al.* 1983; Weeden y Wendel. 1989). Los estudios sobre polimorfismos de proteínas en árboles forestales se incrementaron notablemente durante la última década, y la cantidad de especies estudiadas, especialmente coníferas, alcanza un número mayor de 100 (Adams. 1983; Mitton. 1983; Muona. 1990).

Los estudios de isoenzimas en árboles forestales han incluido principalmente comparaciones de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones a través de grandes distancias geográficas (Yeh y El-Kassaby .1980; Wheeler y Guries. 1982; Furnier y Adams. 1986; Merkle y Adams. 1987; Li y Adams. 1988), comparaciones de la estructura genética entre especies (Guries y Ledig. 1982; Wheeler *et al.* 1983; Boyle y Morgenstern. 1987), y la determinación de la subestructura de la población a través de distancias microespaciales (Guries y Ledig. 1977; Yeh y O'Malley. 1980; Linhart *et al.* 1981; Ledig y Conkle. 1983).

Estimaciones de los niveles de variación

Las isoenzimas son los marcadores utilizados con más frecuencia para estimar los niveles de variación dentro de las poblaciones. Los parámetros más comúnmente utilizados para evaluar la variación intrapoblacional son el porcentaje de loci polimórficos, el número de alelos por locus, el número efectivo de alelos por locus, y la proporción media de loci heterocigotos por individuo. Este último parámetro es la media esperada de heterocigocidad, suponiendo equilibrio de Hardy-Weinberg. Otros estadísticos que también se utilizan son el número de alelos por locus polimórfico, la proporción observada de loci heterocigotos por individuo, y una medida de diversidad genética.

Los niveles de variación aloenzimática intrapoblacional han sido sujetos de varios tratados por diversos científicos (Brown, 1979; Hamrick *et al.* 1979; Gottlieb, 1981). Aunque cada uno de estos autores utilizó diferentes criterios en sus estudios, las conclusiones generales son similares; estableciendo que las especies de plantas, por lo general, mantienen relativamente las cantidades más altas de variación aloenzimática dentro de poblaciones. En su revisión de más de 100 especies, Hamrick *et al.* (1979) encontraron que, en promedio, las especies de plantas tienen 37% de sus loci polimórficos, 1.69 alelos por locus y una media de heterocigocidad por individuo de 0.141.

Los mismos autores señalan que la considerable heterogeneidad entre especies ocurre también en los niveles de variación dentro de la población. Por otra parte, mencionan que esta variación se encuentra asociada a diversas características del ciclo de vida y ecológicas de las especies (Cuadro 1). Por lo anterior, especies que tienen una amplia dispersión, una alta longevidad, principalmente por polinización cruzada por el viento, altas fecundidades y que se encuentran en estados tardíos de la sucesión vegetal, mantienen por lo general mayores niveles de variación intrapoblacional que las especies que tienen otras combinaciones de características.

Cuadro 1. Relaciones entre las características del ciclo de vida y la variación genética detectable electroforéticamente dentro de las poblaciones de plantas (tomado de Hamrick *et al.* 1979).

Altos niveles de variación	Bajos niveles de variación
Gimnospermas	Dicotiledóneas
Distribución regional	Endémicas
Perennes alta longevidad	Bianuales
Principalmente de polinización cruzada	Principalmente autopolinizadas
Polinizadas por el viento	Autopolinización
Alta fecundidad	Moderada a baja fecundidad
Alto número de cromosomas	Bajo número de cromosomas
Estados tardíos de sucesión vegetal	Estados tempranos de sucesión vegetal

Otra de las principales tendencias encontradas en estos estudios es que las especies de árboles mantienen una mayor cantidad de variación dentro de las poblaciones que las especies de plantas herbáceas. En la actualidad, aunque los estudios de aloenzimas en especies de árboles todavía no son muy numerosos en comparación con otras especies de plantas, estos principios aún se mantienen vigentes. El Cuadro 2 compara los niveles de variación aloenzimática en 16 especies de árboles tropicales (Hamrick y Loveless, 1989) con aquellos encontrados en especies de coníferas y plantas herbáceas de angiospermas (Hamrick *et al.* 1979; Hamrick *et al.* 1981). Estas especies de árboles tropicales presentan un amplio

arreglo de polinización y mecanismos de dispersión de semillas, los cuales mantienen también mucha variación aloenzimática como las coníferas. Por lo tanto, esto apoya nuevamente la conclusión de que las especies de plantas leñosas mantienen en general mayor variación dentro de sus poblaciones que las especies de plantas herbáceas.

Grupo	No. de Taxa	Loci poli-mórficos (%)	No. de Alelos	Heterocigocidad media	Fuente
Árboles tropicales	16	60.9	--	0.211	Hamrick y Loveless, 1989
Árboles de coníferas	20	67.7	2.29	0.207	Hamrick <i>et al.</i> 1981
Dicotiledóneas	74	31.2	1.46	0.113	Hamrick <i>et al.</i> 1979
Todas las especies de plantas	113	36.8	1.69	0.141	Hamrick <i>et al.</i> 1979

Cuadro 2. Variación aloenzimática dentro de poblaciones en varios grupos de plantas.

Distribución de la variación entre y dentro de poblaciones

Desde el punto de vista evolutivo quizás ha sido más importante el estudio y la determinación de la distribución de la variación aloenzimática entre y dentro de poblaciones. Existen dos parámetros comúnmente utilizados para determinar la diferenciación de las poblaciones que se aplican a los datos de aloenzimas. El estadístico de Wright (1951) F_{ST} , el cual es una medida de varianza en las frecuencias de alelos entre poblaciones en relación con una varianza estandarizada, la cual se basa en la media de frecuencias de alelos ($F_{ST} = \sigma^2/pq$). Esta es calculada para cada uno de los alelos en un locus. El estadístico de diversidad génica de Nei (1973) también ha sido utilizado para la partición de la variación dentro y entre poblaciones. De la misma manera, el estadístico G_{ST} del mismo autor estima la diversidad génica debida a la variación entre poblaciones (D_{ST}) dividido por la diversidad total (H_T); $G_{ST} = D_{ST}/H_T$.

La distribución de la variación aloenzimática entre poblaciones es el producto de las interacciones entre varios factores evolutivos. Dentro de éstos, los de mayor importancia son la selección, el tamaño efectivo de la población, y la habilidad de las especies para dispersar su polen y sus semillas. En general, la selección debería incrementar la diferenciación en la población así como la deriva genética. Por lo anterior, especies con mayor movimiento de polen y de semillas tienen menos diferenciación que especies con flujo restringido de genes. Apoyando este argumento, Loveless y Hamrick (1984) encontraron que las especies de polícarpáceas de gran longevidad y comunes en los estados tardíos de sucesión tienen valores bajos de diferenciación génica o de G_{ST} (Cuadro 3). Estas especies son principalmente de polinización cruzada, monoicas, o dioicas y especies polinizadas por el viento; las especies de monocarpáceas anuales se encuentran en estados tempranos de la sucesión y tienen altas cantidades de diferenciación interpoblacional. Ellas son predominantemente autopolinizadas, polinizadas por pequeños insectos y tienen flores perfectas.

Cuadro 3. Relaciones entre las características del ciclo de vida y la variación detectable electroforéticamente entre poblaciones de plantas (tomado de Loveless y Hamrick, 1984).

Alta diferenciación	Baja diferenciación
Autógamas	Predominantemente alógamas
Hermafroditas	Monoicas o dioicas
Semillas dispersadas por gravedad	Semillas aladas y de estructura plumosa
Anuales	Gran longevidad
Monocarpáceas	Policarpáceas
Estados tempranos de sucesión vegetal	Estados tardíos de sucesión vegetal

Combinando el sistema de apareamiento con los mecanismos de polinización (Cuadro 4) esto da la mejor predicción acerca de la distribución de la variación aloenzimática. De esta manera, las especies autógamas y anuales tienen más de 50% de su variación entre poblaciones, mientras que las especies que son predominantemente alógamas y que son polinizadas por el viento, por ejemplo los árboles de las coníferas, tienen menos de 10% de su variación entre poblaciones. Los mecanismos de dispersión de las semillas deberían tener también similares efectos sobre la distribución de la variación genética.

Los patrones observados (Cuadro 4), aunque generalmente son consistentes con las predicciones (por ejemplo, especies con semillas dispersadas por gravedad tienen los valores más altos de G_{ST} y las especies cuyas semillas son dispersadas por el viento tienen los valores más bajos de G_{ST}), éstos no se relacionan directamente con aquellos derivados tomando en cuenta como criterio de clasificación la polinización. Las especies cuyas semillas son dispersadas por animales tienen valores altos de G_{ST} relativo a sus predicciones. Esto podría ser debido a dos factores al menos. Primero, las semillas ingeridas o transportadas por animales podrían no ser movidas a grandes distancias. Muchas semillas caen directamente abajo de la planta maternal, y a través del curso del tiempo, los mamíferos y pájaros que se alimentan de estas semillas pueden ser durante un período muy corto. Segundo, las semillas son frecuentemente depositadas a través de claros en el piso forestal. Este modelo de distribución por mosaicos, junto con la posibilidad de que las semillas que sean depositadas dentro de un mosaico o claro provengan todas de la misma planta maternal y, por lo tanto, estarían genéticamente emparentadas, conducen a una heterogeneidad genética entre mosaicos, lo cual explica que haya valores altos de G_{ST} .

Cuadro 4. La influencia de los sistemas de cruzamiento y los mecanismos de dispersión de las semillas en los niveles de diversidad genética entre poblaciones (tomado de Weeden y Wendel, 1989).

Característica	Número de estudios	Diversidad media entre poblaciones (G_{ST})
Sistema de cruzamiento		
Autógamas	39	0.523
Anuales	31	0.560
Perennes	8	0.329
Apareamiento mixto	48	0.243
Alógamas	76	0.118
Polinizadas por animales	32	0.187
Polinizadas por el viento	44	0.068
Mecanismos de dispersión de semilla		
Por gravedad	59	0.446
Transportadas por animales	18	0.398
Ingeridas por animales	14	0.332
Explosivas	24	0.262
Aladas/plumosas	48	0.079

Otro de los aspectos importantes en este tema de genética de poblaciones consiste en saber y determinar si los patrones de variación aloenzimática se encuentran asociados positivamente con los patrones de variación genética encontrados para otras características. Ya que los análisis de isoenzimas son relativamente baratos en términos de tiempo y en términos financieros, sería deseable predecir patrones de variación de características poligénicas con aquellos observados para características de aloenzimas. En la actualidad existen algunos estudios que comparan la variación aloenzimática con la morfométrica o con otro tipo de variación de características cuantitativas controladas genéticamente.

Los resultados de estos estudios no han producido de manera consistente una asociación positiva entre los diferentes tipos de características (Cuadro 5). Diez de las veinte comparaciones presentadas en el Cuadro 5 tienen asociaciones positivas entre los patrones de variación aloenzimática y la variación entre otras características cuantitativas, tres tienen resultados combinados, y en siete casos no existe asociación. Lewontin (1984) sugirió tomar con muchas reservas este tipo de comparaciones, ya que él demostró que para loci individuales que influyen sobre una característica cuantitativa, sería más difícil detectar las diferencias de las frecuencias de genes en loci individuales que para aquellas características cuantitativas cuando en éstas los genes varían entre poblaciones en la misma dirección. Por lo tanto, concluye que el patrón de variación aloenzimática no es el mismo que el patrón de variación de características cuantitativas y en este sentido ambos patrones no son comparables.

Cuadro 5. Comparaciones entre los niveles y patrones de variación aloenzimática y otros tipos de características controladas genéticamente. “+” = asociación encontrada; “-” = asociación no encontrada entre características (tomado de Weeden y Wendel, 1989).

Especie	Tipo de comparación	Asoc.	Fuente
<i>Avena barbata</i>	Aloenz./morfométrica	+	Price <i>et al.</i> 1984
<i>Avena barbata</i>	Aloenz./gene único	+	Price <i>et al.</i> 1985
<i>Avena barbata</i>	Aloenz./morfométrica	+	Hamrick y Allard. 1975
<i>Avena fatua</i>	Aloenz./gene único	+	Price <i>et al.</i> 1985
<i>Hawaiian bidens</i>	Aloenz./morfométrica	-	Helenurm y Ganders. 1985
<i>Clarkia williamsonii</i>	Aloenz./morfométrica	-	Price <i>et al.</i> 1984
<i>Clarkia williamsonii</i>	Aloenz./gene único	-	Price <i>et al.</i> 1985
<i>Hordeum jugatum</i>	Aloenz./morfométrica	+	Price <i>et al.</i> 1984
<i>Hordeum murinum</i>	Aloenz./morfométrica	-	Giles. 1984
<i>Hordeum spontaneum</i>	Aloenz./morfométrica	-	Brown <i>et al.</i> 1978
<i>Hordeum spontaneum</i>	Aloenz./morfométrica	+	Bekele. 1984
<i>Hordeum vulgare</i>	Aloenz./morfométrica	-	Price <i>et al.</i> 1984
<i>Hordeum vulgare</i>	Aloenz./ADN	+	Brown y Clegg. 1983
<i>Layia</i> spp.	Aloenz./morfométrica	+	Warwick y Gottlie. 1985
<i>Lisianthus skinneri</i>	Aloenz./ADN	+	Sytsma y Schaal. 1985
<i>Phlox Drummondii</i>	Aloenz./morfométrica	+	Levin. 1977
<i>Pinus contorta</i>	Aloenz./morfométrica	-	Wheeler y Guries. 1982
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Aloenz./morfométrica	+	El-Kassaby y Szikla. 1982
<i>Silene diclinis</i>	Aloenz./morfométrica	-	Prentice. 1984
<i>Trifolium hirtum</i>	Aloenz./morfométrica	+	Martins y Jain. 1980

El sistema de apareamiento y las estimaciones de la tasa de cruzamiento

El sistema de apareamiento determina la cantidad de apareamiento efectivo o fertilización que ocurre durante la formación de la semilla. El patrón resultante del apareamiento influye en varios aspectos de la arquitectura genética de una población, incluyendo las proporciones de genotipos, la distribución de la variabilidad genética y el grado al cual el genoma se encuentra organizado (Clegg, 1980; Ritland, 1983; Brown *et al.* 1989). El conocimiento del sistema de apareamiento tiene también importancia práctica en un programa de mejoramiento y en la práctica de la silvicultura, ya que la información sobre coancestría, variación en la fertilidad y migración natural en las poblaciones es importante en los sistemas de regeneración natural, en la planeación de conservación de genes y en el manejo de poblaciones de cruzamiento y producción (Cheliak *et al.* 1983; Neale y Adams, 1985).

Los árboles forestales poseen varias características que los hacen ser organismos atractivos para el estudio de los sistemas de cruzamiento, ya que tienen altos niveles de polimorfismo, producen un gran número de progenie por fuente maternal, y es relativamente fácil que esta progenie pueda ser colectada, almacenada y cultivada para subsecuentes análisis. Existen varios métodos que han sido utilizados para estudiar los sistemas de apareamiento de árboles forestales. Las primeras estimaciones de cruzamiento se basaron en las frecuencias de plántulas de fenotipos mutantes. Más recientemente, los estudios de variación aloenzimática usando modelos de un locus simple y multi-locus han sido utilizados con buenos resultados. En general, estas últimas estimaciones muestran que las poblaciones naturales de coníferas, especialmente los pinos, tienen altas tasas de cruzamiento (t), típicamente 90% o más; algunas excepciones incluyen a *Pinus radiata* con un valor medio de 0.74, *Pinus leucodermis* (0.77), *Pinus engelmannii* (0.73), y *Pinus maximinoi* (0.65) (Matheson *et al.* 1989; Morgante *et al.* 1991; Bermejo, 1992; Muona, 1990). El valor promedio (t) para el género *Picea* es de 0.88, mientras que las tasas de cruzamiento de *Pseudotsuga menziesii* son similares a aquellas encontradas en los pinos (Muona, 1990).

Las coníferas son particularmente convenientes para estudios de sistemas de apareamiento empleando aloenzimas, ya que el tejido del megagametofito haploide es genéticamente idéntico a la contribución del gameto materno en el embrión. Por lo tanto, comparando el fenotipo de las aloenzimas del megagametofito a aquel correspondiente del embrión, la contribución maternal en un locus dado puede ser inferida, y esta información podría entonces ser aplicada al sistema de apareamiento.

La variación en las tasas de cruzamiento ha sido estudiada en diferentes contextos (poblaciones naturales, huertos semilleros y varios rodales de bosque bajo tratamientos culturales). En diferentes especies, diversos estudios han demostrado la existencia de significativa heterogeneidad a través del tiempo y en el espacio. Moran y Brown (1980) estudiaron la variación temporal en las tasas de cruzamiento en la cosecha de semilla de tres años consecutivos en una población de *Eucalyptus delegatensis* y encontraron una significativa variación de año a año.

La variación geográfica en el sistema de apareamiento también ha sido detectada a través de transectos altitudinales para *Abies balsamea*: se tomaron muestras de la parte más baja, media y más alta de la pendiente de una montaña, lo cual produjo estimaciones heterogéneas de cruzamiento asociadas con la altitud y la densidad del rodal (Neale y Adams, 1985); similarmente, la tasa de cruzamiento varió entre poblaciones de *Eucalyptus oblicua* las cuales provinieron de diferentes áreas climáticas (Brown *et al.* 1975). Las tasas de autocruzamiento también pueden variar entre las diferentes partes de la copa de un árbol; por ejemplo, conos tomados de la parte más baja de la copa de Abeto Douglas parecen tener una proporción más alta de semillas autopolinizadas que aquellas que se encuentran localizadas en las partes más altas de las copas del árbol (Shaw y Allard, 1982). Por lo tanto, un número de factores biológicos y edáficos parece tener influencia en la tasa de cruzamiento de un año a otro en muchas especies.

Literatura citada

- Adams, W.T. 1983. Application of isozymes in tree breeding. *In*: S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds.), *Isozymes in plant genetics and breeding*. Elsevier, Amsterdam. pp: 382-400.
- Avise, J.C. 1975. Systematic value of electrophoresis data. *Syst. Zool.* 23: 465-481.
- Bermejo V., B. 1973. Genetic diversity and the mating system in *Pinus engelmannii* Carr. Ph.D. thesis. University of Wisconsin, Madison, Wisconsin. 91 p.
- Boyle, T.J.B. and E.K. Morgenstern. 1987. Some aspects of the population structure of black spruce in central New Brunswick. *Silvae Genet.* 36: 53-60.
- Brown. A.H.D. 1979. Enzyme polymorphism in plant populations. *Theor. Pop. Biol.* 15: 1-42.
- Brown, A.H.D., A.C. Matheson, and K.G. Eldridge. 1975. Estimation of the mating system for *Eucalyptus obliqua* L Herit. using allozyme polymorphisms. *Aust. J. Bot.* 23: 931-949.
- Brown, A.H.D., J.J. Burdon, and A.M. Jarosz. 1989. Isozyme analysis of plant mating systems. *In*: D.E. Soltis and P.S. Soltis (eds.), *Isozymes in plant biology*. Dioscorides Press Portland, Oregon. pp: 73-86.
- Cheliak, W.M., K. Morgan, C. Strobeck, F.C.H. Yeh, and B.P. Dancik. 1983. Estimation of mating system parameters in plant populations using the EM algorithm. *Theor. Appl. Genet.* 65: 157-161.
- Clegg, M.T. 1980. Measuring plant mating systems. *BioScience* 30: 814-818.
- Furnier, G.R. and W.T. Adams. 1986. Geographic patterns of allozyme variation in Jeffrey pine. *Am. J. Bot.* 73: 1009-1015.
- Gottlieb, L.D. 1977. Electrophoretic evidence and plant systematics. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 64: 161-180.
- Gottlieb, L.D. 1981. Electrophoretic evidence and plant populations. *Prog. Phytochem.* 7: 1-46.
- Guries, R.P. and F.T. Ledig. 1977. Analysis of population structure from allozyme frequencies. *In*: *Proceedings of the Fourteenth Southern Forest Tree Improvement Conference*, Gainesville, Florida, pp: 246-252.
- Guries, R.P. and F.T. Ledig. 1982. Genetic diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.). *Evolution* 36: 387-402.
- Hamrick, J.L. 1982. Plant population genetics and evolution. *Am. J. Bot.* 69: 1685-1693.
- Hamrick, J.L., Y.B. Linhart, and J.B. Mitton. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically-detectable genetic variation in plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 10: 173-200.
- Hamrick, J.L. and M.D. Loveless. 1986. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant population. *In*: A. Estrada and T.H. Fleming (eds.), *Frugivores and seed dispersal*. Dr. W. Junk Publishers, The Hague, Netherlands. pp: 211-223.
- Hamrick, J.L. and M.D. Loveless. 1989. The genetic structure of tropical tree populations: associations with reproductive biology. *In*: J.H. Bock and Y.B. Linhart (eds.), *Evolutionary ecology of plants*. Westview Press, Boulder, Colorado. pp: 129-146.
- Ledig, F.T. and M.T. Conkle. 1983. Gene diversity and genetic structure in a narrow endemic, Torrey pine (*Pinus torreyana* Parry ex Carr.). *Evolution* 37: 70-85.
- Lewontin, R.C. 1974. *The genetic basis of evolutionary change*. Columbia University Press, New York. 346 p.
- Lewontin, R.C. 1984. Detecting populations differences in quantitative characters as opposed to gene frequencies. *Am. Naturalist* 123: 115-124.
- Li, P. and W.T. Adams. 1989. Range-wide patterns of allozyme variation in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). *Can. J. For. Res.* 19: 149-161.
- Linhart, Y.B., K.B. Sturgeon, and M.L. Davis. 1981. Genetic variation in space and time in a population of ponderosa pine. *Heredity* 46: 407-426.
- Loveless, M.D. and J.L. Hamrick. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 15: 65-95.
- Matheson, A.C., J.C. Bell, and R.D. Barnes. 1989. Breeding systems and genetic structure in some Central American pine populations. *Silvae Genet.* 38: 107-113.
- Merkle, S.A. and W.T. Adams. 1987. Patterns of allozyme variation within and among Douglas-fir breeding zones in southwest Oregon. *Can. J. For. Res.* 17: 402-407.
- Mitton, J.B. 1983. Conifers. *In*: S.D. Tanksley and T.J. Orton, (eds.) *Isozymes in plant genetics and breeding*. Elsevier, Amsterdam. pp: 443-472.
- Moran, G.F. and A.H.D. Brown. 1980. Temporal heterogeneity of outcrossing rate in alpine ash (*Eucalyptus delegatensis* R. T. Bak.). *Theor. Appl. Genet.* 57: 101-105.
- Morgante, M., G.G. Vendramin, and A.M. Olivieri. 1991. Mating system analysis in *Pinus leucodermis* Ant.: detection of self-fertilization in natural populations. *Heredity* 67: 197-203.

- Muona, O. 1990. Population genetics in forest tree improvement. *In*: A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler, and B.S. Weir (eds.), Plant population genetics, breeding, and genetics resources. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. pp: 282-289.
- Neale, D.B. and W.T. Adams. 1985. Allozyme and mating system variation in balsam fir (*Abies balsamea*) across a continuous elevational transect. *Can. J. Bot.* 63: 2448-2453.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 70: 3321-3323.
- Ritland, K. 1983. Estimation of mating systems. *In*: S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds.), Isozymes in plant genetics and breeding. Elsevier, Amsterdam. pp: 289-302.
- Shaw, D.V. and R.W. Allard. 1982. Estimation of outcrossing rates in Douglas-fir using isozyme markers. *Theor. Appl. Genet.* 62: 113-120.
- Soltis, D.E., C.H. Haufler, D.C. Darrow and G.J. Gastony. 1983. Starch gel electrophoresis: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Am. Fern J.* 73:9-27.
- Weeden, N. and J. Wendel. 1989. Genetics of plants isozymes. *In*: D.E. Soltis and P.S. Soltis (eds.), Isozymes in plant biology. Dioscorides Press, Portland, Oregon. pp: 46-72.
- Wheeler, N.C. and R.P. Guries. 1982. Population structure, genic diversity, and morphological variation in *Pinus contorta* Dougl. *Can. J. For. Res.* 12: 595-606.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugenics* 15: 323-354.
- Yeh, F.C. and D.M. O' Malley. 1980. Enzyme variations in natural populations of Douglas-fir, (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) from British Columbia. I. Genetic variation patterns in coastal populations. *Silvae Genet.* 29: 83-92.
- Yeh, F.C. and Y.A. El-Kassaby. 1980. Enzyme variation in natural populations of Sitka spruce (*Picea sitchensis*). I. Genetic variation patterns among trees from 10 IUFRO provenances. *Can. J. For. Res.* 10: 415-422.

4

MANEJO DE GERMOPLASMA EN PROGRAMAS DE MEJORAMIENTO DE ÁRBOLES

Judy Loo

Conservación de recursos genéticos

Efectos de prácticas silvícolas sobre los recursos genéticos de árboles forestales

Conservación In situ y Ex situ

Muestreo de la diversidad genética

Estrategias para el manejo de germoplasma en programas de mejoramiento y cruzamiento de árboles

Bancos clonales y poblaciones de cruzamiento

Consideraciones sobre la distribución del material en las plantaciones

Estudios de caso: *Pinus radiata* y *Picea glauca* (poblaciones del Valle de Ottawa)

MANEJO DE GERMOPLASMA EN PROGRAMAS DE MEJORAMIENTO DE ÁRBOLES

Judy Loo

Atlantic Forestry Centre, Canadian Forest Service,
P.O. Box 4000, Fredericton, New Brunswick E3B 5P7, Canada

Conservación de recursos genéticos

En términos genéricos de dasonomía, la conservación se define frecuentemente como el “uso adecuado e inteligente”. Quizás en ninguna parte esta definición es más apropiada que dentro del contexto de los recursos genéticos forestales. Frankel (1983) definió los recursos genéticos como la diversidad genética que es real o potencialmente disponible al mejorador de plantas o animales, para recombinación y selección, y para una continua adaptación a cualquier ambiente cambiante físico, biológico y económico. Los recursos genéticos continuamente cambian, y por lo tanto nosotros no podemos y no debemos intentar preservar todas las combinaciones genéticas existentes. En lugar de lo anterior, el objetivo es la preservación del material evolutivo y del potencial adaptativo. El uso inteligente de los recursos genéticos significa que nosotros evitemos agotar la variabilidad natural existente, a un punto en el cual el potencial adaptativo de la población o especie se pierda.

Ledig (1986a) sugirió que la conservación podría ser un término pobre para el mantenimiento de los recursos genéticos, porque estos pueden ser utilizados sin sobre-explotarlos. Enfatizando, es importante reconocer que la “variabilidad” es el objetivo principal de la conservación y no “los genes individuales”. El descuido en el aprovechamiento de los recursos genéticos puede destruirlos. Por ejemplo, una significativa y extensiva explotación selectiva por un largo período podría haber degradado las poblaciones de *Pinus taeda* y *Pinus rigida* en la Costa Oeste de los Estados Unidos (Ledig 1986a). Por lo tanto, para especies comercialmente importantes, las buenas prácticas de silvicultura son el primer paso en la conservación de genes.

La conservación de recursos genéticos es un problema emergente a nivel mundial. La diversidad es importante como un fundamento para el cambio genético, a través de la adaptación natural o mejoramiento genético, constituyendo el ingrediente esencial que permite a la especie adaptarse a los ambientes cambiantes. Ledig (1986a) da tres razones para conservar los recursos genéticos:

1. Vulnerabilidad genética de los cultivos domesticados a plagas y clima.
2. Valor económico potencial, y
3. Pérdida de diversidad por extinción, la cual puede reducir la estabilidad de ecosistemas enteros.

Existe un amplio consenso de que la diversidad genética es necesaria para contrarrestar el riesgo de vulnerabilidad a plagas y factores adversos del ambiente. Cuando una plaga o patógeno nuevo aparece, los silvicultores pueden hacer poco o nada si una especie ya no tiene variantes preadaptadas disponibles para resistir la nueva amenaza (Ledig, 1986a). La conservación de recursos genéticos de valor económico potencial implica que nosotros deberíamos mirar más allá de las especies que son económicamente importantes ahora, considerando aspectos de manejo de germoplasma en programas de mejoramiento. Nadie puede predecir la importancia del potencial de recursos genéticos de una especie leñosa (Ledig, 1986a; Mosseler, 1992). Los recursos genéticos de especies no comerciales podrían, a largo plazo, ser importantes tanto como aquellos de especies comerciales. Los árboles son los componentes estructurales mayores de los ecosistemas forestales; por lo tanto, ellos constituyen los eslabones importantes sin los cuales los ecosistemas enteros podrían colapsarse.

La diversidad genética es típicamente mucho más alta en árboles que en plantas anuales. Ledig (1986b) estableció la hipótesis de que debido a que la diversidad genética deriva de mutaciones, los árboles tienen mayores cargas genéticas de alelos letales que otras especies, así como una mayor diversidad. Por lo tanto, la depresión genética podría influir negativamente en el sistema de cruzamiento en las plantas alógamas. La selección podría promover mecanismos de entrecruzamiento; no mantener la diversidad genética “*per se*” podría reducir la probabilidad de homocigocidad, promoviendo la abundancia de alelos recesivos deletéreos transportados por las poblaciones.

Los complejos de genes adaptados podrían ser objetivos importantes para esfuerzos de conservación de genes (Yang y Yeh, 1992). Esto es especialmente cierto si un objetivo de manejo forestal es mantener regenerado de manera natural un rodal nativo (Ledig, 1986a). Los complejos de genes pueden ser importantes para la supervivencia de poblaciones viables adaptadas a sus ambientes.

Efectos de prácticas silvícolas sobre los recursos genéticos de árboles forestales

Muchas prácticas del pasado y del presente podrían impactar negativamente a los recursos genéticos forestales. El ejemplo más extremo es la deforestación, permanente o temporal, en grandes extensiones de terreno. Las prácticas de cosechas forestales disgénicas fueron más prevalentes en el pasado que ahora, en muchas partes del mundo; sin embargo, los impactos todavía prevalecen en la actualidad (Buchert, 1994; Li *et al.* 1992). El cultivo de árboles forestales lleva por sí mismo una serie de problemas potenciales.

Jasso (1970) discutió la manera en que la reducción de la variabilidad genética, como un resultado de la deforestación, resulta en:

1. Eliminación de genotipos deseables (esto puede ser simplemente a través de la reducción del “pool” génico, así como también a través de prácticas intencionales de cosechas disgénicas.
2. Invasión de especies inferiores (en México esto significa *Quercus* en muchos casos).

3. Degradación de terrenos forestales, y

4. Creación de nuevas especies a través de hibridación.

Cuando un terreno forestal es desmontado para otros usos, las poblaciones, razas, o incluso especies pueden ser eliminadas. Jasso (1970) da varios ejemplos de especies de pinos que han sido genéticamente erosionadas, resultando en poblaciones de árboles de baja calidad. Como un resultado de las actividades de los últimos 25 años, otros ejemplos podrían indudablemente ser agregados a esta lista.

Ledig (1986b) señaló varias consecuencias potenciales del cultivo del bosque incluyendo reducción del tamaño de la población de especies forestales nativas, y una reducida migración entre áreas arboladas pequeñas y aisladas. En Norteamérica, la domesticación de árboles forestales está aún en sus primeros inicios. Cheliak (1988), El Kassaby (1992) y Skroppa (1994) discutieron los impactos de la domesticación temprana de especies de árboles de la región norte. Ellos concluyeron que la selección fenotípica tiene el potencial para reducir la diversidad genética en las poblaciones de cruzamiento, aunque dichos autores no estuvieron completamente de acuerdo sobre las implicaciones de tales reducciones. A la larga, debería esperarse un aumento en la carga genética de alelos letales, manifestándose genes recesivos deletéreos, lo cual podría reducir el vigor y la tasa reproductiva (Ledig, 1986b). Las poblaciones domesticadas pueden ser difíciles de mantener y podrían ser más susceptibles a agentes de estrés, ya sean bióticos o climáticos.

Es común para los mejoradores de árboles el punto de vista de que la contaminación genética de rodales naturales dentro de huertos semilleros es un problema. Sin embargo, la contaminación en sentido opuesto podría convertirse eventualmente en un problema más serio. Mucho del flujo de genes en el futuro podría venir probablemente del bosque comercial restringido genéticamente, el cual podría ser de alto vigor bajo condiciones de cultivo, pero no necesariamente adaptado a las condiciones naturales. Con la reducida capacidad reproductiva de algunas partes del bosque nativo, la contaminación podría impactar el “pool” génico nativo aún más.

Las estrategias de conservación de genes para árboles forestales difieren de las estrategias para cultivos agrícolas, debido a la longevidad de los árboles. Como Ledig (1986a) señaló, los genes pueden permanecer almacenados sobre la cepa o tocón de los árboles por largos períodos sin cambiar. Por lo tanto, la manera más factible para el manejo de recursos genéticos reside en cualquier lugar, entre “echar la llave” de los terrenos forestales remanentes y el manejo intensivo de las poblaciones “cautivadas”. La prescripción obvia de manejo es reducir la endogamia y promover la heterocigocidad, a través de mantener el tamaño de la población, promoviendo el entrecruzamiento y haciendo más disponible la migración entre poblaciones.

Conservación In situ y Ex situ

La conservación de los recursos puede lograrse por métodos *in situ* o *ex situ*, o una combinación de los dos. *In situ* significa que las poblaciones son conservadas o manejadas en su hábitat natural. Ejemplos de sitios de conservación *in situ* incluyen áreas manejadas a través de regeneración natural de especies nativas, así como también parques naturales y otras reservas protegidas. Algunas características de los métodos de conservación *in situ* son (Forest Genetic Resource Working Group, 1991):

1. Todas las clases de edad de las especies objetivo se mantienen dentro del ecosistema en el cual ellas evolucionaron.
2. El uso de la tierra de los sitios es limitado a aquellas actividades que no tendrían efectos detrimentales sobre las especies objetivo.

3. La regeneración de las especies objetivo ocurre sin la intervención humana, o la intervención se limita a prácticas de corto plazo diseñadas para disminuir los factores detrimentales.

Ex situ significa que el material genético es almacenado o manejado lejos de su hábitat natural. Ejemplos incluyen bancos de semillas, bancos clonales y ensayos de procedencias. A pesar de la percepción común, al contrario de lo que se piensa, el almacenamiento *ex situ* no es necesariamente estático. Como Ledig (1986a) enfatizó, los cambios pueden ocurrir dentro de la semilla o en el cultivo de tejidos. El período de viabilidad de la semilla almacenada es finito y actualmente mucha de la semilla se almacena con propósitos de forestación y reforestación a corto o mediano plazo (Forest Genetic Resource Working Group. 1991). En general, el almacenamiento de la semilla de un árbol tiene más problemas que la semilla de cultivos agrícolas. Es una práctica común para los encargados de bancos de semillas o conservadores de germoplasma, la rutina de poner a germinar partes de colecciones de semillas agrícolas para generar nuevo material para almacenamiento. El tiempo y espacio limita esta práctica en colectas de árboles forestales. Por otra parte, la presión de selección operando sobre las plántulas, las cuales son cultivadas para producir nuevo material para almacenamiento, son probablemente muy diferentes de las presiones de selección natural (Ledig. 1986a).

Una crítica común a la conservación *ex situ* es que ésta no permite la adaptación a las condiciones cambiantes de un ambiente natural (Yang y Yeh. 1992; Li *et al.* 1992; Ledig.1986a). Así como los ambientes cambian, podrían existir muy pocas y buenas oportunidades para preservar un conjunto de materiales adaptados para diversos ambientes para un tiempo actual. La conservación de recursos genéticos *in situ* es más realista en general que la preservación por métodos *ex situ*, porque la conservación *in situ* es compatible con algunos usos de los bosques (Forest Genetic Resource Working Group. 1991). Para muchas especies de árboles forestales, la protección *in situ* significa reservar áreas en las cuales se permite que la selección natural opere de manera única (Ledig. 1986b). El manejo de áreas de uso múltiple, las cuales tienen como uno de varios objetivos la conservación de recursos genéticos, requiere una planeación cuidadosa, ya que sin esfuerzos de colaboración conjunta, tienen la probabilidad de fracasar.

Algunos retos asociados con la conservación *in situ* son:

1. Decidir dónde, cuánto y cómo preservar, para incluir una muestra adecuada de la variación dentro y entre poblaciones, y un adecuado número y variedad de ambientes.
2. Proteger la integridad genética de la especie dentro de la reserva, de la contaminación de genes provenientes de fuentes del exterior, y
3. Mantener el equilibrio dinámico entre la competencia inter e intra-específica, disponibilidad de hábitat, distribución de edades y el sistema de cruzamiento que es responsable de la estructura genética de la población (Ledig. 1986a).

Es riesgoso depender únicamente de las reservas y parques nacionales para proteger la diversidad genética, ya que muchas de ellas son visualmente atractivas, pero están localizadas en áreas relativamente no productivas o atípicas. Las poblaciones de árboles protegidas en estas áreas pueden no ser representativas de la especie como un todo. Estos parques y otras reservas son útiles, pero constituyen únicamente una solución parcial para la conservación de los recursos genéticos. El establecimiento de nuevas áreas protegidas, aunque es deseable, frecuentemente no es factible, y las pocas áreas que se establezcan probablemente tendrán el mismo problema. Por lo tanto, es necesario mantener áreas manejadas de manera seminatural, donde los recursos forestales se puedan extraer, pero se promueva la regeneración natural, utilizando siembra directa o plantación en forma complementaria cuando sea necesario.

Si las plantaciones se encuentran adyacentes a las áreas de conservación *in situ* con árboles de la misma especie, el polen se mezclará y el área de conservación se contaminará con genes no-locales. Para

proteger las áreas *in situ* de la contaminación del polen indeseable, los manchones o núcleos de vegetación natural deben circundarse con franjas de amortiguamiento de bosques manejados con regeneración natural, o con plantaciones de otra especie (Ledig. 1986b). Aunque la conservación *in situ* podría ser menos cara y más efectiva que la preservación *ex situ*, cuando sea posible, la preservación *ex situ* debe hacerse también para proteger las áreas contra algunas pérdidas (Ledig. 1986a).

Muestreo de la diversidad genética

Muchos de los estudios de diversidad genética realizados en árboles forestales han evaluado la variabilidad de las enzimas de plantas (isoenzimas). Existe evidencia para sugerir que los patrones de variación en características cuantitativas difieren sustancialmente de aquellos tomados a partir de las isoenzimas (Muona. 1990). Sin embargo, los resultados para las características cuantitativas generalmente fueron realizados en individuos seleccionados fenotípicamente o poblaciones de especies comercialmente importantes, lo cual podría ser difícil para interpretarlos en términos de comparación de diversidad genética. Mucha de la variación de isoenzimas de las especies de árboles, típicamente entre 90 y 95%, ocurre dentro de las poblaciones (Hamrick y Godt 1990; Li *et al.* 1992). Las poblaciones marginales de árboles frecuentemente tienen porcentajes más bajos de heterocigosidad que las poblaciones centrales, probablemente debido al aislamiento y al flujo restringido de genes, así como también a las condiciones adversas resultantes en una presión fuerte de selección. El movimiento extensivo del polen y las varias estaciones sobre las cuales un árbol dado dispersa su polen pueden explicar el bajo grado de diferenciación de enzimas encontrado entre las poblaciones de árboles de las regiones templadas (Ledig. 1986b).

Las condiciones adversas frecuentemente experimentadas en los márgenes de las áreas de distribución de la especie pueden resultar en selección para nuevos alelos o complejos de genes, incrementando el valor potencial de estas poblaciones. Tanto las áreas representativas como los hábitats marginales deberían ser muestreados en programas de conservación *ex situ* e *in situ*. Todas las poblaciones de especies raras deberían ser protegidas de la pérdida de variabilidad genética. Los riesgos de factores del ambiente podrían ser más grandes cerca de los márgenes de las áreas de distribución de las especies, en donde las cosechas de semilla pueden ser muy escasas y la base genética puede ser reducida (Kitzmilller. 1990). Sin embargo, la diversidad genética podría ser más grande en las regiones sur del área de distribución natural de una especie. Para decidir las prioridades para el establecimiento de áreas de reserva *in situ*, deben considerarse los riesgos tanto para las poblaciones marginales como para la especie en su conjunto.

Cuando se está muestreando la diversidad genética, ya sea mediante métodos *in situ* o *ex situ*, la decisión convencional debería de permitir al manejador del recurso suponer que reservas o muestras más grandes son siempre mejores. Como Jasso (1970) estableció, la teoría predice que en general, cuando la población es polimórfica habrá un alto nivel de variación genética proporcional al tamaño de la población. Foster (1993) señaló, sin embargo, que no ha existido ninguna demostración de una fuerte relación entre el tamaño de la población y el nivel de la diversidad genética. Si esto es verdadero, quizás asegurando que la endogamia se mantenga a un mínimo, esto sería suficiente. Esto podría incluir al menos 100 árboles sanos y reproductores para una especie objetivo en una reserva *in situ*. Donde sea posible, sin embargo, el número de individuos en la población de cruzamiento debería ser más grande en varios órdenes de magnitud para protegerlos contra pérdidas impredecibles y asegurar que los alelos en frecuencias bajas se conserven (Namkoong. 1984).

Estrategias para el manejo de germoplasma en programas de mejoramiento y cruzamiento de árboles

Muchos programas de mejoramiento de árboles han sido cambiados de su objetivo de incrementar el crecimiento y la tasa de retorno económico, para lograr una ganancia quizás un poco más lenta, pero reteniendo diversidad genética y potencial adaptativo de una especie al mismo tiempo. Foster (1993) describió la situación en la cual los mejoradores de árboles tienen que adaptarse a las condiciones de manejo actual. Él describió el dilema de tener el manejo de un bosque y la industria forestal (aserraderos y otras facilidades para conversión de productos) guiando a los mejoradores de árboles hacia la uniformidad de un producto dentro del rodal, mientras los ecólogos, el público en general y la incertidumbre de factores ambientales adversos nos están guiando hacia el mantenimiento de un alto nivel de diversidad genética. Nosotros no sabemos si es posible realizar mejoramiento para árboles que tienen un alto nivel de uniformidad para varias características de importancia económica, manteniendo a la vez diversidad en características adaptativas. Es probable que se puedan lograr ambos, pero esto incrementa costos en tiempo y dinero.

Se requiere un balance para mejorar árboles genéticamente para características de importancia económica, mientras se está manteniendo o promoviendo la diversidad genética en la especie como un todo. La base genética debe ser mantenida o reducida de acuerdo con el valor económico de los productos, pero esta base deberá mantenerse para características ecológicamente adaptativas, como la tolerancia a la sequía. Suponiendo que no existe ligamiento con características de crecimiento, y que se tiene un número suficiente de padres en un programa de cruzamiento, la amplitud de la base genética debe mantenerse a través del cruzamiento de progenitores no emparentados provenientes de diferentes rodales (Kitzmilller, 1990). Estos rodales deben de estar dentro de la misma zona de recolección de semillas; sin embargo, este cruzamiento podría tener consecuencias que no promuevan una buena adaptación.

La hibridación de genotipos divergentes raramente incrementa el vigor de las plantas en el bosque natural (Ledig, 1986b). De hecho, el efecto puede ser justamente el opuesto si la depresión genética ocurre (Templeton, 1986). Cruzas de amplia base genética entre árboles de *Pinus taeda* han sido reportadas como intermedias o que exhiben heterosis negativa. Cuando la heterosis aparente ocurre en la progenie de progenitores no emparentados, es probable que muchos de éstos resulten de la generación de endogamia en pequeños rodales de árboles. Relaciones positivas entre la heterocigosidad y la tasa de crecimiento han sido reportadas, pero esto no es probablemente el resultado de sobre-dominancia. En lugar de esto, son más probables también algunos ejemplos de generación de endogamia (Ledig, 1986b).

La depresión por cruzamiento libre podría esperarse como un resultado de una cruce amplia cuando las especies de árboles están cercanamente adaptadas a las condiciones ambientales. Li *et al.* (1992) describieron asociaciones muy cercanas entre un número de características adaptativas en varias especies de árboles de hoja ancha en Canadá y gradientes ambientales. En un estudio con *Abies balsamea*, la temperatura óptima de fotosíntesis cambió a lo largo de un gradiente altitudinal sobre distancias de únicamente pocos cientos de metros en una manera que sugirió una adaptación cercana a las condiciones locales (Ledig, 1986b). Campbell (1979) también reportó que los patrones de variación de Douglas-fir estuvieron muy relacionados con la fisiografía dentro de una cuenca particular estudiada.

Bancos clonales y poblaciones de cruzamiento

Desde la perspectiva del manejo de germoplasma, mucha de la misma teoría se aplica para el muestreo de poblaciones de cruzamiento, así como para reservas *in situ*. La mayor diferencia es que un grado de selección fenotípica es casi siempre aplicado en la selección para poblaciones de cruzamiento, ya que las colecciones no son representaciones aleatorias de la variación en zonas de cruzamiento, excepto para características no comerciales.

Muchos de los programas de mejoramiento mantienen grandes poblaciones de cruzamiento usualmente preservadas en bancos de clones, los cuales sirven como reservorios de diversidad genética. Un banco clonal es esencialmente un área en la cual todas las selecciones son preservadas como injertos, aún sin considerar que éstas no han sido utilizadas en un huerto semillero (Ledig, 1986b).

Kitzmilller (1990) consideró que un programa de cruzamiento a largo plazo en el banco clonal es la clave para un manejo exitoso de recursos genéticos en un programa de mejoramiento de alto nivel en árboles forestales. Los bancos clonales están física y funcionalmente separados de los huertos semilleros de producción y podrían tener las mismas poblaciones de cruzamiento para una zona particular de cruzamiento. La gran incertidumbre en predecir el mercado y las demandas de ambientes forestales, demanda gran flexibilidad en el “pool” génico de la población. Los métodos más comunes para disminuir esta incertidumbre consisten en desarrollar variedades múltiples o líneas que reúnan diferentes objetivos. Usualmente para cada variedad, la población base es subdividida en varias líneas o sublíneas pequeñas. Las sublíneas consisten de números pequeños de árboles, típicamente de 4 a 20, por lo tanto los genes para características particulares son concentrados y pueden ser mejorados de manera rápida. La endogamia dentro de estas sublíneas se puede generar rápidamente. De esta manera árboles de diferentes sublíneas son traídos a la vez en huertos semilleros para evitar la endogamia. El proceso de selección para características como crecimiento, forma y resistencia a insectos eliminaría algunos genes en estas líneas. Ya que cualquier gen podría tener algún valor futuro potencial, el rango de variación natural deberá ser preservado en reservas naturales.

Joyce (1993) describe una metodología alternativa. En *Pinus banksiana*, él planea usar un sistema de cruzamiento en una población “núcleo” debido a su menor costo y a que las ganancias son potencialmente tan buenas como en el otro enfoque. Esta metodología consiste en mantener una población “principal” grande y una población “élite” más pequeña, conocida como el núcleo. En cada generación una porción del núcleo se deriva de los mejores individuos en la población principal y una parte de la población del núcleo se regresa a la población principal; por lo tanto, el mejoramiento genético ocurre en la población principal con una gradual reducción de la base genética.

Subdividir una especie dentro de poblaciones que difieren en frecuencias y fijación de alelos puede ser una manera efectiva para los silvicultores con el propósito de conservar la diversidad genética (Namkoong, 1983). Namkoong (1994) sugirió desarrollar diferentes poblaciones de cruzamiento bajo un rango de condiciones ambientales para mantener o posiblemente incrementar la variación adaptativa dentro de un programa de cruzamiento.

Un programa de mejoramiento promueve la diversidad en plantaciones a un nivel en el cual nunca podría ocurrir en el bosque natural. La progenie producida por polinización cruzada en un huerto semillero puede tener combinaciones de genes que nunca podrían haber sido producidas en la naturaleza (Ledig, 1986a). Debido a la heterogeneidad de la semilla de un huerto semillero, se espera que ésta se comporte bien a través de un rango de diferentes ambientes (Kitzmilller, 1990).

Talbert (1993) describió la metodología de la Compañía Weyerhaeuser para manipular el material genético en una situación dada. Las familias o clones conocidos para producir madera con

características particulares para sitios específicos o mercados, están siendo identificados y plantados muy próximos a los aserraderos diseñados para tener una alta eficiencia en el procesamiento de dicha madera. Las plantaciones se manejan utilizando prescripciones silvícolas que complementan el potencial genético de los rodales.

Consideraciones sobre la distribución del material en las plantaciones

Kitzmilller (1990) estableció que la diversidad genética entre y dentro de los rodales puede controlarse mediante:

1. Manipulación de la composición genética de los lotes de semilla (i. e. variando las familias y los rodales en lotes puros o mezclados).
2. Manipulación del tiempo de plantación de varios lotes.
3. Manipulación de los patrones espaciales de grupos genéticos.

Talbert (1993) desarrolló un conjunto de reglas las cuales se aplican uniformemente a las plantaciones de la Compañía Weyerhaeuser para proporcionar control sobre el riesgo y asegurar flexibilidad en el manejo de éstas:

1. Se establecen controles sobre la proporción máxima de cualquier familia, o familias relacionadas, que pueden plantarse en un año o sobre un período.
2. Se establecen controles sobre el máximo de área contigua en que se puede plantar cada una de las familias, ya sea de polinización abierta o polinización controlada.
3. Se establecen controles sobre el máximo de una “distancia ambiental” a través de la cual pueden moverse los lotes, con base en las características de origen del rodal y del sitio (particularmente latitud, elevación, y condiciones mésico/xéricas).

Una consideración importante en la diversidad de las plantaciones es cómo se regenerará el rodal. Kitzmilller (1990) señaló que la diversidad debería ser mantenida de tal manera que el silvicultor pueda tener la opción de regeneración natural. Ledig (1986a) estableció que las plantaciones son caminos cerrados desde el punto de vista genético. Si es seguro que las plantaciones cosechadas se reemplazarán con nuevas plantaciones, el nivel de diversidad tiene que proporcionar únicamente el amortiguamiento necesario para un solo turno o generación. Sin embargo, si no existe seguridad de plantar después de la generación actual, la progenie debe tener al menos la suficiente diversidad para permitir que las plántulas se adapten en las generaciones subsecuentes.

Libby (1982) presentó un conjunto de guías para la distribución de clones con base en un modelo de simulación. Él encontró que cuando el riesgo de pérdida debido a efectos del ambiente es de moderado a bajo, las mezclas genéticas son probablemente mejores que los monocultivos, pero cuando el riesgo de pérdida por un daño físico es alto, un mosaico de pequeños monocultivos podría ser más económicamente atractivo porque los bloques enteros pueden ser replantados. Plantaciones genéticamente diversas son menos vulnerables a plagas que los monocultivos, porque ellas podrían evitar el inicio o dispersión de la peste o infección. Las plagas pueden presentar varias generaciones durante una rotación simple de árboles forestales. Por lo tanto, ellas pueden fácilmente adaptarse a diferencias menores entre genotipos. Libby (1982) argumentó que las plantaciones derivadas de plántulas pueden formar un continuo genético debido a que la diversidad genética dentro de una familia podría ser muy grande. Por lo tanto, una serie de monocultivos clonales, que son genéticamente diferentes, probablemente resulte en un

riesgo más bajo que una mezcla de un huerto semillero de plántulas. El número de monotipos genéticos debería estar entre 7 y 25; suficientemente bajo para evitar un gradiente continuo, y suficientemente alto para prevenir un fracaso en la plantación si uno o dos clones son destruidos. La experiencia con rodales naturales no nos regresa a la idea de un riesgo incrementado, asociado con un gradiente genético, a pesar de lo anterior. Kitzmilller (1990) piensa que la regla 7-25 es buena en general para plantaciones derivadas de plántulas así como también para aquellas derivadas de clones. Las plantaciones con especies mezcladas son lo último en bajo riesgo.

Es claro que plantando clones en grandes bloques es una estrategia peligrosa, sin embargo podría ser una tentación hacerlo cuando en algunos casos un clon es extremadamente bueno. Los agrónomos pueden tolerar más uniformidad que los silvicultores, porque ellos tienen más opciones para el control de las plagas y más flexibilidad debido al corto período en que trabajan. La vulnerabilidad es un problema desde el punto de vista de producción en un bosque y la diversidad es una forma de doble filo para prevenir la pérdida total mientras se acepta la pérdida de algunos individuos (Ledig, 1986a).

En bancos clonales asociados con muchos programas de cruzamiento, usualmente existe suficiente diversidad para cambiar los cultivos si es necesario debido a la aparición de nuevas plagas o cambios en las condiciones climáticas. Sin embargo, en la silvicultura esta no es una opción realista debido al largo período de rotación de los árboles forestales. La mejor alternativa es mantener suficiente diversidad en las plantaciones comerciales, a través del uso de mosaicos de diferentes cultivares o mediante mezclas de diferentes variantes genéticas en la misma plantación. Con un bloque de un simple cultivar, la dispersión de las plagas y quizás su evolución es más fácil que en una plantación con una mezcla de cultivares (Ledig, 1986a).

Namkoong (1983) presentó los componentes de un programa de manejo comprensivo de germoplasma, incluyendo la conservación y mejoramiento de árboles, como sigue:

1. Manejo de la especie completa: conservándola a través de métodos *in situ* y *ex situ*.
2. Manejo de las poblaciones de cruzamiento: selección/recolección para cubrir una variabilidad aleatoria en las zonas de cruzamiento, definiendo las ventajas y desventajas de una menor intensidad y mayor diversidad; subdivisión de poblaciones de cruzamiento para evitar endogamia, líneas para características específicas, líneas desarrolladas en diferentes ambientes, y tamaños de muestra para evitar endogamia.
3. Manejo de huertos semilleros de producción: número de progenitores requeridos para retener una proporción dada de alelos comunes en una población de producción, amortiguando el potencial de variabilidad genética en poblaciones, desequilibrio en huerto semillero, contaminación.

Estudios de caso: *Pinus radiata* y *Picea glauca* (poblaciones del Valle de Ottawa)

El área de distribución nativa de *Pinus radiata* se restringe a cinco áreas pequeñas, tres poblaciones en la costa de California y dos en islas de México. El número total de la población natural de *Pinus radiata* es estimado en varios millones. A pesar de su área natural tan restringida, la especie es uno de los pinos más plantados en el mundo. Esta especie se plantó inicialmente en Nueva Zelanda y Australia hace más de un siglo, y ha sido sujeto de varios programas de mejoramiento en estos países por casi medio siglo. Esta especie también es uno de los pilares de la industria forestal en España, Kenya, Sudáfrica, Chile, Argentina y Uruguay.

Pinus radiata tiene relativamente baja variabilidad genética, comparada con otras coníferas en

términos de isoenzimas. La proporción de la variabilidad genética total que se atribuye entre poblaciones es mucho más alta que aquella reportada para muchas otras coníferas. El Cuadro 1 resume algunos de los resultados de diversidad genética reportados por Morán *et al.* (1988).

Población	Número total de árboles	Número promedio de alelos	Polimorfismo promedio	Heterocigosidad promedio
Monterey	3,000,000	1.74	50.5	0.097
Cambria	1,300,000	1.58	38.7	0.110
Año Nuevo	1,200,000	1.47	33.1	0.088
Cedros	80,000	1.56	38.7	0.092
Guadalupe	368	1.46	35.5	0.089

Cuadro 1. Estructura genética de cinco poblaciones de *Pinus radiata* basada en isoenzimas (tomado de Morán *et al.* 1988)

Hasta hace algunos años sólo se había hecho un trabajo mínimo con las poblaciones de México. Todas las pruebas y trabajo de mejoramiento se han llevado a cabo utilizando los tres orígenes de California. En la actualidad se está aplicando una mezcla de prácticas de conservación *in situ* y *ex situ*, con colecciones extensas derivadas de las cinco poblaciones en almacenamiento. La conservación *in situ* está trabajándose únicamente para la población de Isla Cedros, debido a la contaminación y mezcla de material genético en las poblaciones de la Costa, y un problema serio con las cabras silvestres comiéndose la regeneración natural en la población de Isla Guadalupe.

Picea glauca tiene un área de distribución natural bastante amplia: cubre mucha extensión de Canadá y se introduce en el norte de Estados Unidos. Crece sobre una amplia variedad de sitios y tiene un valor comercial a través de su área de distribución. *Picea glauca* es la segunda especie forestal más plantada en Canadá, y existen varios programas de mejoramiento a través de su área de plantación. La especie como un todo es altamente variable; sin embargo, en los ensayos de procedencia realizados, una procedencia particular del área del Valle de Ottawa en la parte central de Canadá se comporta muy bien en la parte este del área de distribución natural de la especie.

Debido a las amenazas continuas a la población, se inició un proyecto de manejo de germoplasma con los objetivos siguientes:

1. Establecer y manejar un área de producción de semilla para necesidades inmediatas de reforestación y conservación a largo plazo.
2. Establecer y mantener un huerto semillero de producción de árboles de alta calidad.
3. Experimentar con técnicas para reducir el tiempo para la producción de semilla así como incrementar la producción y calidad de ésta.
4. Establecer un banco clonal.

El segundo y tercer objetivos se iniciaron, únicamente el tercero se concluyó, con 250 individuos injertados dentro de un banco clonal, procedentes de un total de 34 rodales.

Un estudio posterior evaluó el destino de los 34 rodales que fueron muestreados. La información obtenida de la mitad de ellos mostró que un rodal fue cosechado por completo, otros dos fueron cosechados en aproximadamente 1/3 de su área y otro más había perdido casi la mitad de su área por efecto de incendios y viento.

Un estudio de isoenzimas demostró que una cantidad significativa de la variación dentro de los rodales se perdió durante el proceso de muestreo para la conservación *ex situ*, implicando que varios de

los rodales deberían de colocarse en un *status* de reserva si se pretende rescatar o preservar el potencial genético real de las poblaciones.

Literatura citada

Buchert, G.P. 1994. Genetics of white pine and implications for management and conservation. For. Chron. 70: 427-434.

Campbell, R.K. 1979. Genecology of Douglas-fir in a watershed in the Oregon Cascades. Ecology 60: 1036-1050.

Cheliak, W.M. 1988. Genetic effects of phenotypic selection in white spruce. For. Ecol. Manage. 24: 139-149.

El-Kassaby, Y.A. 1992. Domestication and genetic diversity - should we be concerned? For. Chron. 68: 687-700.

Forest Genetic Resource Working Group. 1991. Managing global genetic resources: forest trees. Committee on Managing Global Genetic Resources: Agricultural Imperatives, Subcommittee on Managing Plant Genetic Resources, Forest Genetic Resources Working Group: Board on Agriculture, National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C. 228 p.

Foster, G.S. 1993. Varietal deployment strategies and genetic diversity: balancing productivity and stability of forest stands. In: Proceedings of the Twenty-fourth Meeting of the Canadian Tree Improvement Association. Part II. Fredericton, New Brunswick, August 15-19. pp: 52-64.

Frankel, O. 1983. The place of management in conservation. In: C.M. Shonewald-Cox, S.M. Chambers, B. MacBryde, and L. Thomas (eds.), Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations. pp: 1-14.

Hamrick, J.L. and M.J. Godt. 1990. Allozyme diversity in plant species. In: A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler, and B.S. Weir. (eds.), Plant population genetics, breeding, and genetic resources. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. pp: 43-63.

Jasso, M.J. 1970. Impact of silviculture on forest genetic resources. Unasylva 24(2-3): 70-75.

Joyce, D. and P. Nitschke. 1993. An advanced generation breeding strategy for jack pine in Ontario. In: Y.S. Park and G.W. Adams (eds.), Breeding strategies of important tree species in Canada. Information Report M-X-186E, Department of Natural Resources Canada. pp: 13-24.

Kitzmilller, J.H. 1990. Managing genetic diversity in a tree improvement program. For. Ecol. Manage. 35: 131-149.

Ledig, F.T. 1986a. Conservation strategies for forest gene resources. For. Ecol. Manage. 14: 77-90.

- Ledig, F.T. 1986b. Heterozygosity, heterosis, and fitness in outbreeding plants. *In*: M.E. Soulé (ed.), Conservation biology : the science of scarcity and diversity. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. pp: 77-104.
- Li, P., J. MacKay, and J. Bousquet. 1992. Genetic diversity in Canadian hardwoods: implications for conservation. *For. Chron.* 68: 709-719.
- Libby, W.J. 1982. What is a safe number of clones per plantation? *In*: H.M. Heybroek, B.R. Stephen, and K. von Weissenberg (eds.) Proceedings of the Third International Workshop on Genetics of Host-Parasite Interactions in Forestry, Wageningen, The Netherlands, 14-21 September 1980. Pudoc, Wageningen. pp: 342-360.
- Moran, G.F., J.C. Bell, and K.G. Eldridge. 1988. The genetic structure and the conservation of the five natural populations of *Pinus radiata*. *Can. J. For. Res.* 18: 506-514.
- Mosseler, A. 1992. Life history and genetic diversity in red pine: implications for gene conservation in forestry. *For. Chron.* 68: 701-708.
- Muona, O. 1990. Population genetics in forest tree improvement. *In*: A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler, and B.S. Weir. (eds.), Plant population genetics, breeding, and genetic resources. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. pp: 282-298.
- Namkoong, G. 1983. Preserving natural diversity. *In*: C.M. Shonewald-Cox, S.M. Chambers, B. MacBryde, and L. Thomas (eds.), Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations. pp: 317-334.
- Namkoong, G. 1994. A control concept of gene conservation. *Silvae Genet.* 33: 160-163.
- Skroppa, T. 1994. Impacts of tree improvement on genetic structure and diversity of planted forests. *Silva Fennica* 28: 265-274.
- Talbert, C.B. 1993. Decision processes for effective allocation and management of genetically improved planting stock: a case study from an industrial breeding program in Douglas-fir. *In*: Proceedings of the Twenty-fourth Meeting of the Canadian Tree Improvement Association. Part II. Fredericton, New Brunswick. August 15-19. pp: 52-64.
- Templeton, A.R. 1986. Coadaptation and outbreeding depression. *In*: M.E. Soulé, (ed.) Conservation biology: the science of scarcity and diversity. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. pp: 105-116.
- Yang, R.-C. and F.C. Yeh. 1992. Genetic consequences of *in situ* and *ex situ* conservation of forest trees. *For. Chron.* 68: 720-729.



Problemas de deforestación por cambio de uso del suelo en un bosque de *Pinus montezumae* en la parte baja del Pico de Orizaba, Puebla.



Conservación *in situ* de una población aislada de *Pseudotsuga* spp en el Parque Nacional "El Chico", Hidalgo.

5

ZONIFICACIÓN DE SEMILLAS EN MÉXICO

M. Thompson Conkle

Introducción
Zonas de semilla en México
Discusión

ZONIFICACIÓN DE SEMILLAS EN MÉXICO

M. Thompson Conkle

Institute of Forest Genetics, Pacific Southwest Research Station, U.S.D.A. Forest Service,
P.O. Box 245, Berkeley, California 94701, E.U.A.

Introducción

Los especialistas en recursos forestales en todo el mundo reconocen la importancia de los recursos genéticos nativos, debido a que las adaptaciones y la variación genética existentes dentro de las poblaciones locales son las únicas y las principales (y en algunos casos las únicas) fuentes de semillas certificables para satisfacer las necesidades de los programas de plantación y de mejoramiento genético forestal. Conforme se intensifican las actividades de manejo forestal, se recolectan semillas y las plantas se establecen en nuevas localidades para cumplir diversos objetivos. Los genetistas forestales, con el propósito de registrar los orígenes de la semilla recolectada y para orientar las actividades de forestación y reforestación, han identificado diferentes zonas de semilla.

Las zonas de semilla utilizadas por el Servicio Forestal del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA Forest Service) se elaboran en respuesta a lineamientos que establecen que la semilla debería: (1) ser recolectada dentro de 100 millas al Sur o al Norte del sitio de plantación, y (2) diferir en la elevación del sitio en menos de 1,000 pies (365 m). La intención de estos lineamientos es reducir los riesgos de fracaso mediante el establecimiento de material adaptado localmente. Las zonas de semilla conducen al uso de mejores prácticas para identificar la condición genética y geográfica de las recolecciones, lo cual conduce al establecimiento de plantaciones con material genético adaptado localmente. Adicionalmente, es bien reconocido que estas prácticas también minimizan los riesgos de perturbación del balance genético dentro de las poblaciones nativas.

La implementación de los procesos de zonificación de semillas requiere que se desarrollen subdivisiones geográficas que agrupen poblaciones de individuos potencialmente entrecruzables, con una constitución genética similar. Debido a la gran importancia que tiene la elevación sobre las adaptaciones dentro de las poblaciones locales, los procedimientos de zonificación de semillas requieren registros explícitos de las elevaciones de recolección. Los inventarios de semilla identificados por zonas y grupos de elevación proporcionan los medios para distribuir las existencias de material genético apropiado acorde con los sitios geográficos y elevaciones correspondientes.

Zonas de semilla en México

Si se parte de la hipótesis general de que condiciones ecológicas similares conducen a constituciones genéticas similares, y considerando que actualmente no se usan en México zonas generales de recolección y movimiento de semilla de especies leñosas forestales, se proponen las siguientes zonas de semillas para el país. Las zonas de semillas propuestas consisten de una región ecológica identificada con tres dígitos, el primer dígito identifica la región, el segundo dígito identifica a las subregiones, y el tercer dígito designa a las zonas locales de semilla.

En las siguientes figuras se exhiben las regiones (Figura 1), subregiones (Figuras 2 y 3), y zonas propuestas (Figura 4). Las designaciones combinan información de provincias geológicas (Figura 5, Ferrusquia-Villafranca. 1993), topografía (Figura 6, Rzedowski. 1978; Figura 7, McDonald. 1993), precipitación (Figura 8, Mosiño-Alemán y García. 1974), precipitación en el verano e invierno (Figura 9, Mosiño-Alemán y García. 1974), duración de la sequía inter-estival (Figura 10, Mosiño-Alemán y García. 1974), datos anuales de temperatura (Figura 11, Mosiño-Alemán y García. 1974), y zonas de vegetación (Figura 12 [región templada] y Figura 13 [región tropical] Leopold 1950; Figura 14 [región templada] y Figura 15 [región tropical], Rzedowski. 1978). Los procesos que se usaron para identificar Regiones, Subregiones y zonas de semilla para México fueron intuitivos, comparativos, e iterativos. Las primeras designaciones se aproximaron a las áreas principales de distribución de los pinos mexicanos (Styles. 1993). Posteriormente, las comparaciones se ampliaron para incluir las diversas fuentes de información identificadas en este párrafo. Se incluye un mapa de zonificación de semillas (Figura 4) a la misma escala que los mapas de división política, fisiográfica, condiciones ecológicas y clima utilizados, con el propósito de facilitar las comparaciones y fomentar la discusión que conduzca a un consenso sobre el mapa de zonificación de semillas para México. Las diez regiones propuestas para México (Figura 1) son:

000 -- Baja California Norte

Esta región, la más pequeña, es de gran interés a genetistas forestales de California, debido a que varias de las especies forestales más importantes de la región tienen sus poblaciones de más al sur localizadas en la parte alta de la cordillera norte-sur de la Península de Baja California. Esta es la única región de México en donde predomina la precipitación invernal.

100 -- Regiones áridas del Noroeste

Esta amplia región con vegetación de clima árido-templado incluye la parte central de la Península de Baja California, continúa a lo largo de la parte norte del Golfo de México y engloba las planicies costeras y la parte sur de la cuenca del Desierto de Sonora.

200 -- Costas tropicales del Pacífico

La geología y la ecología tropical coinciden para formar una región costera que se extiende por casi toda la longitud de la costa del Pacífico de México; las regiones amplias en el norte se unen en forma abrupta con la topografía de la Sierra Madre Occidental; al Sur de Puerto Vallarta las planicies costeras son regiones estrechas y alargadas.

300 -- Sierra Madre Occidental

La subducción y levantamiento de la placa tectónica es el origen más probable de esta importante cordillera volcánica; los picos de gran elevación en esta cordillera proporcionan una amplia gama de ambientes, desde desiertos, hasta el límite de vegetación alpina; los bosques son ricos y diversos, con mezclas que varían desde especies con una amplia distribución hasta especies raras o relictos ecológicos.

400 -- Regiones áridas del Norte y del Centro

La escasa y dispersa precipitación y la presencia de períodos importantes de sequía estival generan los desiertos y las regiones áridas que separan las formaciones montañosas más importantes en el Norte de México; los terrenos áridos y la amplia separación entre las montañas son barreras efectivas al flujo genético, aislando entre sí a las principales poblaciones de mayor elevación y generando ambientes similares a islas en las partes altas de las montañas separadas entre sí.

500 -- Sierra Madre Oriental

Las montañas de rocas marinas sedimentarias proporcionan evidencia de una geología antigua cuando una masa terrestre conocida como la Pangea Centro-Occidental incluía parte de las actuales regiones de Norte y Sudamérica, Yucatán, Golfo de México, Florida, y Oeste de África; los levantamientos de esta masa formaron la Sierra Madre Oriental y las rupturas que separaron a los continentes corren a lo largo de la cordillera; los ambientes con precipitación de verano en las partes altas de la montaña proporcionan refugios para especies templadas, algunas con conexiones genéticas evidentes con la flora de las Montañas Rocosas.

600 -- Planicies Costeras del Golfo y Península de Yucatán

La precipitación orográfica de las tormentas estivales tropicales mantienen los bosques tropicales más extensos e importantes de México en esta región.

700 -- Cinturón volcánico transversal

Las montañas de origen volcánico con dirección este-oeste cortan a México en la latitud 18-20°, Norte. Estas cordilleras proporcionan el mayor relieve en el país; la historia y la significancia de la placa tectónica en esta provincia geológica aún no se entienden bien; las montañas elevadas fácilmente distinguibles constituyen islas con climas templados.

800 -- Sierra Madre del Sur

Las Subregiones de la Sierra Madre del Sur incluyen depresiones extensas y cadenas montañosas espaciadas que crean ambientes complejos con vegetación tropical circundando y aislando montañas y picos de clima templado.

900 -- Sierra Madre de Chiapas

Cadenas montañosas que corren de norte a sur en la Sierra Madre de Chiapas sirven de nexos para las especies de pino que medran en México y tienen sus poblaciones más australes en países de Centroamérica como Guatemala, Honduras, El Salvador y Nicaragua.

Cada una de las diez regiones señaladas tienen dos o más subregiones que se muestran en la Figura 2 (con nombres propuestos para las subregiones 000 a 400) y en la Figura 3 (subregiones 500 a 900). Los cambios en condiciones ecológicas, la dirección de las cadenas montañosas (este-oeste, norte-sur), y los cambios en la topografía se examinaron para establecer las divisiones de las subregiones.

La Figura 4, que muestra las zonas de semillas, también fue una continuación del proceso empleado para colocar las divisiones de las subregiones, pero el énfasis se dirigió a limitar los tamaños máximos de las zonas a aproximadamente 160 kilómetros. Las delimitaciones de las zonas son más densas a través de las latitudes que a través de las longitudes, y más densas en regiones de topografía montañosa que en terrenos bajos y planicies amplias.

Si las zonas de semilla, identificadas aquí o desarrolladas posteriormente por el Grupo de Estudio sobre Recursos Genéticos Forestales de la Comisión Forestal de Norteamérica, FAO, se recomiendan para su uso en México, entonces, el registro de las elevaciones de los sitios de colecta en bandas altitudinales de 150 m ayudaría a establecer recomendaciones para el establecimiento de plantaciones con material local de la zona que no tenga una diferencia mayor de 300 m en la elevación con el sitio de plantación.

No existe un formato estándar para la documentación de las recolecciones de semilla; sin embargo, el interés a nivel mundial y el importante valor comercial del germoplasma indican que los procesos de certificación local son más deseables. Las inspecciones para verificar las localidades de recolección, las normas de calidad de los árboles y del rodal, la recolección de varios árboles por rodal (diez árboles semilleros ampliamente separados entre sí, por rodal, proporcionan una adecuada muestra genética del rodal), la inclusión de varios lotes de colecta por zona altitudinal (numerosas localidades con un número pequeño de árboles colectados por localidad es más deseable que la alternativa de pocas localidades con numerosos árboles colectados en cada una) para asegurar el muestreo de la diversidad local, y la realización de ensayos de validación de pureza y viabilidad de la semilla son etapas necesarias para efectuar un programa completo de manejo de recursos de germoplasma.

Discusión

La delimitación de zonas de semillas y las implicaciones de manejo de un programa completo de recursos genéticos son procesos valiosos para el manejo y administración de recursos forestales. Estas zonas son particularmente valiosas en escalas geográficas relativamente grandes y en programas donde un número importante de trabajadores debe coordinar actividades relativamente variables de gran importancia. Esto permite unificar la comprensión y los criterios empleados en los procesos de localización de rodales semilleros, en la recolección apropiada de semilla, en la identificación de los lotes de semilla almacenados, en la selección y uso de los lotes de semilla disponibles, en el cultivo y distribución adecuada del material genético existente, y en la cooperación en el intercambio mundial de materiales para las evaluaciones genéticas y con fines comerciales.

Las zonas de semilla identificadas en este documento se proponen para comenzar un programa. Es altamente deseable involucrar expertos y mapas de mayor resolución para refinar y desarrollar zonas más precisas y funcionales. Las consideraciones de límites estatales, caminos, bordes montañosos, cuencas de drenaje fluvial, discontinuidades físicas y ecológicas conjuntamente con las consideraciones de acceso

y uso son importantes para mejorar y refinar las zonas de semilla.

En conclusión, es importante señalar que las zonas de semilla son útiles para las consideraciones generales de manejo de los recursos. Cuando se tiene información precisa sobre las especies conexas, las razas genéticas, las poblaciones aisladas y distintivas, los taxa raros y distintos entonces las decisiones sobre los recursos genéticos y las acciones de manejo forestal pueden orientarse con base en la estructura genética precisa y las características particulares de cada especie individual.

Literatura citada

- Ferrusquia-Villafranca, I. 1993. Geology of Mexico: a synopsis, *In*: T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, and J. Fa (eds.), Biological diversity of Mexico: origins and distribution. Oxford University Press, New York. pp: 3-107.
- Leopold, A.S. 1950. Vegetation zones of Mexico. *Ecology* 31:507-518.
- McDonald, J.A. 1993. Phytogeography and history of the alpine-subalpine flora of Northeastern Mexico, *In*: T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, and J. Fa (eds.), Biological diversity of Mexico: origins and distribution. Oxford University Press, New York. pp: 681-703.
- Mosiño-Alemán, P.A., and E. García. 1974. The climate of Mexico. *In*: R.A. Bryson and F.K. Hare (eds.), *Climates of North America. World survey of climatology* 11. pp: 345-390.
- Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Editorial Limusa, Mexico. 432 p.
- Styles, B.T. 1993. Genus *Pinus*: a Mexican purview, *In*: T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, and J. Fa (eds.), Biological diversity of Mexico: origins and distribution. Oxford University Press, New York. pp: 397-420.

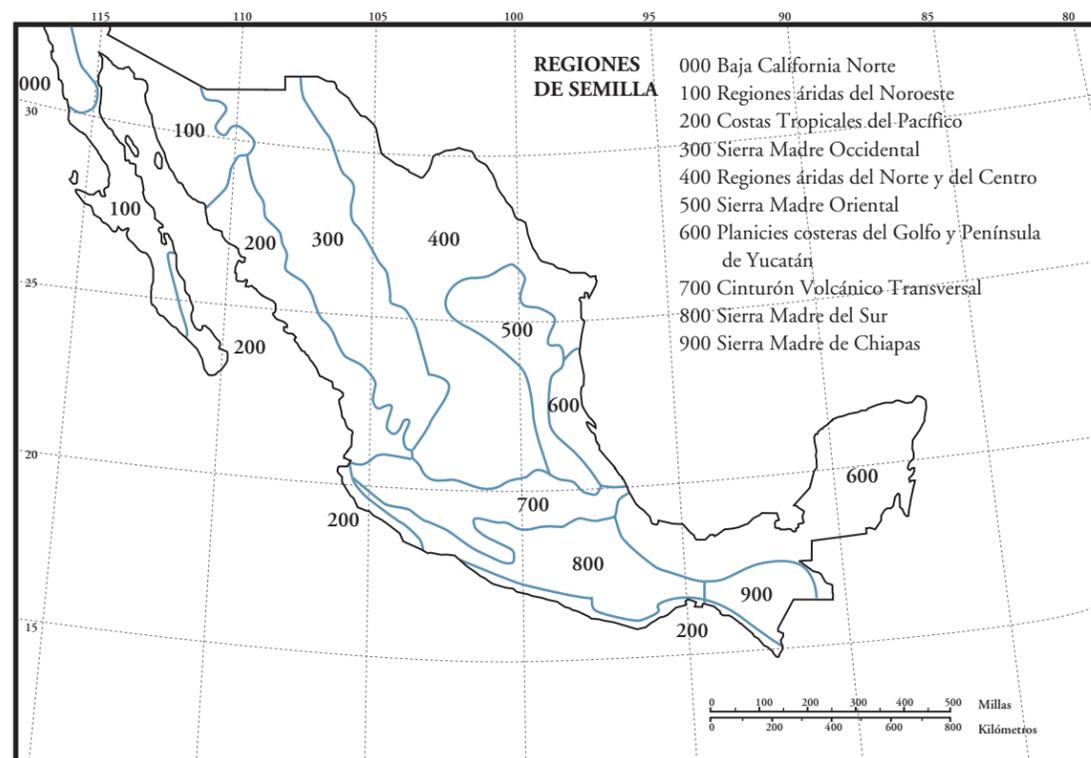


Figura 1. Regiones semilleras de México

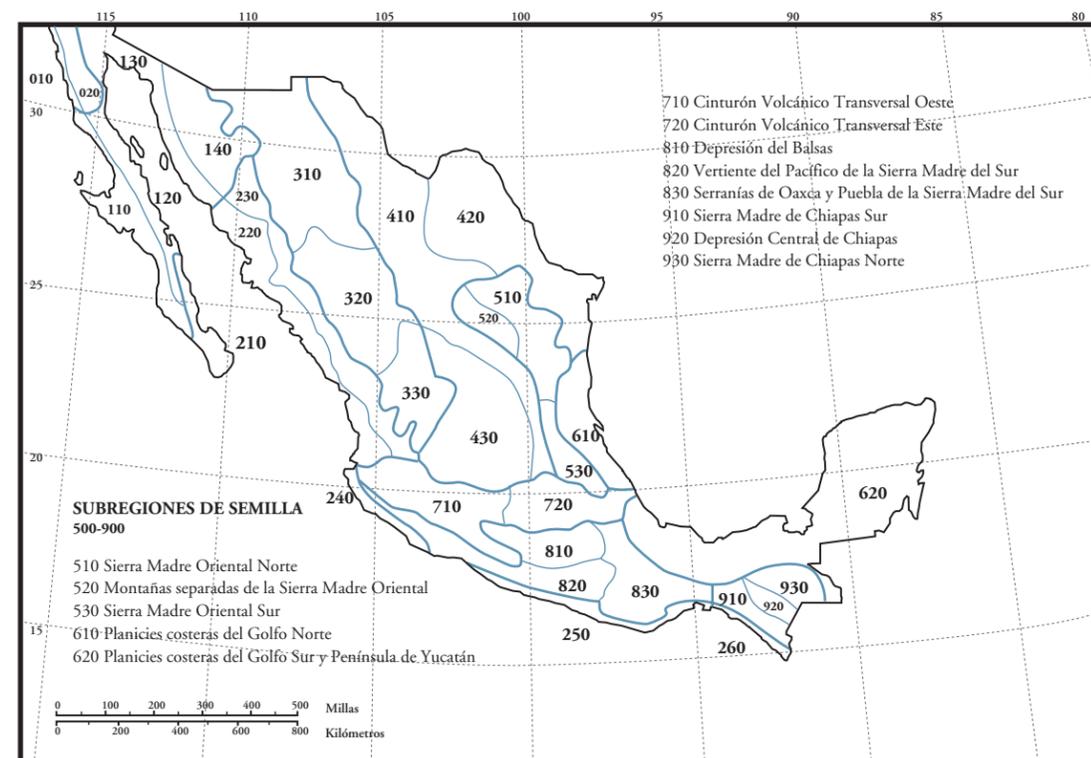


Figura 3. Subregiones de semillera 500-900 para México



Figura 2. Subregiones de semillera 000-400 para México



Figura 4. Zonas de semilla para México

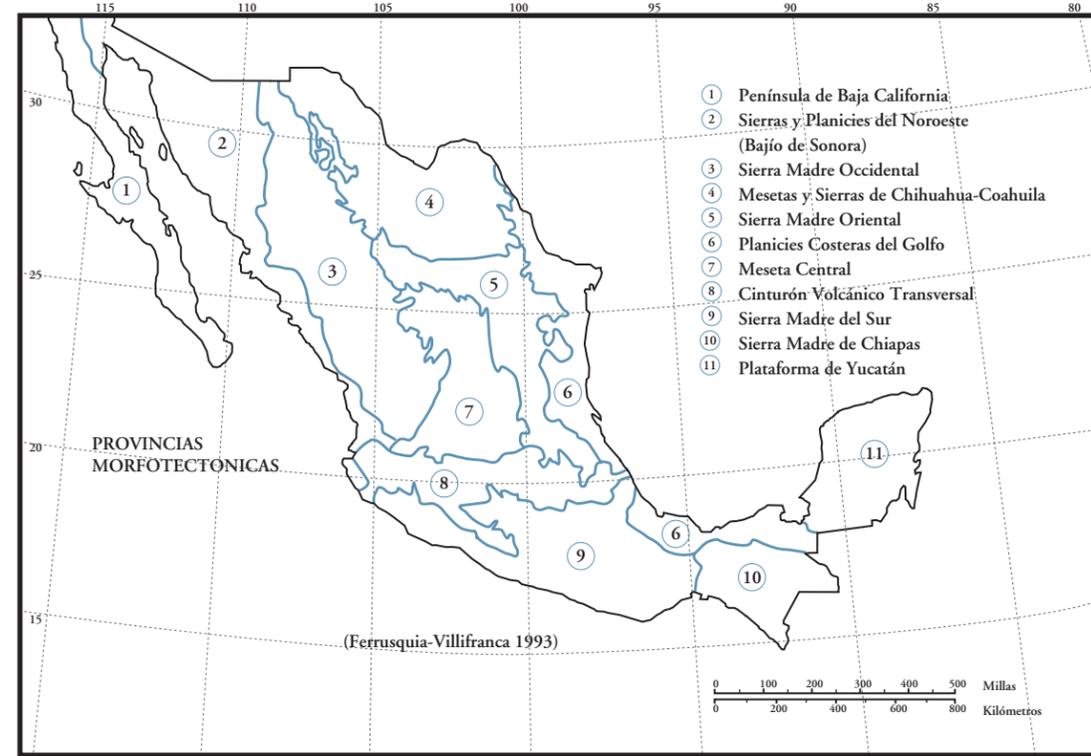


Figura 5. Provincias geológicas de México

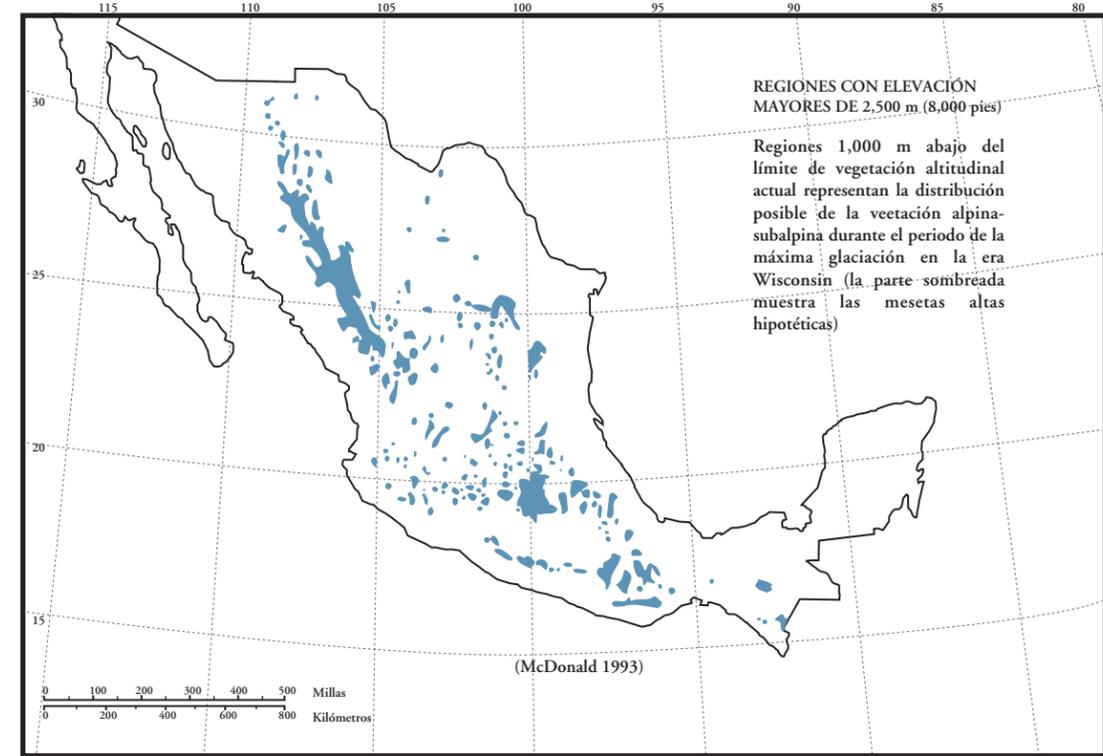


Figura 7. Regiones de México con elevación mayor de 2,500 m

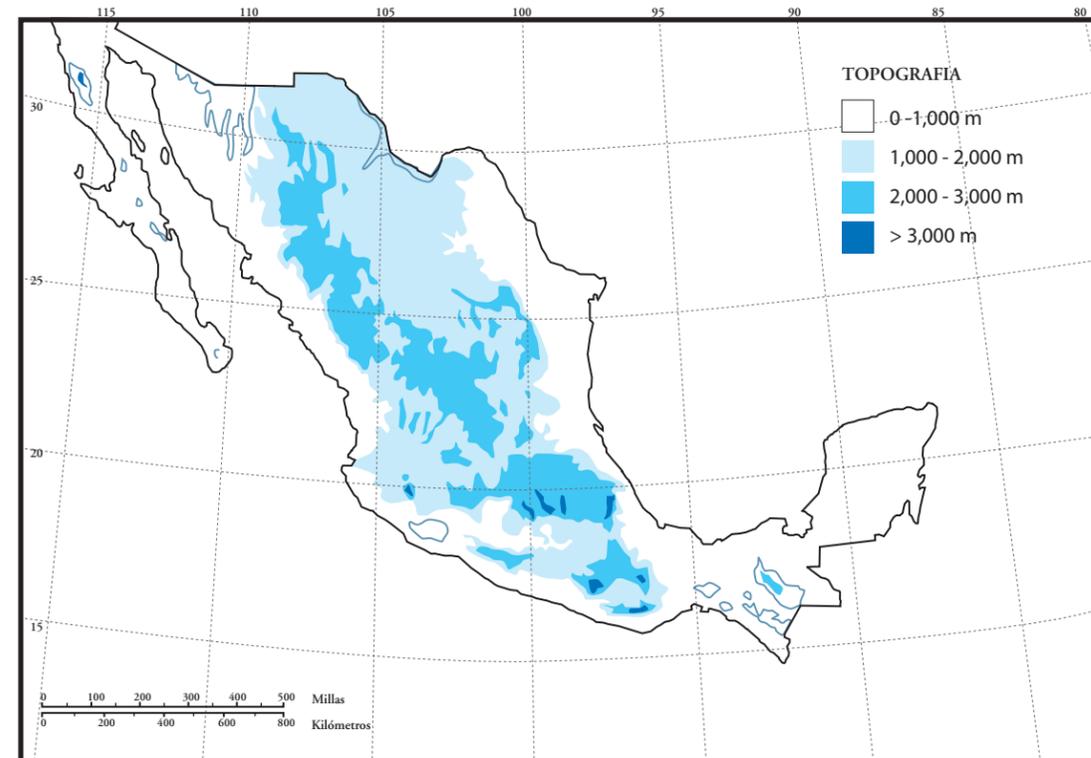


Figura 6. Topografía de México

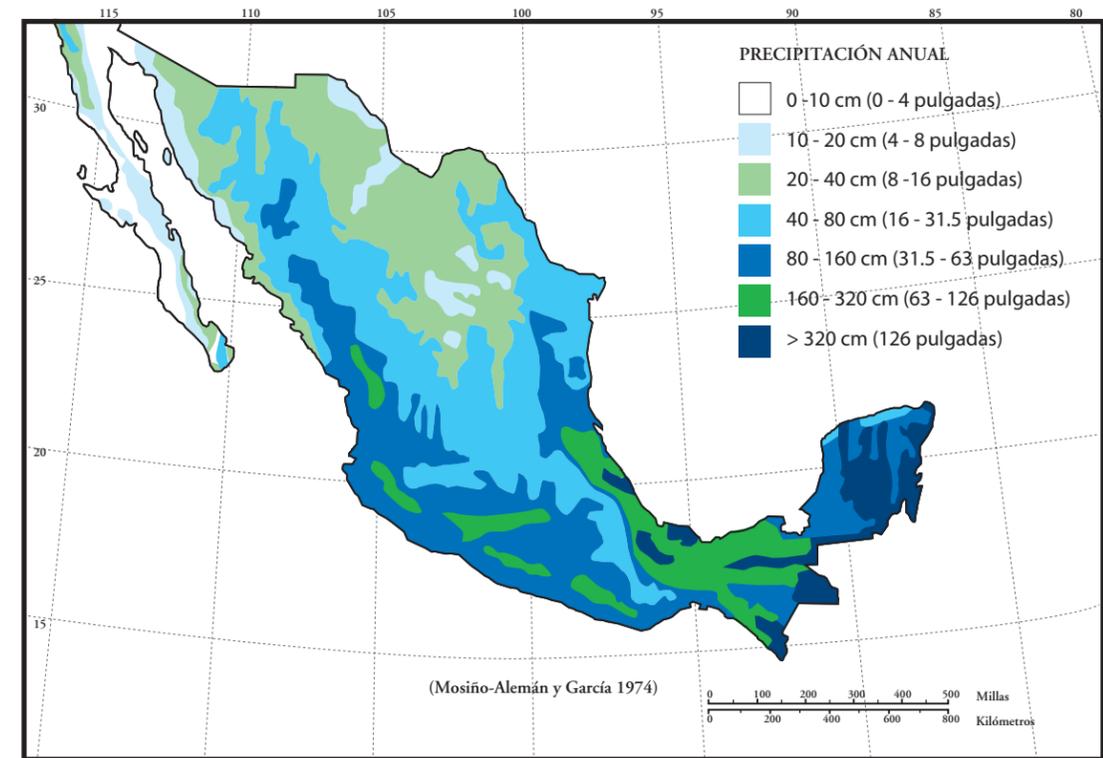


Figura 8. Precipitación anual en México.

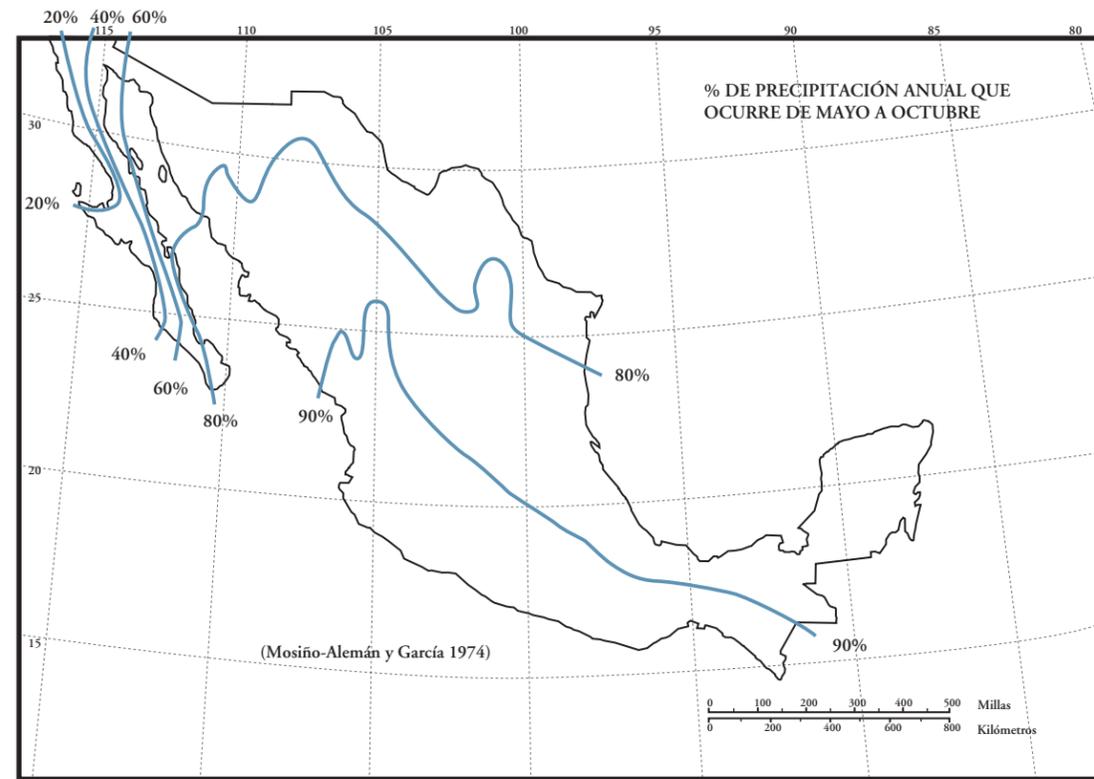


Figura 9. Porcentaje de la precipitación anual que ocurre durante los meses de verano, de mayo a octubre

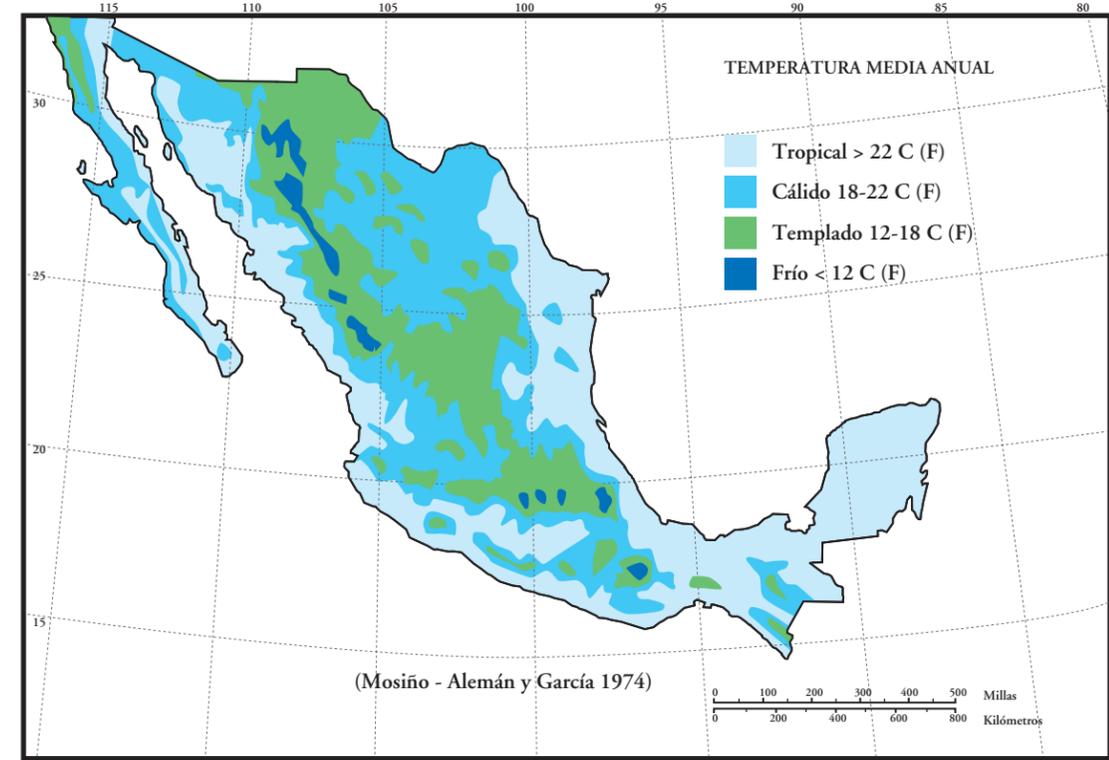


Figura 11. Climas de México de acuerdo a la temperatura media anual

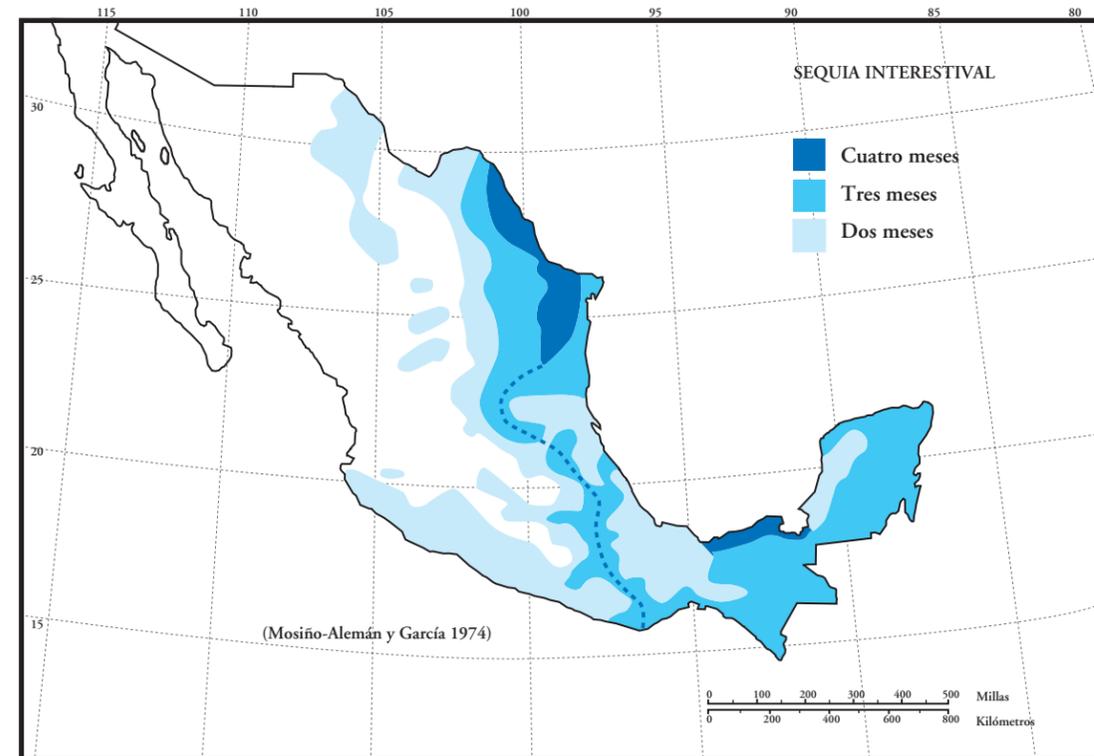


Figura 10. Duración de la sequía interestival

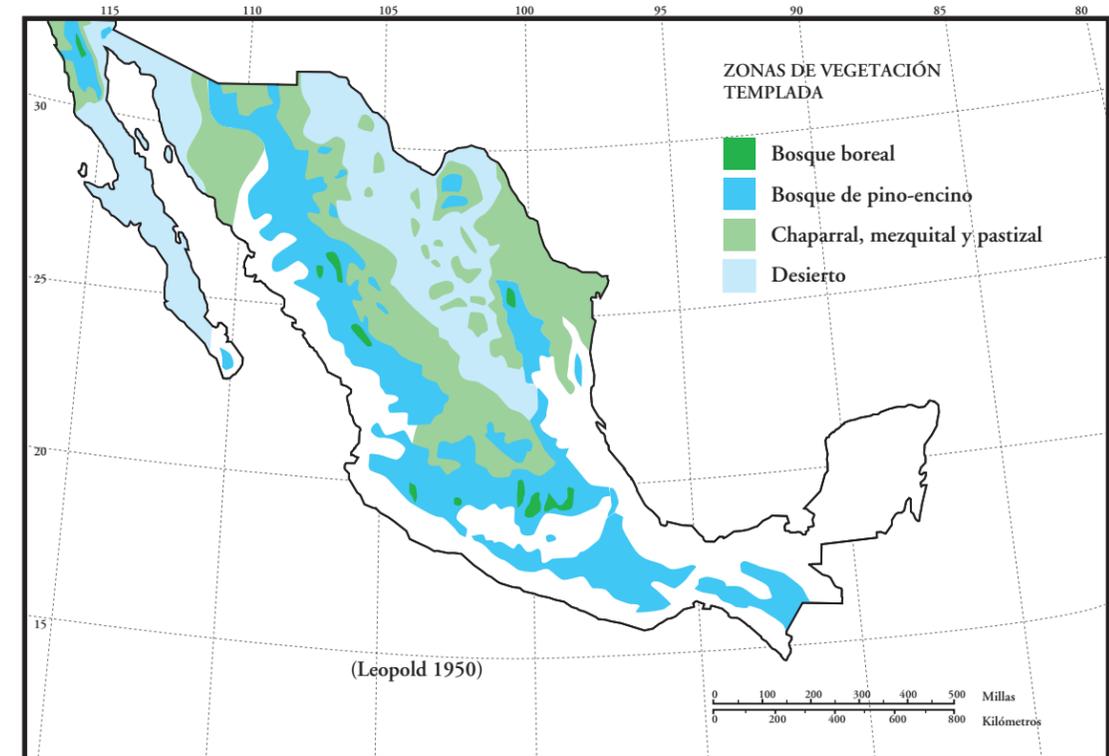


Figura 12. Zonas de vegetación templada de México (designadas por Leopold 1950)

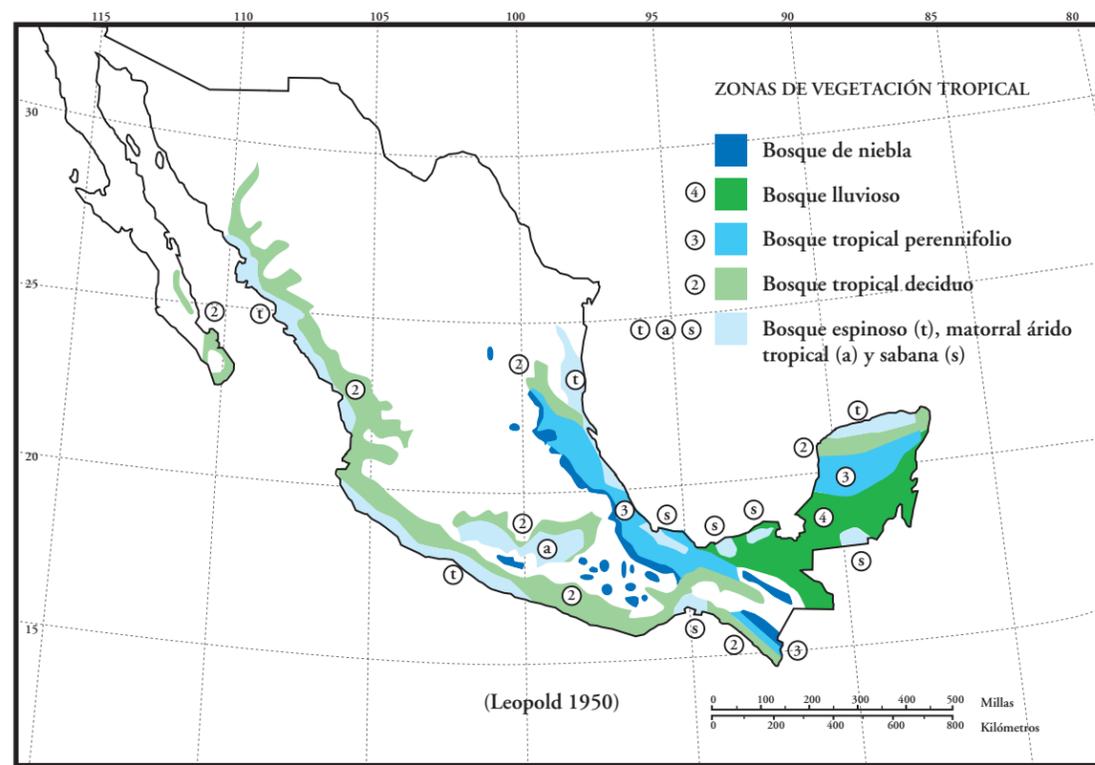


Figura 13. Zonas de vegetación tropical en México (designadas por Leopold 1950)

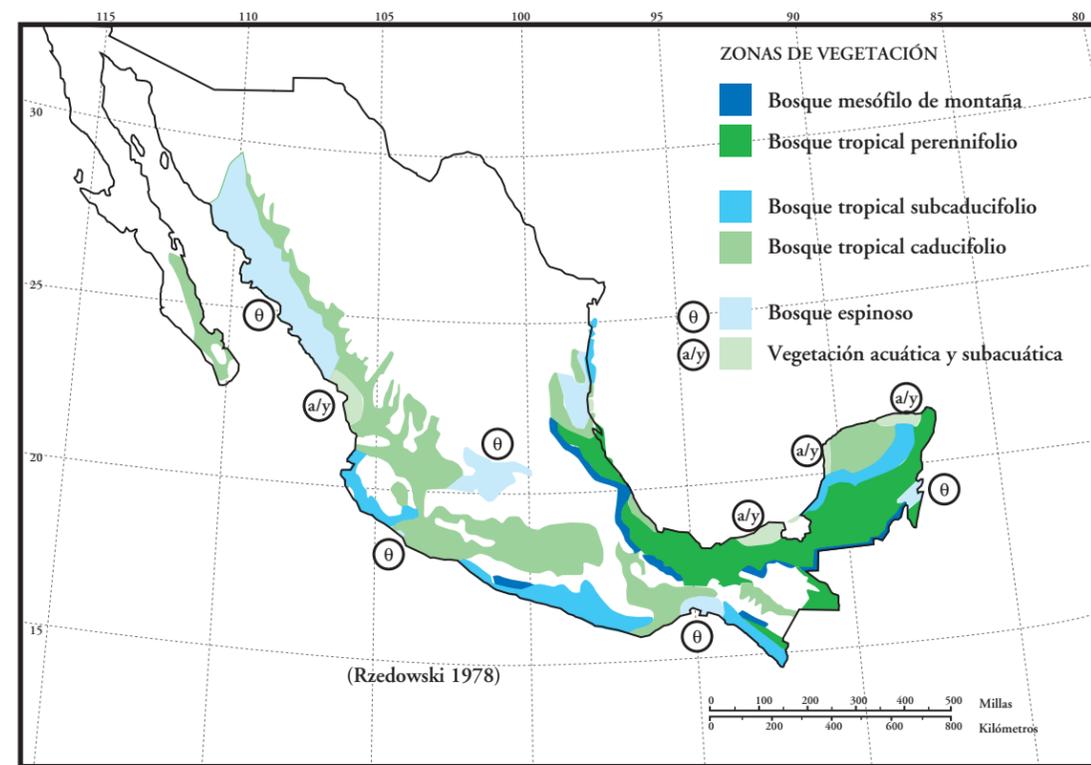


Figura 15. Zonas de vegetación tropical en México (designadas por Rzedowski 1978)

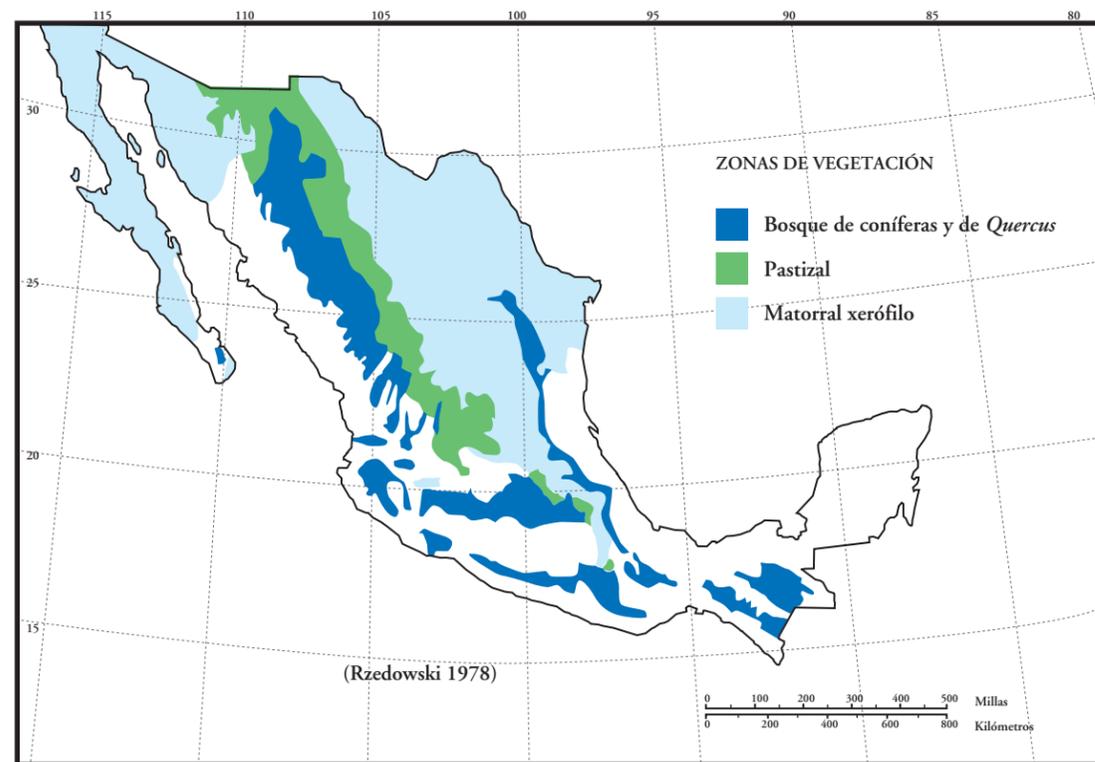


Figura 14. Zonas de vegetación templada en México (Designadas por Rzedowski 1978)



Bosque de pino piñonero (*Pinus pincheana*) mezclado con vegetación xerófila en el estado de Hidalgo, una muestra de la diversidad ecológica en la Sierra Madre Oriental.



Vista panorámica desde el Cerro "El Potosí" en el estado de Nuevo León, que muestra el gradiente ambiental asociado a la elevación y topografía del terreno montañoso, con la presencia de nubes a una altitud determinada.

6

ZONIFICACIÓN ESTATAL Y ALTITUDINAL PARA LA COLECTA Y MOVIMIENTO DE SEMILLAS DE CONÍFERAS EN MÉXICO

Cuaubtémoc Sáenz-Romero

Resumen

Introducción

Zonificación para la producción de semillas de especies forestales

Zonificaciones a nivel nacional y estatal para México

Zonificación con criterios altitudinales por especie

ZONIFICACIÓN ESTATAL Y ALTITUDINAL PARA LA COLECTA Y MOVIMIENTO DE SEMILLAS DE CONÍFERAS EN MÉXICO

Cuaubtémoc Sáenz-Romero

Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (INIRENA-UMSNH)
Apdo. Postal 12, Administración La Colina, Morelia, Michoacán 58141, México.
csaenz@zeus.umich.mx

Resumen

En México existe un acelerado proceso de deforestación. Los programas gubernamentales de reforestación son un importante esfuerzo, pero en general las plántulas tienen un porcentaje bajo de supervivencia, entre otras causas, por la falta de acoplamiento entre los genotipos de las plantas producidas en vivero y las condiciones ecológicas de los sitios a reforestar. Para mejorar tal acoplamiento, se requiere delimitar zonas productoras de semillas y establecer lineamientos para decidir el movimiento de germoplasma dentro y entre zonas productoras de semillas. Se ejemplifica la delimitación y uso de zonas productoras de semillas con una zonificación provisional del estado de México basada en criterios climáticos, y con una zonificación altitudinal basada en un ensayo de procedencias de *P. oocarpa* para la región de Uruapan, Michoacán.

Introducción

Los programas de reforestación, tanto de restauración ecológica como para establecer plantaciones comerciales, son uno de los esfuerzos más importantes que realizan los gobiernos y el sector privado para contrarrestar los efectos negativos de la deforestación, estimada para México en 668,000 ha/año (Masera et al. 1997), y para proveer de madera y productos celulósicos a la industria forestal y papelería. En México se plantan aproximadamente 210,000 ha anuales en el programa gubernamental de restauración ecológica llamado Programa Nacional de Reforestación, PRONARE (CONAFOR 2003). Si bien esto es un esfuerzo muy importante y loable, la supervivencia de estas reforestaciones desafortunadamente es muy baja, de aproximadamente el 34 % para el primer año (Sheinbaum y Masera 2000). Es de esperarse que la supervivencia sea aún menor en años posteriores. Una de las varias causas de la baja supervivencia, y en ocasiones pobre crecimiento de las plantas en los sitios reforestados, es la falta de acoplamiento entre los genotipos y las características ecológicas de los sitios a reforestar (Nienstaedt. 1979; Nienstaedt. 1994; Sáenz-Romero *et al.* 2003; Sáenz-Romero y Lindig-Cisneros. 2004). Por ello, es muy importante incrementar (entre otras cosas) ese acoplamiento para mejorar la supervivencia y el crecimiento de las plantas de las reforestaciones.

Zonificación para la producción de semillas de especies forestales

Para decidir el movimiento de semillas y plántulas entre el sitio en que se colecta la semilla y los lugares que se van a reforestar, es indispensable contar con lineamientos que permitan acoplar adecuadamente los genotipos a los ambientes, y con ello disminuir el riesgo de mala adaptación de las plantas a los sitios de plantación. Para ello se requiere delimitar zonas productoras de semillas (Rehfeldt. 1983a, 1983b; Campbell. 1986; Nienstaedt et al. 1990; Campbell. 1991; Sáenz-Romero y Clausen 1991; Sorensen. 1994). Una zona de producción o colecta de semillas se define como “un área o grupo de áreas sujetas a condiciones ecológicas suficientemente uniformes, en las cuales se encuentran rodales con características genéticas o fenotípicas uniformes”, y está definida por límites identificables en el campo (Barner y Willan. 1983). Esto se traduce en la práctica en un mapa en donde una región o estado se divide en regiones ecológicamente similares (Figura 1) (Millar y Libby 1991), y en donde en términos generales, la semilla que se colecta en una zona debe ser utilizada en esa misma zona (Nienstaedt. 1979). Eventualmente, la semilla de una zona puede ser utilizada en zonas adyacentes, bajo lineamientos específicos.

La “uniformidad” genética se refiere a la ausencia (o existencia en pequeña escala) de diferencias genéticas entre rodales dentro de una misma zona de producción de semilla, lo cual es demostrable sólo si se cuenta con resultados de ensayos de procedencias. En otras palabras, es indispensable conocer el patrón de la diferenciación genética entre poblaciones (Barner y Willan. 1983; Sáenz-Romero y Clausen. 1991). En el caso de México, en donde en general no existe la disponibilidad de tales resultados, es necesario hacer una zonificación provisional de la región de interés con base en información climática, topográfica, edáfica y de vegetación natural, que sirva de herramienta para planear la asignación de especies y procedencias a los sitios a reforestar (Nienstaedt et al. 1990; Sáenz-Romero y Clausen. 1991).

La altitud puede ser un criterio importante para establecer las zonas de producción de semillas. En países montañosos como Honduras, la altitud ha sido el criterio fundamental para establecer las zonas productoras de semillas (Robbins. 1983). En el ejemplo de la zonificación de California, USA (Figura 1), cada zona a su vez puede estar dividida en bandas altitudinales de 155 m (Millar y Libby.

1991). Las zonas para decidir el movimiento de semillas y plántulas de *Pseudotsuga menziesii* se basa en criterios altitudinales en Idaho (Rehfeldt. 1983b), Montana (Rehfeldt. 1983a), y en Oregon, USA (Campbell. 1986, 1991). En la provincia de Columbia Británica, Canadá, se utiliza una división en zonas bio-geo-climáticas (Meidinger y Pojar. 1991), que a su vez están subdivididas en intervalos altitudinales por especie (Jaquish, comunicación personal). Esto se fundamenta en que se ha demostrado que las poblaciones de especies de coníferas se diferencian genéticamente en un gradiente altitudinal, como respuesta a la presión de selección de variables ambientales. La diferenciación ocurre en variables tales como tasa de crecimiento, patrón de alargamiento de la yema apical y resistencia a heladas (Campbell. 1979; Rehfeldt. 1983a, 1983b, 1988, 1989, 1991).

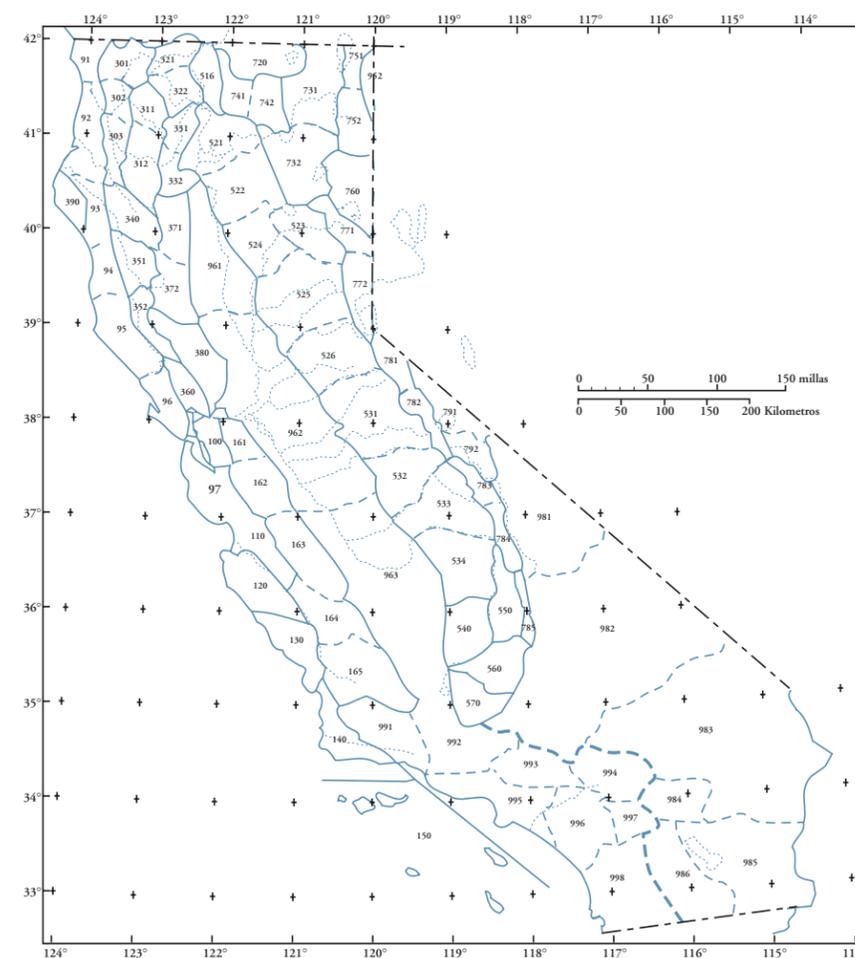


Figura 1. Mapa de zonas de semillas de especies forestales de California. Las zonas representan áreas con poblaciones que tienen similitud adaptativa. Las zonas a su vez están divididas en bandas altitudinales de 155 m, llamadas “unidades de cosecha” (Tomado de Millar y Libby. 1991).

Es de esperarse que la altitud sea una variable relevante en la diferenciación genética entre poblaciones de coníferas de México, ya que en nuestro país las coníferas se distribuyen fundamentalmente en las principales cadenas montañosas.

Zonificaciones a nivel nacional y estatal para México

Conkle (1997, y en este volumen) definió para todo el país de México grandes regiones, sub-regiones y zonas para la colecta y uso de semillas de especies forestales, con base en criterios geológicos, topográficos, precipitación pluvial total y estacional, temperaturas medias y tipos de vegetación. El resultado fue la división del país en nueve regiones, 34 sub-regiones y 64 zonas de semilla. Las tres categorías son jerárquicas; es decir, cada región está subdividida en dos o más sub-regiones, y éstas a su vez en zonas. Esta es una zonificación sumamente útil a gran escala, que permite auxiliar la planeación de necesidades y movimiento de semillas a nivel de especies para programas nacionales, tales como el PRONARE.

Si utilizamos la zonificación de Conkle (1997) para el Estado de México, por ejemplo, veríamos que ese estado en términos generales sólo se divide en dos sub-regiones denominadas “Cinturón Volcánico Transversal Este” (clave 720) y “Depresión del Balsas” (clave 810). En cuanto a la subsiguiente división en zonas de semillas, el Estado de México se divide únicamente en tres: la zona 721 (dentro de la sub-región 720) y las zonas 811 y 812 (dentro de la sub-región 810).

Un análisis de la variación ambiental del Estado de México con base en diferentes criterios nos puede conducir a una división en más zonas de semillas. En el análisis de Sáenz-Romero y Clausen (1991), se comparó la distribución natural de las principales especies de coníferas de ese estado (*Abies religiosa*, *Pinus hartwegii*, *P. montezumae*, *P. oocarpa* y *P. pseudostrobus*), con las isoyetas de precipitación total para los períodos mayo-octubre y noviembre-abril, y las isotermas de temperaturas máximas promedio para el período mayo-julio (Figura 2). En términos generales, las zonas de semillas se definieron dividiendo al estado en un primer paso en áreas según su precipitación total mayo-octubre, utilizando como límites las isoyetas de 700 mm, 900 mm y 1200 mm; las áreas resultantes a su vez se subdividieron en dos tipos de áreas: templado frías (menos de 21 °C de temperatura media máxima mayo-julio) y templado-cálidas (más de 21 °C de temperatura media máxima mayo-julio). Como elemento auxiliar, se utilizó la isoyeta de la precipitación total noviembre-abril. El resultado fue la división del Estado de México en nueve regiones o zonas productoras de semillas (Figura 3, Sáenz-Romero y Clausen. 1991). Desde luego, esta zonificación es provisional y debe ser confirmada por los resultados de ensayos de procedencias.

De manera aproximada, la zonificación de Conkle (1997) para el estado de México es compatible con la zonificación de Sáenz-Romero y Clausen (1991), en el sentido de que la segunda está (en términos generales) anidada en la primera. Las zonas 1 a la 8 definidas por Sáenz-Romero y Clausen (1991) quedarían englobadas dentro de la zona 721 (Cinturón Volcánico Transversal Este) de Conkle (1997), y la zona 9 (denominada Balsas) de Sáenz-Romero y Clausen (1991) quedaría englobada en las zonas 811 y 812 (ambas pertenecientes justamente a la sub-región “Depresión del Balsas) de Conkle (1997).

Con esto deseamos ilustrar que aún cuando dos clasificaciones pueden ser diferentes en cuanto a criterios utilizados, número de zonas y límites geográficos de éstas, si las comparamos territorialmente (es decir, las superponemos) es posible encontrar grandes similitudes. Desde el punto de vista práctico se podría sugerir que para una planificación a nivel nacional, en términos generales, se podría utilizar la clasificación de Conkle (1997), y para una planificación más detallada, se podría utilizar una clasificación semejante a la desarrollada por Sáenz-Romero y Clausen (1991) para el caso del estado de México y la de Nienstaedt *et al.* (1990) para los estados de Chihuahua y Durango. En esta última zonificación se utilizaron como límites de las zonas de semillas las isoyetas de precipitación total anual promedio de 600 mm, 800 mm, 1000 mm y 1200 mm, además de una división latitudinal en intervalos con una amplitud variable, en promedio aproximado de un grado de latitud (Nienstaedt *et al.* 1990).

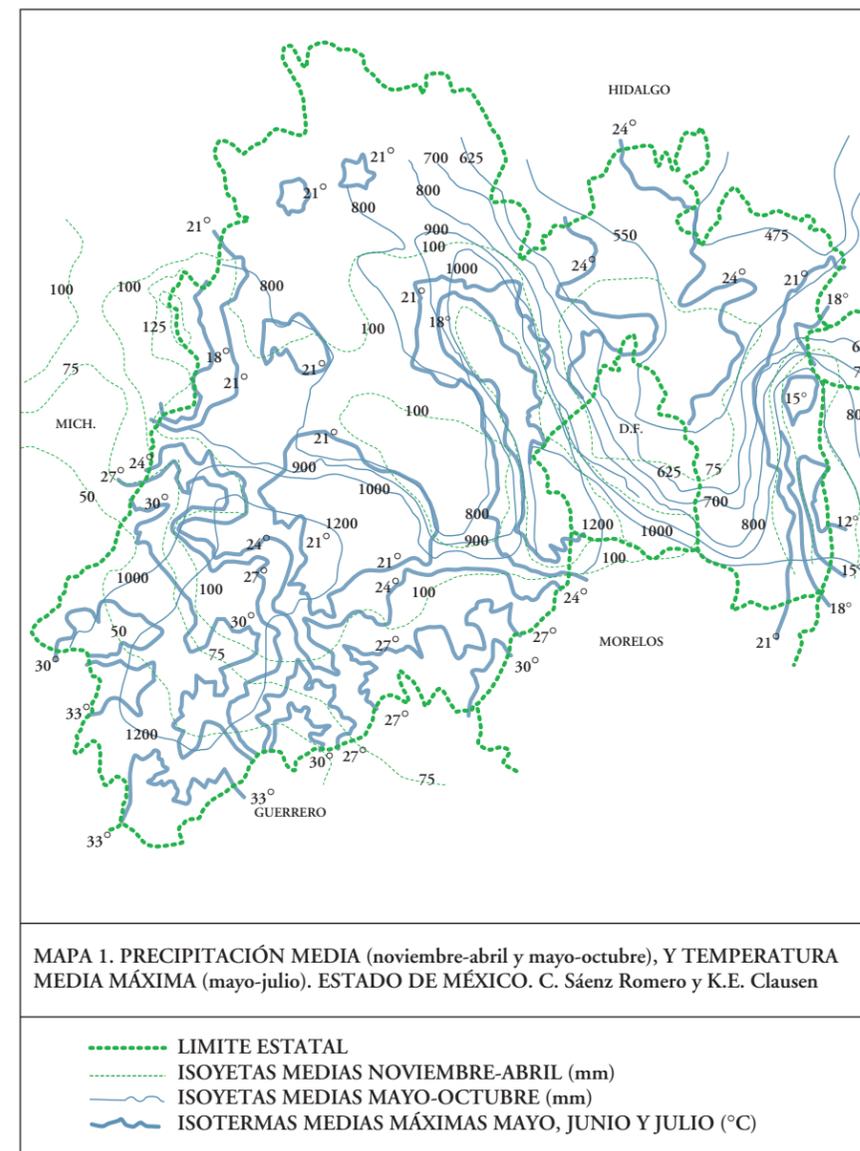


Figura 2. Precipitación media (mayo-octubre y noviembre-abril) y temperaturas medias máximas (mayo-julio) para el estado de México. Modificado de Sáenz y Clausen (1991).

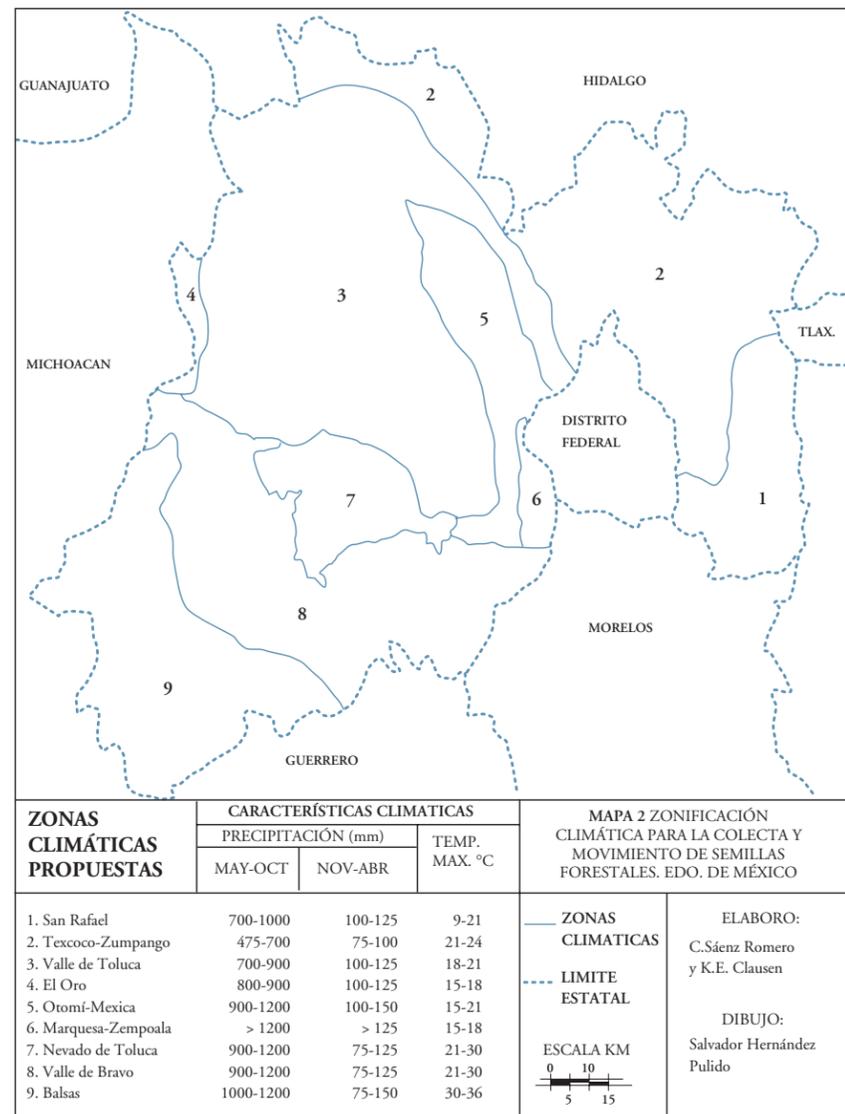


Figura 3. Zonificación climática para la colecta y movimiento de semillas forestales en el Estado de México. Modificado de Sáenz y Clausen (1991).

Zonificación con criterios altitudinales por especie

Dentro de cada una de las zonas semilleras se pueden establecer criterios altitudinales por especie para decidir el movimiento de semillas. Los criterios pueden variar de especie a especie, ya que el patrón de adaptación de las poblaciones a los gradientes altitudinales, y por tanto de diferenciación genética entre ellas, varía según la especie (Rehfeldt. 1994).

Para establecer una zonificación altitudinal el primer paso es demostrar si existe diferenciación genética altitudinal entre las poblaciones. Esto se puede lograr realizando un muestreo de poblaciones a

lo largo de un transecto altitudinal, y estableciendo uno o varios ensayos de procedencias. Utilizaremos indistintamente los términos “procedencia” o “población”. Un ensayo de procedencias establecido en una sola localidad con un diseño de bloques completos al azar, se podría analizar mediante el modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + P_j + BP_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

En donde Y_{ijk} = observación en la k-ésima planta de la j-ésima procedencia en el i-ésimo bloque, μ = efecto de la media general, B_i = efecto del i-ésimo bloque, P_j = efecto de la j-ésima procedencia, BP_{ij} = efecto de la interacción entre el i-ésimo bloque y la j-ésima procedencia, y ϵ_{ijk} = efecto del error.

Un análisis de la varianza (ANOVA) nos indicaría si existen o no diferencias significativas en el crecimiento entre las procedencias. En caso de que las hubiera, habría que demostrar si existe un patrón altitudinal bien definido. Una prueba múltiple de medias (como diferencia mínima significativa o de Tukey) nos indicaría si la diferenciación entre poblaciones sigue un patrón altitudinal. Es decir, de haber un patrón altitudinal, poblaciones originadas a altitudes semejantes probablemente no serían significativamente diferentes entre sí, mientras que poblaciones distantes en cuanto a origen altitudinal, si serían significativamente diferentes. También se podría hacer un análisis de regresión de altitud de origen vs. media de la población, y determinar si hay significancia estadística del modelo de regresión y de la pendiente.

A continuación y a manera de ejemplo, se construirá una zonificación altitudinal para decidir el movimiento de semillas y plántulas de *Pinus oocarpa* en la región de Uruapan, estado de Michoacán, México. Como primer paso, en un estudio del autor, se colectaron poblaciones de *Pinus oocarpa* a lo largo de un gradiente altitudinal (de 1100 a 1500 m de altitud, en la región de Uruapan, Michoacán, México). La semilla colectada se utilizó para establecer un ensayo de procedencias en campo, que se evaluó para altura de las plántulas a la edad de 2.5 años. Se encontró mediante un análisis de la varianza que existen diferencias significativas de la altura de las plantas entre procedencias ($p = 0.03$). Para fines de simplificación, se muestran en el Cuadro 1 los promedios por población de altura de plantas de sólo cuatro de las poblaciones muestreadas y evaluadas en el ensayo de procedencias en campo.

Es posible notar que las poblaciones originadas a menor altitud tuvieron un mejor crecimiento que las originadas a mayor altitud (Cuadro 1). Esto es una tendencia que se ha observado en otras especies de coníferas, aparentemente como resultado de la adaptación de las poblaciones al clima en donde crecen. Poblaciones que crecen a mayor elevación dentro del área de distribución altitudinal de la especie tienen un patrón de crecimiento más conservador, con un periodo de crecimiento más corto para evitar daños por heladas. En cambio, poblaciones que crecen a menor altitud, en condiciones de mayor temperatura promedio, tienen un período de crecimiento más largo en el año y, por tanto, un mayor potencial de crecimiento (Rehfeldt. 1988, 1989).

Cuadro 1. Altura promedio de plantas (2.5 años de edad) de cuatro poblaciones de *Pinus oocarpa* en un ensayo de procedencias. Se indica la altitud a la que fue colectada cada población y el agrupamiento que se obtiene mediante una prueba de diferencia mínima significativa (DMS).

Población	Altitud (m)	Altura promedio de plantas (mm)	Grupo de DMS
4	1220	465	A
3	1325	424	B
2	1430	421	B
1	1505	378	C

El siguiente paso es delimitar zonas altitudinales. Esto se hace estimando la magnitud de las diferencias mínimas significativas (DMS) entre las medias por población, y luego encontrando la equivalencia de ese valor en términos de intervalo altitudinal, sobre la base de que existe una fuerte asociación entre el potencial de crecimiento y el origen altitudinal de la población. La lógica de esto es que un lote de semillas colectado en un lugar determinado se puede mover dentro de un intervalo altitudinal en que el crecimiento de las plántulas no será significativamente diferente al crecimiento que obtendríamos si esa semilla se plantara en la localidad en la que se colectó. Si excedemos ese límite altitudinal, las plántulas podrían tener un crecimiento significativamente inferior (y en algunos casos, superior) al que se obtendría en la localidad de origen.

La DMS se estima de la siguiente manera:

$$DMS = t_{\alpha/2, g.l.=N-k} \sqrt{(2CME)/n}$$

En donde t = t de Student; α = error alfa (0.2 en nuestro caso); g.l. = grados de libertad; N = tamaño total de muestras; k = número de poblaciones comparadas; CME = Cuadrado medio del error como un estimador de la varianza entre poblaciones (BP_{ij} , que es el término de error apropiado para determinar si existen diferencias significativas entre las procedencias en nuestro modelo estadístico para el análisis de la varianza); y n = tamaño de muestra por población.

Como la finalidad es realizar una zonificación, y ya que se determinó que sí existen diferencias significativas entre procedencias a un nivel de $\alpha = 0.03$, nos permitiremos realizar la estimación de la DMS a un $\alpha = 0.2$. Si bien al lector le podría parecer un valor α excesivamente grande, esto en realidad es un enfoque conservador para fines de manejo, puesto que un valor alto de α resultará en un valor de DMS más pequeño, y en consecuencia, la amplitud de las bandas será menor, y con ello corremos menos riesgo de causar problemas de adaptación a las plantas si desplazamos demasiado en forma altitudinal una planta con respecto a su altitud de origen. Un valor más pequeño de α , por ejemplo $\alpha = 0.05$, si bien es lo convencional desde el punto de vista estadístico, resultará en un valor de DMS más grande, y por tanto las bandas altitudinales serán mucho más anchas. Esto nos conducirá a un mayor movimiento de las semillas y de las plántulas, con el consecuente mayor riesgo por problemas de adaptación.

Alternativamente, en lugar de la DMS se podría estimar el valor de la amplitud total del intervalo de confianza (IC) para la media de cada población. Debido a que un IC se usa como un valor que se suma o se resta a una media ($\bar{X} \pm IC$), la amplitud total del IC es el doble del IC. La fórmula para un IC es:

$$IC = t_{\alpha/2, g.l.=n-1} \sqrt{(CME)/n}$$

En nuestro ejemplo, se estimó la DMS en 33.2 mm. Una vez hecho esto, el siguiente paso es ajustar un modelo de regresión de altitud de origen de las poblaciones vs. altura promedio de las plantas. En este caso, ajustaremos un modelo de regresión lineal. Sin embargo, debe ajustarse el modelo que más convenga según la tendencia de los datos. En otras situaciones podría ajustarse un modelo cuadrático u otro. Para este ejemplo simplificado, usamos un modelo lineal, que es:

$$Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 X_i + \epsilon_{ij}$$

En donde Y_{ij} = altura promedio esperada de las plantas por población, β_0 = interceptada, β_1 = pendiente, X_i = altitud de origen de la población, ϵ_{ij} = error. En la Figura 4 se muestran los datos observados y los predichos con el modelo de regresión.

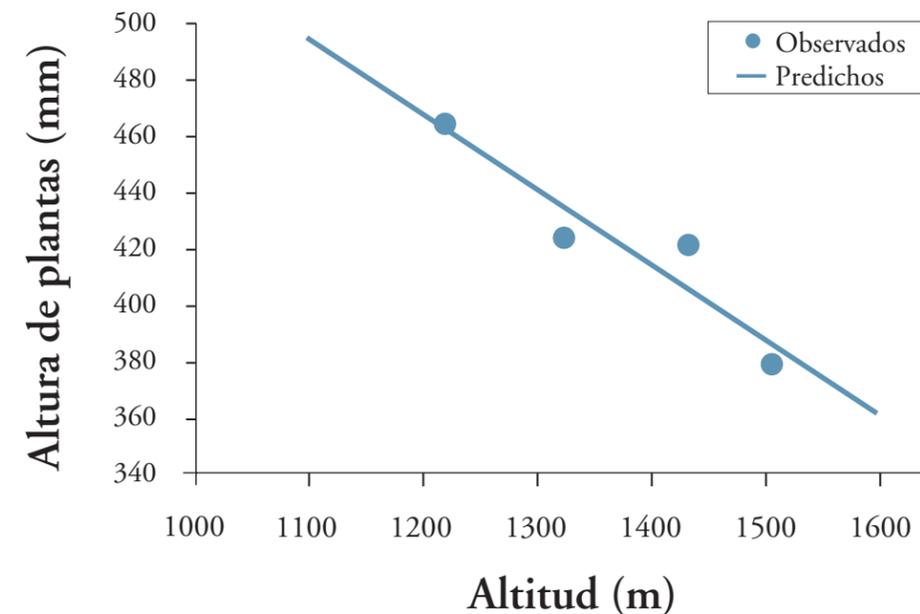


Figura 4. Medias observadas por población de la altura de plántulas de 2.5 años de edad de *P. oocarpa* en un ensayo de cinco procedencias colectadas en un gradiente altitudinal en la región de Uruapan, Michoacán, y valores predichos después de ajustar un modelo lineal.

El siguiente paso es establecer los límites altitudinales de las zonas de semillas. Esto se puede hacer de manera gráfica, trazando una primera línea paralela al eje de las X, hasta tocar la línea de los valores predichos con el modelo ajustado, y entonces encontrar su correspondiente valor altitudinal en el eje de las X (Figura 5). Esta primera línea se puede establecer de manera un tanto arbitraria. Se sugiere establecerla de manera que el correspondiente valor altitudinal sea equivalente al límite altitudinal superior o el límite altitudinal inferior del intervalo de distribución natural de la especie en la región estudiada. En nuestro ejemplo, la primera línea se fijó en los 495.4 mm de altura de planta promedio esperada (eje Y), y su correspondiente valor altitudinal es 1,100 m (eje X), que es aproximadamente el límite altitudinal inferior de la especie en la región de Uruapan, Michoacán, México (Figura 5).

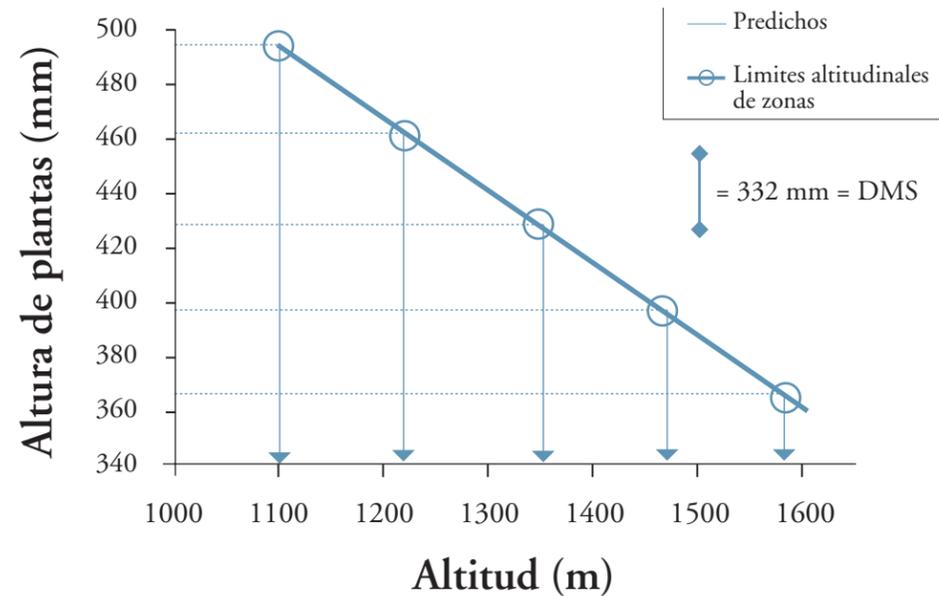


Figura 5. Límites altitudinales para cuatro zonas semilleras de *P. oocarpa* en la región de Uruapan, Michoacán.

Una vez establecida la primera línea, la siguiente línea se traza abajo de la primera línea de manera paralela al eje X, a una distancia de 33.2 mm (sobre el eje Y), que es el valor de la DMS. Luego, se encuentra su correspondiente valor altitudinal (en el eje X), que correspondería al límite altitudinal inferior de la primera zona de semillas. En nuestro ejemplo, la segunda línea corresponde a los 1,220 m de altitud. Este proceso se repite sucesivamente, hasta cubrir el intervalo altitudinal de distribución de la especie.

En nuestro ejemplo, el resultado es la delimitación de 4 zonas de semillas, que se presentan en el Cuadro 2. Los límites estimados pueden ser redondeados para simplificación operativa; en nuestro ejemplo, los valores de los límites estimados fueron redondeados para que todas las zonas semilleras tengan la misma amplitud: 120 m de intervalo altitudinal (Cuadro 2). Este es un resultado simplificado con fines explicativos. En nuestro análisis real, incluimos una población más y un modelo más complicado (cuadrático), con el resultado de delimitar zonas semilleras con un intervalo altitudinal variable para cada una de ellas.

Cuadro 2. Límites altitudinales de las cuatro zonas semilleras de *P. oocarpa* en la región de Uruapan, Michoacán, México.

Zona semillera	Limite altitudinal (m)		Limite altitudinal operativo (m)	
	Inferior	Superior	Inferior	Superior
1	1100	1220	1100	1220
2	1220	1350	1220	1340
3	1350	1465	1340	1460
4	1465	1585	1460	1580

La semilla colectada en una zona semillera, en términos generales, se debe utilizar dentro de la zona en que se colectó y/o en un intervalo altitudinal de ± 60 m, que corresponde a la mitad de la anchura del intervalo altitudinal de una zona semillera, que es de 120 m. De esta manera, se esperaría que el crecimiento de las plantas en el sitio reforestado no fuera significativamente diferente al crecimiento esperado si las plantas se hubieran plantado en el mismo sitio en que se colectó la semilla. Esto sería un mecanismo para evitar los riesgos de no-adaptación de los genotipos a los ambientes del sitio a reforestar.

Considerando la tendencia clinal de los datos presentados (Cuadro 1, Figura 4), resulta evidente que si movemos una fuente de semillas altitudinalmente hacia arriba, más allá de los límites de la zona productora de semilla en la que se colectó, tendremos un mayor crecimiento que el de la semilla local. Esto se confirma con los resultados presentados en el Cuadro 1, ya que el ensayo de campo se estableció a 1,500 m de altitud, y por tanto de hecho las poblaciones 2, 3 y 4 (originadas a 1400 m, 1,300 m y 1,200 m, respectivamente), fueron desplazadas altitudinalmente hacia arriba (hasta los 1,500 m) para establecer el experimento. Sin embargo, es posible que el movimiento de semillas más allá de los 1,500 m de altitud pudiera representar un riesgo de baja adaptación para las poblaciones originadas a menor altitud. Esto se podría expresar, por ejemplo, en forma de daños por heladas. Si bien ese riesgo no se puede cuantificar con base en los resultados del Cuadro 1, lo razonable sería no desplazar la semilla más allá de los 1,500 m de altitud. Por otra parte, si se desplaza la semilla altitudinalmente hacia abajo más allá de los 60 m de altitud, es de esperarse un crecimiento significativamente menor al que se obtendría si se utilizara la semilla local.

Finalmente, el desplazamiento de la semilla en forma altitudinal hacia arriba podría ser una estrategia adecuada para prevenir los efectos negativos de una baja adaptación de las poblaciones a un futuro escenario de calentamiento global. En otras palabras, los valores de altitud en el eje X de la Figura 4 podrían ser sustituidos por valores que representaran el clima de cada lugar; por ejemplo, temperatura promedio anual. En un escenario de calentamiento global, los valores de temperatura del eje X se desplazarían hacia la derecha. Por ejemplo, en el futuro y como resultado del calentamiento global, la temperatura promedio anual de un sitio a 1,100 m podría ser la temperatura que correspondería a un sitio más elevado, digamos 1,200 o 1,300 m, mientras que en ese mismo escenario futuro, el sitio a 1,100 m sería más cálido de lo que es ahora. Esto indudablemente conduciría a problemas de adaptación de las poblaciones a las nuevas condiciones climáticas del sitio en el que crecen (Rehfeldt. 2000). Una manera de aminorar los efectos de esa no-adaptación futura, sería desplazar hacia arriba las semillas de las poblaciones naturales en el presente. La decisión precisa de en que medida debe ser el desplazamiento para enfrentar el calentamiento global requiere de conocer las condiciones climáticas actuales de cada procedencia y de estimaciones del incremento esperado en la temperatura en un determinado período de años, lo cual excede las pretensiones de este texto. Sin embargo, cabe la invitación a reflexionar sobre este tema.

Agradecimientos

Se agradece el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y de la Comisión Nacional Forestal CONAFOR (proyecto CONACYT-CONAFOR 2002-C01-4655) y de la Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (proyecto 5.1) a CSR. Se agradece la ayuda de Daniel Saldívar, Ernesto Moreno y muchas personas más de la Comisión Forestal de Michoacán (COFOM) para la colecta de semillas y establecimiento del ensayo de procedencias; a Ulises y Miguel Angel Amezcua, Cuarayo, Ejido San José de Cañas, Municipio de Ario de Rosales, Michoacán, para el mantenimiento del ensayo y a Rubén Ricardo Guzmán y Guadalupe Hernández por su ayuda en las mediciones de campo. Jerry Rehfeldt, del Intermountain Research Station, USDA-Forest Service, Moscow, Idaho, USA, proporcionó invaluable asesoría para la delimitación de las zonas semilleras y comentarios para mejorar el texto.

Literatura citada

- Barner, H y R.L. Willan. 1983. The concept of seed zones. *In*: Seed Collection Units: 1. Seed Zones. Technical Note No. 16. Danida Forest Seed Centre, Humlebaek, Dinamarca.
- Campbell, R.K. 1979. Genecology of Douglas-fir in a watershed in the Oregon Cascades. *Ecology* 60(5): 1036-1050.
- Campbell, R.K. 1986. Mapped genetic variation of douglas-fir to guide seed transfer in southwest Oregon. *Silvae Genet.* 35(2-3):85-96.
- Campbell, R.K. 1991. Soil, seed-zone maps, and physiography: guidelines for seed transfer of douglas-fir in Southwestern Oregon. *For. Sci.* 37(4):973-986.
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR), 2003. Metas del Programa Nacional de Reforestación. http://www.conafor.gob.mx/programas_nacionales_forestales/pronare/metas_2002.htm
- Conkle, M.T. 1997. Zonificación de semillas en México. *In*: J.J. Vargas-Hernández, B. Bermejo, y T. Ledig, (eds), Manejo de Recursos Genéticos Forestales. Montecillo, México. Programa Forestal, Colegio de Postgraduados. pp: 67-88.
- Jaquish, B. 2002. Research Scientist, Forest Genetics, British Columbia Ministry of Forests, Research Branch, Kalamalka Forestry Centre, 3401 Reservoir Road, Vernon BC Canada V1B 2C7. barry.jaquish@gems7.gov.bc.ca
- Masera, O. R., M.J. Ordóñez y R. Dirzo, 1997. Carbon emissions from Mexican forests: Current situation and long-term scenarios. *Climatic Change* 35: 265-295.
- Meidinger, D. y Pojar, J. 1991. Ecosystems of British Columbia. Victoria, B.C., Ministry of Forests. 330 p.
- Millar, C. I. y W.J. Libby, 1991. Strategies for conserving clinal, ecotipic, and disjunct population diversity in widespread species. *In*: D.A. Falk and K.E. Holsinger (eds.), Genetics and Conservation of Rare Plants, Oxford University Press, New York.
- Nienstaedt, H. 1979. Seed zoning and certification. *In*: Tree improvement; short course for field foresters. Northeastern Area State & Private Forestry. USDA, Forest Service - Department of Natural Resources - University of Minnesota; June 11-15, 1979, Jill City, Minn., USA. pp: 40-52.
- Nienstaedt, H., 1994. Reforestación en México con semilla mejorada. *Boletín Mendel (Sociedad Mexicana de Genética)* 3(1): 3-6.
- Nienstaedt, H., K. E. Clausen and T. Eguiluz-Piedra, 1990. La primera zonificación de semillas en México: caso Durango y Chihuahua. *Nota Técnica 6. Centro de Genética Forestal, A. C., Chapingo, México.* 9 p.
- Rehfeldt, G.E. 1983a. Seed Transfer guidelines for Douglas-fir in western Montana. Research Note INT-329. Intermountain Forest and Range Experiment Station, Forest Service, USDA, USA. 4 p.
- Rehfeldt, G.E. 1983b. Seed Transfer guidelines for Douglas-fir in Central Idaho. Research Note INT-337. Intermountain Forest and Range Experiment Station, Forest Service, USDA, USA. 4 p.
- Rehfeldt, G.E. 1988. Ecological genetics of Pinus contorta from the Rocky Mountains (USA): a synthesis. *Silvae Genet.* 37(3-4):131-135.
- Rehfeldt, G.E. 1989. Ecological adaptations in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *glauca*): a synthesis. *For. Ecol. Manage.* 28:203-215.
- Rehfeldt, G.E. 1991. A model of genetic variation for Pinus ponderosa in the Inland Northwest (USA): applications in gene resource management. *Can. J. For. Res.* 21:1491-1500.
- Rehfeldt, G.E. 1994. Adaptation of Picea engelmannii populations to the heterogeneous environments of the Intermountain West. *Can. J. Bot.* 72:1197-1208.
- Rehfeldt, G. E. 2000. Genes, climate and wood. The Leslie L. Schaffer Lectureship in Forest Science. University of British Columbia, Vancouver, B. C., Canada.
- Robbins, A.M.J. 1983. Pine provenance regions within Honduras. *In*: Danida Forest Seed Center (Ed.) Seed Collection Units: 1. Seed Zones. Technical Note No. 16. Danida Forest Seed Center, Humlebaek, Dinamarca.
- Saenz-Romero, C. y K.E. Clausen, 1991. Zonas Provisionales de producción de semillas de especies forestales en el Estado de México. *Nota Técnica 7. Centro de Genética Forestal, A. C., Chapingo, México.* 8 p.

Sáenz-Romero, C., Snively, A. and Lindig-Cisneros, R. 2003. Conservation and restoration of pine forest genetic resources in México. *Silvae Genet.* 52 (5-6):233-237.

Sáenz-Romero, C. y Lindig-Cisneros, R. 2004. Evaluación y propuestas para el programa de reforestación en Michoacán, México. *Ciencia Nicolaita* 37:107-122

Sheinbaum, C. y Masera, O., 2000. Mitigating carbon emissions while advancing national development priorities: the case of Mexico. *Climatic Change* 47: 259-282.

Sorensen, F.C. 1994. Genetic variation and seed transfer guidelines for ponderosa pine in central Oregon. United States Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. Research Paper PNW-RP-472. Portland, OR. 24 p.

7

ABASTO Y MANEJO DE SEMILLAS A PARTIR DE LA RECOLECCIÓN EN RODALES NATURALES, ÁREAS DE PRODUCCIÓN Y HUERTOS SEMILLEROS

Barry C. Jaquish

Introducción

Planificación

Satisfacción de las necesidades inmediatas, a corto y a largo plazo de semilla

Satisfacción de las necesidades inmediatas de semilla con recolección de rodales naturales

Satisfacción de las necesidades de semilla a corto plazo con áreas de producción de semilla

Satisfacción de las necesidades de semilla a largo plazo con huertos semilleros

Conclusiones

ABASTO Y MANEJO DE SEMILLAS A PARTIR DE LA RECOLECCIÓN EN RODALES NATURALES, ÁREAS DE PRODUCCIÓN Y HUERTOS SEMILLEROS

Barry C. Jaquish

Kalamalka Research Station, Research Branch, British Columbia Ministry of Forests,
3401 Reservoir Road, Vernon, British Columbia V1B 2C7, Canada

Introducción

Conforme la población humana en el mundo continúa su crecimiento y consume madera a una tasa cercana a 0.7 m³ *per capita* al año, es razonable presumir que se mantendrá la demanda por fibra y otros productos de madera de alta calidad, y probablemente aumentará en forma proporcional (Kimmins. 1995). Sin duda, esta demanda por fibra de madera continuará imponiendo una seria amenaza a los bosques del mundo. Dada la carencia a nivel mundial de reservas existentes de bosque aún no comprometidas, y la reducción en la disponibilidad de terrenos en donde se pueden cultivar bosques comerciales, también es razonable presumir que mucha de esta demanda de madera será satisfecha mediante prácticas de manejo más intensivas en una superficie de terreno más reducida. Esto implica manejar sitios de alta calidad con las especies apropiadas, silvicultura apropiada (por ejemplo, preparación de sitio, control de vegetación competidora, niveles de densidad apropiados, podas, fertilización y protección), y plantación de individuos que estén genéticamente adaptados al sitio. Estos individuos deben ser de rápido crecimiento, adaptados fisiológicamente al sitio, suficientemente flexibles para soportar las tensiones bióticas y abióticas del futuro, y deben expresar las características deseadas para lograr los objetivos de manejo.

Históricamente, en muchas partes del mundo, el germoplasma empleado para el establecimiento de plantaciones forestales se recolectó en rodales naturales; en muchos casos con poca o ninguna integridad en términos de procedencia (localidad de la fuente de semilla) o nivel de mejoramiento genético. Eventualmente, la experiencia práctica y los resultados de investigación demostraron que una semilla de calidad alta, bien adaptada y de las especies apropiadas era esencial para una reforestación artificial exitosa. Con el paso del tiempo, la comprensión de la biología y de la autoecología de las especies leñosas avanzó rápidamente, y los métodos y tecnologías de adquisición de semilla avanzaron en forma paralela, particularmente para especies de valor comercial. Actualmente existen varios métodos de obtención de semilla disponibles para las organizaciones que requieren grandes cantidades de semilla de alta calidad para la reforestación. Este documento presenta tres de los métodos más comúnmente usados: (1) recolección en rodales naturales, (2) áreas de producción de semilla, y (3) huertos semilleros. Estos tres métodos ofrecen ventajas y desventajas distintas que deben considerarse antes de involucrarse en programas de reforestación artificial a gran escala.

Planificación

La planificación sesuda y juiciosa es esencial antes de invertir en programas de reforestación artificial y mejoramiento genético forestal a largo plazo. Estos programas son costosos, con inversiones relativamente riesgosas que requieren de personal altamente calificado (silvicultores, genetistas, planificadores, fisiólogos de árboles, ecólogos, suministradores de semilla, y personal de viveros y protección) y cantidades enormes de semilla a fin de ser eficientes en términos de costos. Es también importante reconocer que los beneficios económicos de la reforestación artificial nunca se obtendrán totalmente sin las prácticas silvícolas apropiadas y un programa asociado de mejoramiento genético forestal que sistemáticamente mejore las características como la velocidad de crecimiento, la forma del tronco y tamaño de copa, la calidad de la madera y la resistencia a plagas y enfermedades. El mejoramiento genético rara vez rescatará el efecto de prácticas silvícolas inadecuadas y, por otro lado, los beneficios de prácticas silvícolas adecuadas nunca se expresarán totalmente sin los beneficios de un programa de mejoramiento genético.

Inicialmente, el proceso de planeación debe identificar claramente las metas sociales y económicas del programa de reforestación, y debe proporcionar:

1. Estimación precisa del tamaño, ubicación y condiciones ecológicas de los terrenos a reforestar.
2. Identificación de las especies deseadas y los productos finales.
3. Descripción de la biología, autoecología y el sistema genético (por ejemplo, subdivisión de la población, sistema de cruzamiento, patrones de variación genética adaptativa y varianzas y covarianzas genéticas de características adaptativas y de valor comercial) de las especies deseadas, a fin de predecir las ganancias genéticas y establecer zonas de producción de semilla y lineamientos de traslado de germoplasma biológicamente adecuados.
4. Estimación precisa del número de semillas requeridas para reforestar los terrenos y los tiempos de su requerimiento.
5. Identificación del nivel de mejoramiento genético deseado para el área bajo manejo.

No todas las áreas deben recibir el mismo nivel de prioridad al momento de planear los programas de mejoramiento genético o de reforestación. Muchas organizaciones estiman sus necesidades futuras de semilla a partir de los planes de cosecha (20-50+ años) y prescripciones silvícolas. En áreas en donde la plantación es el método recomendado de reforestación, se identifica el nivel apropiado de mejoramiento genético y se hacen planes para satisfacer las necesidades inmediatas, a corto y a largo plazo,

de semilla. Típicamente, las metas de producción de semilla deben exceder las necesidades proyectadas de semilla para asegurar que se tenga un abastecimiento constante.

Satisfacción de las necesidades inmediatas, a corto y a largo plazo de semilla

Satisfacción de las necesidades inmediatas de semilla con recolección de rodales naturales

La recolección de semilla en rodales naturales constituye el método principal de obtener semilla de las especies deseadas sin programas de mejoramiento genético, ni huertos semilleros, o de especies cuyos huertos semilleros aún no inician la producción. Desafortunadamente, en la mayoría de las especies leñosas, la semilla obtenida de rodales naturales ofrece una oportunidad limitada para el mejoramiento genético en características de baja heredabilidad como altura del árbol, diámetro y volumen, y una oportunidad modesta para el mejoramiento genético en características de alta heredabilidad como forma del tronco, tamaño y ángulo de las ramas, y resistencia a plagas. De mayor importancia en la recolección de semilla de rodales naturales es reducir el riesgo de recolectar y establecer material que tiene “menos” potencial genético que la semilla de los rodales existentes que se van a reemplazar (Lester *et al.* 1990), lo cual puede suceder fácilmente si la semilla se distribuye en toda el área sin tomar en cuenta los efectos de procedencia o los patrones de diferenciación genética adaptativa.

Si se han establecido lineamientos de transferencia de semilla biológicamente adecuados para las especies, deben usarse para orientar la ubicación de semilla obtenida en rodales sanos y vigorosos, superiores al promedio en tamaño y calidad del tronco, y representativos del área en donde se va a plantar. Siguiendo estos lineamientos de traslado de semilla, las pérdidas de plántulas debido a una mala adaptación se minimizarán. Con frecuencia un buen año de producción de semilla proveerá las cantidades adecuadas de semilla a bajo costo para satisfacer los requerimientos de plantación de varios años.

Las desventajas principales de la recolección de semillas en rodales naturales son la carencia general de control sobre la calidad genética de la semilla y sobre la periodicidad o tamaño de la cosecha de semilla. Por ejemplo, en la mayoría de coníferas de clima templado existe cierto grado de relación genética entre árboles vecinos dentro del rodal. En años de baja producción de polen, el cruzamiento de estos árboles vecinos típicamente produce semilla con cierto grado de consanguinidad que germina pobre y erráticamente (Woods y Heaman. 1989), y crece lentamente (Wilcox. 1983). Por lo tanto, la semilla de rodales naturales debería colectarse únicamente en años con producción moderada o abundante de conos. La periodicidad en la producción de semilla puede ser un problema serio, particularmente en especies de mayores latitudes o elevaciones, como *Picea glauca*, donde son comunes intervalos de 10-20 años entre cosechas abundantes de semilla (Nienstaedt y Zasada. 1990).

Cuando existe información sobre procedencias, la calidad genética de la semilla de rodales naturales puede mejorarse simplemente cosechando la semilla de áreas con una superioridad genética conocida. En la mayoría de las especies de clima templado estas áreas superiores comúnmente ocurren en elevaciones bajas donde la productividad del sitio es alta, el clima es favorable y el período libre de heladas es relativamente largo (Rehfeldt. 1994). Dentro de estas áreas superiores, las recolecciones de semilla deben concentrarse en los mejores rodales y los mejores individuos dentro del rodal. Deben usarse lineamientos de transferencia de semilla para orientar la distribución de ésta y asegurar que cualquier ganancia genética que se acumule debido a la selección fenotípica no se pierde debido a problemas de adaptación.

Los conos de estos rodales se pueden colectar escalando los árboles, derribándolos o desde helicópteros. Actualmente, en Columbia Británica, en especies en que no se dispone de semilla de huertos semilleros o donde los caminos de acceso son difíciles, la recolección de semilla con helicóptero en rodales naturales es todavía el método más importante de obtener semilla (Wallinger. 1985). En general, el costo por kilogramo de semilla en recolecciones con helicóptero es ligeramente más elevado que las recolecciones desde el suelo, pero el aumento en los costos se compensa por la capacidad de: (1) recolectar grandes cantidades de semilla en un tiempo corto, (2) vigilar fácilmente el desarrollo de la semilla y evitar la recolección de semilla inmadura, y (3) proporcionar acceso fácil a rodales superiores en áreas remotas.

Satisfacción de las necesidades de semilla a corto plazo con áreas de producción de semilla

Un paso más allá de la recolección oportuna de semillas en rodales naturales es la designación de ciertos rodales deseables de alta calidad, como áreas de producción de semilla (Lester *et al.* 1992). Estos rodales se usan ampliamente en organizaciones con programas jóvenes de mejoramiento genético, o en zonas de plantación donde no se prevé el establecimiento de un programa de mejoramiento genético intensivo, pero se requiere cierto nivel de mejoramiento genético. Al igual que en las recolecciones de semilla de rodales naturales, la mayoría de las áreas de producción de semilla comúnmente proporcionan semilla en forma temporal (interina) hasta que los huertos semilleros inician la producción. El nivel de manejo en las áreas de producción de semilla puede variar desde ningún manejo, hasta la selección intensiva de árboles semilleros, la remoción de árboles no deseables y el uso de técnicas culturales como la fertilización y el anillado (obstrucción del floema) para aumentar la producción de semilla.

La semilla colectada en áreas de producción de semilla sin manejo tiene ventajas y desventajas similares a la recolección en rodales naturales. Frecuentemente estas áreas de producción de semilla sin manejo son simplemente rodales designados para la producción de semilla y se cosechan cada vez que existe una producción adecuada de conos. Si los rodales se excluyen de los programas de cortas, se pueden considerar como una fuente de semilla bien adaptada a largo plazo de un área designada, que puede obtenerse a un costo razonable.

En áreas de producción de semilla, la calidad genética y el tamaño de la cosecha se pueden mejorar y la periodicidad se puede reducir mediante el manejo apropiado del rodal (El-Kassaby y Jaquish. 1995), el uso de técnicas culturales como el anillado (obstrucción del floema) y la fertilización (Graham 1985) y, en algunos casos, con la aplicación de giberelinas $AG_{4/7}$ (Ross. 1991). Al eliminar los árboles indeseables y malformados, y reducir el número de árboles deseables, las copas de los árboles selectos pueden aumentar en tamaño, lo cual permite mayores producciones de conos y, en algunas especies, menos semilla endogámica (El-Kassaby y Jaquish. 1995). Además, en algunas especies, esta selección fenotípica podría resultar en ganancias genéticas modestas en volumen, y ganancias genéticas moderadas para características de alta heredabilidad como la forma de tallo, hábito de ramificación y resistencia a plagas.

Localización, establecimiento y manejo de áreas de producción de semilla

Idealmente, las áreas de producción de semilla deben ubicarse dentro de la zona geográfica y distribución altitudinal adecuada al área de plantación. Estas áreas deberían ubicarse razonablemente cerca de una fuente de mano de obra y tener buenos caminos de acceso al rodal todo el tiempo. Esto es

particularmente importante si el área de producción de semilla va a servir como una fuente de semilla, a largo plazo, que las cuadrillas de recolección visitarán regularmente. Las áreas de producción de semilla deben ubicarse en rodales o plantaciones con una densidad completa y edad suficiente (25-30+ años) para producir cosechas de semilla viable y tener una copa suficiente grande para producir cosechas grandes. El terreno dentro del rodal debe ser razonablemente plano o con pendiente suave para permitir el movimiento fácil de las personas, maquinaria y equipo. Las áreas normalmente son de 5 a 10 hectáreas en tamaño, y deben contener muchos árboles padre bien distribuidos para reducir los efectos de polen extraño.

Los árboles dominantes/codominantes que se seleccionan como árboles padre deben ser superiores al tamaño promedio (altura y diámetro), vigorosos, de tronco recto y cilíndrico, características de ramificación ligeras y estar libres de plagas y enfermedades. Deben también tener copas de tamaño suficiente para producir cosechas grandes de cono. El rodal debe contener de 100 a 150 árboles por ha, después del aclareo. Los árboles semilleros no deben estar agrupados, ya que esto podría resultar en un aumento de la consanguinidad dentro del rodal. Debe dejarse una zona de protección (amortiguamiento) alrededor del rodal para reducir la afluencia de polen exterior al rodal y eliminar los fenotipos inferiores en un perímetro de cinco veces la altura promedio de los árboles. Durante el aclareo se debe tener cuidado de evitar daños a las copas de los árboles residuales, y de derribos posteriores por viento.

Después del aclareo toda el área de producción de semilla debe limpiarse para reducir el peligro de incendio, la amenaza de insectos y enfermedades y facilitar el acceso dentro del rodal. La fertilización con nitrato de amonio o de calcio al momento del rompimiento de la yema vegetativa estimula la regeneración de la copa, y en algunas especies aumenta la floración del rodal (Ebell. 1972). Los tratamientos culturales como el bloqueo parcial del tallo (anillado) justo abajo de la copa viva (Graham. 1985) o la aplicación de giberelinas $AG_{4/7}$ (Ross. 1991) puede aplicarse en forma aislada o en combinación con árboles individuales para estimular la floración. A lo largo de la temporada de crecimiento es importante inspeccionar el rodal a intervalos regulares para vigilar el desarrollo de la semilla, identificar cualquier plaga o enfermedad que pudiera comprometer la cosecha de semilla y, si es necesario, realizar la acción terapéutica para reducir los efectos de estas plagas.

El método de cosechar los conos del área de producción de semilla es principalmente una función de los objetivos de manejo del área. Si el área de producción de semilla es temporal, el área puede cosecharse mediante derribo de los árboles y los conos pueden recogerse en el suelo. Si el área de producción de semilla es semi-permanente y debe administrarse para proporcionar un abastecimiento constante de semilla de alta calidad, la colecta de conos debe realizarse escalando los árboles o, en algunos casos, con agitadores mecánicos de árboles.

Experiencias con áreas de producción de semilla

En los trópicos, las áreas de producción de semilla han sido relativamente exitosas, particularmente con especies de pino introducidas (Zobel y Talbert. 1984). Desafortunadamente, la experiencia en áreas boreales y templadas ha tenido resultados variables. Las áreas de producción de semilla en especies como *Pinus ponderosa*, *P. contorta* y *P. monticola* han sido fuentes de semilla confiables y consistentes (Konishi. 1985). Sin embargo, en otras especies occidentales como *Picea glauca*, *Pseudotsuga menziesii* y *Larix occidentalis*, las áreas de producción de semilla han sido menos exitosas. En algunas de estas especies las áreas de producción de semilla han proporcionado ocasionalmente un abasto uniforme de semilla, pero en general las cosechas de semilla han sido esporádicas. En muchas organizaciones, las áreas de

producción de semilla para estas especies se han discontinuado o derribado al presentarse una cosecha abundante de semilla (Konishi. 1985). En el oriente de Canadá, donde las estructuras reproductivas en rodales naturales de *Picea glauca* son dañadas regularmente por insectos, las áreas de producción de semilla han generado cantidades razonables de semilla. Dentro de estas áreas pequeñas se pueden aplicar fácilmente pesticidas para proteger la producción de conos y semillas de los insectos dañinos.

Satisfacción de las necesidades de semilla a largo plazo con huertos semilleros

En muchas organizaciones, los huertos semilleros son el método principal de producción de semillas para abastecer los programas de plantación a gran escala y obtener las ganancias genéticas de los programas de mejoramiento genético. Estos huertos son colecciones de árboles que se han seleccionado para características específicas, establecidos en una localidad y manejados para producir cosechas de semillas frecuentes, abundantes y de fácil recolección. Los huertos se establecen generalmente para producir semilla para una zona en particular dentro de la cual la semilla puede moverse libremente y permanecer adaptada a las variaciones ambientales locales. Existen dos tipos de huertos semilleros (sexuales y clonales) disponibles al encargado de la producción de semilla. Los huertos sexuales se establecen plantando individuos por familia en un sitio. Conforme se dispone de información sobre el desempeño en campo de éstas, las peores familias e individuos dentro de familias se eliminan del huerto, dejando únicamente las mejores para su reproducción. Los huertos semilleros clonales se establecen por medios vegetativos, propagando árboles selectos por medio de injertos, enraizado de estacas, o cultivo de tejidos. Existen ventajas y desventajas en ambos tipos de huertos semilleros (Zobel y Talbert. 1985). Por ejemplo, en especies con fuerte incompatibilidad de injertos o donde la floración ocurre en edades tempranas (como es el caso de algunos pinos), los huertos semilleros sexuales ofrecen mayores ventajas con respecto a los huertos semilleros clonales obtenidos por injertos. Además, en algunas especies las plántulas pueden florear más profusamente que los injertos (Konishi. 1985). Sin embargo, si la edad de floración se retrasa en las plántulas, entonces los huertos clonales ofrecen mayores ventajas que los huertos sexuales. Las ganancias genéticas estimadas pueden también ser algo más elevadas en huertos semilleros clonales (Shelbourne. 1969).

Los huertos semilleros se caracterizan típicamente por la generación (por ejemplo, primera, segunda o tercera) dependiendo del ciclo de mejoramiento genético. Los huertos semilleros de primera generación se componen de árboles que han sido seleccionados fenotípicamente en plantaciones o rodales naturales. Las ganancias genéticas esperadas de estos huertos son relativamente bajas, pero pueden aumentarse por aclareos genéticos (por ejemplo, eliminando padres genéticamente inferiores) con base en información de las pruebas de progenie. Los huertos semilleros de segunda generación resultan después de un ciclo completo de selección, cruce y evaluación. En términos generales, el nivel de mejoramiento genético aumenta enormemente conforme se avanza en las generaciones de cruzamiento.

Establecimiento y manejo de huertos semilleros

Si se espera satisfacer las demandas de semilla a largo plazo con los huertos semilleros, es necesario considerar varios factores antes de su establecimiento. Si se cometen errores en la toma de decisiones o no se hace una adecuada planificación antes del establecimiento, es común que se obtengan resultados poco satisfactorios, o incluso fracasos completos. Una de las decisiones más críticas es la ubicación del huerto. Muchos proyectos de huertos semilleros han fracasado a causa de una ubicación

inadecuada, particularmente cuando los huertos se establecen en sitios de bosques naturales donde es difícil o imposible realizar prácticas de cultivo. Las consideraciones importantes al evaluar la posible ubicación del huerto semillero son:

1. *Historia de floración y clima.*- Experiencias previas muestran que huertos semilleros establecidos en áreas secas y cálidas, que no se exponen a heladas tardías en primavera o tempranas en el otoño, producen flores abundantes en intervalos regulares. Es importante evitar áreas sujetas a vientos predominantes fuertes.
2. *Suelos y topografía.*- Se prefieren sitios con pendientes suaves y buen drenaje, y suelos productivos, ya que en ellos se puede trabajar fácilmente con equipo y permiten un buen drenaje y aireación.
3. *Servicios.*- A fin de manejar eficientemente un complejo de huertos semilleros, debe haber disponibilidad de agua con calidad adecuada, caminos de acceso, mano de obra, equipo y los suministros adicionales necesarios.
4. *Ausencia de plagas.*- Las plagas y enfermedades locales pueden ocasionar problemas serios de manejo en el huerto. Se debe evitar establecer huertos en áreas con riesgo elevado de plagas.
5. *Aislamiento de polen externo.*- El polen contaminante del exterior del huerto semillero puede reducir seriamente las ganancias genéticas y la adaptabilidad de la semilla producida en el huerto. Por lo tanto, cuando sea posible, los huertos semilleros deben ubicarse en áreas libres de contaminación de polen.
6. *Aislamiento de lagos y arroyos.*- En muchas jurisdicciones, el interés en la protección ambiental puede restringir el uso de fertilizantes, plaguicidas y herbicidas cerca de cuerpos de agua o poblaciones humanas. El estar informado y consciente de estos intereses es crítico para ubicar correctamente el sitio del huerto semillero.

Una vez que se ha ubicado el sitio del huerto semillero, es crítico determinar el tamaño del complejo requerido para satisfacer los objetivos de manejo. Para beneficiarse de las economías de escala, muchas organizaciones establecen varios huertos para una o más especies en un mismo sitio. Sin embargo, la desventaja de esto es la contaminación de polen entre huertos de las mismas especies. La determinación del tamaño de cada huerto individual es principalmente una función de las necesidades de semilla a largo plazo (20 - 50 + años) y de la producción estimada de semilla por cada árbol individual. En la mayoría de los programas los huertos semilleros se planifican para exceder las necesidades proyectadas de semilla. Los huertos semilleros convencionales con árboles ampliamente espaciados pronto pierden su viabilidad económica y biológica si la superficie es menor de dos hectáreas.

Antes de establecer el huerto semillero, los trabajos iniciales en el sitio deben incluir la eliminación de la vegetación (si es necesario), la preparación del suelo, la evaluación de la fertilidad del suelo, el establecimiento de cultivos de cobertura y la protección del sitio contra incendios y vandalismo. Debe establecerse la red de caminos y colocar en su lugar los sistemas de riego. En general, se prefieren los sistemas de riego por goteo, ya que son más baratos, permiten aplicar estrés por sequía en forma selectiva y requieren menos agua que los sistemas fijos de aspersión. Sin embargo, los sistemas de aspersión aérea pueden ser necesarios para: (1) enfriar el huerto durante la primavera a fin de retrasar o sincronizar la floración en el huerto y por medio de eso reducir los efectos de contaminación de polen; o (2) proteger al huerto de las heladas. En programas donde se establecerán huertos semilleros clonales por injertos en campo sobre patrones preestablecidos, es importante plantar los patrones dos o tres años antes de injertar, dependiendo de la velocidad de crecimiento de la especie. Los injertos en maceta de huertos semilleros clonales también requieren que se desarrollen los patrones dos años antes de injertar y de establecer el huerto (comúnmente cuando los injertos tengan 1-2 años de edad).

La composición genética del huerto semillero es importante, ya que influye en gran medida sobre el nivel de ganancia y diversidad genética lograda en el huerto. Para la mayoría de los huertos clonales de polinización por viento, esto implica usar 20-50 clones y plantar **ramets** individuales con una distancia mínima de separación para obtener el menor grado de endogamia por cruzamiento entre individuos del mismo clon. Existen varios diseños de plantación disponibles para minimizar el apareamiento de individuos relacionados en huertos semilleros con polinización anemófila (Giertych. 1975).

Manejo del sitio

El manejo del huerto semillero es una actividad de cultivo que requiere muchas de las mismas técnicas culturales de un cultivo agrícola. Si no se tiene un manejo adecuado, se pierden las ventajas del mejoramiento genético de los árboles. Los huertos semilleros que se plantan en sitios pobres o que tienen árboles inferiores apiñados y que florecen en un período prolongado cada temporada no producirán semilla en todo su potencial, independientemente de la calidad genética de los padres; por lo tanto, es crítico establecer y mantener los regímenes apropiados de manejo. Aunque las prescripciones de manejo pueden ser complejas y variar de un sitio a otro, en todas las situaciones es importante mantener una fertilidad apropiada del suelo, controlar el cultivo de cobertura, manejar el agua de riego y efectuar un control de plagas. Además, es crítico asegurar que el manejo del huerto semillero mantenga la eficiencia genética de éste, la cual representa el nivel en que la semilla del huerto semillero mantiene una alta calidad genética y una amplia variabilidad genética.

Para lograr una eficiencia genética a plenitud deben satisfacerse ciertos criterios (Webber y Painter. 1994): (1) todos los árboles deben contribuir igualmente a la producción de semilla, (2) la contaminación de polen debe ser despreciable (mínima), y (3) las relaciones de consanguinidad deben mantenerse al mínimo. En la mayoría de los huertos semilleros polinizados por viento, el desbalance en la contribución paterna y la contaminación del polen son los dos problemas más difíciles de manejar. Comúnmente, las relaciones de consanguinidad se controlan efectivamente mediante la distribución de los **ramets** o árboles en el huerto. Las técnicas más comúnmente usadas para superar el desequilibrio paterno y la contaminación de polen incluyen el enfriado del huerto con la aplicación de riego por aspersión fina (rocío), inducción floral y polinización complementaria.

En *Pseudotsuga menziesii*, el enfriado del huerto con riego por aspersión aérea ha mostrado que retrasa la fenología reproductiva en 7-14 días (Fashler y El-Kassaby. 1987). Este retraso en la fenología reproductiva redujo la contaminación de polen, redujo la longitud total del período de receptividad en la flor femenina y aumentó el número de padres con períodos de receptividad sincrónicos. Las técnicas de inducción floral que pueden usarse comúnmente en forma aislada o en combinación, para mantener o mejorar la eficiencia genética, incluyen el estrés hídrico (sequía), poda de raíz, fertilización con nitrato de calcio (Ebell. 1972), anillado (obstrucción del floema) (Wheeler *et al.* 1985), e inyecciones de giberelinas AG₄₇₇ al tronco (Ross *et al.* 1985). La polinización complementaria, o la aplicación generalizada de polen a flores hembras, también se ha usado exitosamente para mejorar la producción de semilla, controlar la composición paterna y para reducir la autofertilización y contaminación de la semilla en los huertos semilleros (Webber y Painter. 1994).

Manejo del polen

El polen está vivo y es frágil; en consecuencia, debe manejarse adecuadamente o la viabilidad se deteriora rápidamente (Webber y Painter. 1994). El manejo del polen se refiere a la recolección, extracción,

prueba, evaluación y reaplicación de polen almacenado o fresco. El manejo apropiado del polen es crítico en huertos semilleros jóvenes polinizados por el viento, donde la polinización complementaria se puede usar para aumentar la producción de semilla, o cuando se realizan cruces controladas entre padres selectos. Webber y Painter (1994) proporcionan un razonamiento detallado, descripciones, diagramas esquemáticos y fotografías en color del manejo de polen en Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*).

Manejo de plagas

El establecimiento de los huertos semilleros es costoso y el valor de la cosecha es elevado; por lo tanto, la capacidad para identificar y controlar las plagas en sus etapas tempranas es un aspecto básico para el manejo del huerto semillero. Afortunadamente, debido a la facilidad de acceso y al tamaño pequeño de los huertos y de los árboles del huerto, se pueden adoptar medidas de protección mucho más efectivas que las utilizadas en bosques. El personal en el sitio se puede entrenar para que regularmente vigile los árboles y las cosechas de cono para identificar plagas y síntomas de daño, y para tomar las medidas de control efectivas, seguras y aceptables desde el punto de vista ambiental, cuando sea necesario.

Las plagas de los huertos semilleros se clasifican usualmente en dos grupos: agentes que dañan partes vegetativas, y agentes que dañan estructuras reproductivas. Típicamente, las plagas que dañan estructuras reproductivas son las más importantes, ya que pueden ocasionar pérdidas de semilla mayores de 50% (Zobel y Talbert. 1984). Las plagas de insectos más comunes de los huertos semilleros incluyen: defoliadores, insectos chupadores, barrenadores de tallo y conos, y las que se alimentan de semillas; las enfermedades más comunes de los huertos semilleros incluyen: pudriciones de raíz, enfermedades foliares, enfermedades de ramas y tronco y royas de conos. Otros agentes bióticos y abióticos dañinos que frecuentemente requieren control en los huertos semilleros incluyen: mamíferos pequeños, pájaros, heladas, nevadas e incendios.

Recolección de conos, almacenamiento y extracción de semilla

La recolección de conos constituye un problema en huertos semilleros, especialmente cuando los árboles son más viejos, más altos y tienen copas amplias. Para reducir estos problemas, muchos administradores de huertos semilleros controlan la altura de los árboles mediante podas del brote principal, y formación y reorientación de ramas. A la fecha, los esfuerzos para desarrollar y utilizar patrones enanizantes y retardantes del crecimiento para controlar la altura de árbol no han sido efectivos. En la mayoría de los huertos semilleros donde los árboles permanecen altos, los conos se cosechan comúnmente a mano desde escaleras o elevadores mecánicos. Debido a que el desarrollo de la semilla generalmente varía entre clones, en años de cosechas abundantes de semilla es necesario realizar evaluación de madurez de semilla para priorizar la cosecha. Cuando la cosecha de semilla ha madurado totalmente, los conos se cortan cuidadosamente, asegurando que los árboles no se dañen, y se almacenan en cobertizos libres de roedores, bien ventilados y frescos. Siempre debe tenerse un cuidado extremo para evitar que los conos se calienten. La semilla debe extraerse, limpiarse y almacenarse lo antes posible.

Evaluación y certificación de la cosecha de semilla

En muchas partes del mundo la semilla obtenida de los huertos semilleros recibe una evaluación y certificación con base en el origen de la semilla, la germinación de la semilla, otros factores biológicos

que influyen sobre la producción del huerto (por ejemplo, número de conos en floración, fenología de los períodos de receptividad, nivel de contaminación, y polinización complementaria), y mérito (valor) genético del huerto semillero. En este caso, el mérito genético comúnmente representa el valor reproductivo promedio de los padres en características tales como forma o altura del árbol. En el mercado de semilla actual, donde se pagan precios elevados por semilla con un mérito genético alto, es importante desarrollar un sistema de certificación de semilla que utilice las normas y protocolos de certificación aceptados; además, es crítico que el desempeño del lote de semillas se refleje en forma precisa en su certificación.

Elaboración y archivo de registros

Es esencial mantener registros precisos para generar un historial del huerto semillero y una base de datos sobre la que se puedan definir las recomendaciones y actividades futuras de manejo. En general, es importante registrar la información básica de clima, actividades de manejo (por ejemplo: riego, fertilización, control de plagas, podas, aclareos genéticos, etc.), e información sobre el material genético del huerto (por ejemplo, información sobre floración, producción de conos, susceptibilidad a insectos y enfermedades, e incompatibilidad de injertos). En la actualidad es relativamente fácil capturar esta información con computadoras personales y cargadores electrónicos de datos.

Nuevas tecnologías en huertos semilleros

La tendencia en los huertos semilleros de polinización por viento es hacia el aumento en la densidad de plantación y alguna forma de control de la altura de los individuos. Dentro de los beneficios de este sistema, se espera reducir los costos de recolección de conos, aumentar la densidad natural de la nube de polen, reducir el uso del terreno y minimizar las cantidades requeridas de pesticidas. Sin embargo, quizás los aspectos más excitantes del manejo de huertos semilleros en la actualidad son los nuevos diseños de huertos y las tecnologías desarrolladas para superar los problemas inherentes asociados con los huertos semilleros convencionales polinizados por viento, y la obtención de las ganancias genéticas en forma más rápida de los programas de mejoramiento genético avanzados. Como se mencionó anteriormente, estos problemas incluyen: (1) contaminación de polen, (2) contribución desigual de polen y semilla de diferentes clones, (3) producción retardada de flores debido a una ubicación inadecuada del huerto, (4) incompatibilidad de injertos, y (5) largos períodos de rotación del huerto requeridos para justificar los costos de establecimiento.

Un enfoque nuevo para obtener mejores niveles de ganancia genética y lograr un control completo sobre el “pedigree” de la semilla es mediante los huertos semilleros de polinización controlada. En este sistema los árboles del huerto se mantienen pequeños mediante podas y los clones de alto valor reproductivo se cruzan en condiciones controladas para producir cantidades pequeñas de semilla “élite”. Esta semilla se usa posteriormente en las plantaciones o con fines de multiplicación mediante propagación vegetativa. En programas de huertos semilleros donde las rotaciones de clones se pueden reducir, los huertos pequeños o micros son efectivos para asegurar altas ganancias genéticas (Carson *et al.* 1990) En este sistema, se establecen bloques mono-clonales de injertos en densidades elevadas que se polinizan manualmente sin aislamiento y que se manejan en rotaciones cortas (4-6 años). Un tercer ejemplo de la nueva tecnología de los huertos semilleros es el desarrollo de huertos semilleros en envases. En este sistema los árboles se mantienen en recipientes, mediante podas se conservan pequeños y se trasladan a invernaderos en donde se utilizan tratamientos de estimulación floral y polinización controlada. Para

algunas especies, el sistema de huertos semilleros en envases permite aumentar la producción de semilla, reducir los problemas de plagas, mejorar la eficiencia genética y ofrece una oportunidad para integrar rápidamente nuevo material genético al huerto, conforme se dispone de él.

Desempeño de los huertos semilleros

En muchos programas de mejoramiento genético de árboles, los huertos semilleros convencionales polinizados por viento han sido vitales para la producción de semilla bien adaptada, genéticamente diversa y genéticamente mejorada para los programas de plantaciones. De hecho, en muchos programas en todo el mundo los huertos semilleros proporcionan la semilla mejorada suficiente para satisfacer las necesidades de plantación de organizaciones completas; además, varios de estos programas se han movido exitosamente a huertos semilleros de segunda generación o de generaciones avanzadas con diseños alternos, donde las ganancias genéticas estimadas y realizadas han sido espectaculares. En huertos semilleros de polinización controlada de *Pinus radiata* en Nueva Zelanda, Carson *et al.* (1990) estimó una ganancia en volumen de 30% con respecto al material no mejorado. En Columbia Británica, Canadá, 27 de los 250 millones de plántulas que se plantaron en 1994 en toda la Provincia se derivaron de huertos semilleros. Se espera que esta proporción aumente rápidamente conforme los huertos semilleros jóvenes establecidos en el interior de Columbia Británica alcancen plena producción de conos.

Conclusiones

Independientemente del método usado, la adquisición de semilla de alta calidad para plantaciones nunca es simple. En todas las situaciones se requiere de planificación y esfuerzo considerables por parte de personal inteligente, bien entrenado y entusiasta. Este hecho no debe pasar inadvertido. Aunque siempre existen factores bióticos y abióticos que influyen sobre el método de adquisición de semilla, es importante reconocer que existe una relación positiva entre el costo de la semilla y el nivel de ganancia genética derivado de cada opción. La semilla de rodales naturales es relativamente barata en su obtención, pero ofrece un mínimo de mejoramiento genético. La semilla de huertos semilleros es costosa de producir, pero ofrece una gran oportunidad de mejoramiento genético. Si se elige la opción del huerto semillero como el método de producción de semilla mejorada, es importante que los huertos operen en apoyo de un programa de mejoramiento genético y que los programas silvícolas también se realicen en forma adecuada. Si el proyecto entero se planifica y se ejecuta adecuadamente, el esfuerzo de reforestación será exitoso, lucrativo y aceptable tanto ambiental como socialmente.

Literatura citada

Carson, M.J., R.D. Burdon, S.D. Carson, A. Firth, C.J.A. Shelbourne, and T.G. Vincent. 1990. Realizing genetic gains in production forests. *In: Proceedings joint meeting of WFGA and IUFRO Working Parties S2.02-.05,06,12, and 14, August 20-24, 1990, Olympia, Washington.* Weyerhaeuser Company.

- Ebell, L.F. 1972. Cone-induction response of Douglas-fir to form of nitrogen fertilizer and time of application. *Can. J. For. Res.* 21: 1155-1170.
- El-Kassaby, Y.A. and B.C. Jaquish. 1997. Population density and mating pattern in western larch. *J. Heredity* (in press).
- Fashler, A.M.K. and Y.A. El-Kassaby. 1987. The effect of spray cooling treatment on reproductive phenology in a Douglas-fir seed orchard. *Silvae Genet.* 36: 245-249.
- Giertych, M. 1975. Seed orchard designs. *In: R. Faulkner (compiler), Seed orchards.* Forestry Commission Bulletin No. 54. Her Majesty's Stationery Office, London. pp: 25-37.
- Graham, R. 1985. Effect of nitrogen fertilization and girdling on cone and seed production of western larch. *In: R. Shearer (compiler), Proceedings Conifer Tree Seed in the Inland Mountain West Symposium, August 5-6, 1985, Missoula, Montana.* U.S.D.A. Forest Service General Technical Report INT-203. Intermountain Research Station, Ogden, Utah. pp: 166-170.
- Kimmins, J.P. 1995. Sustainable development in Canadian forestry: the face of changing paradigms. *For. Chron.* 71: 33-40.
- Kinishi, J.D. 1985. Review of seed production area and seed orchard management in the inland mountain west. *In: R. Shearer (compiler), Proceedings Conifer Tree Seed in the Inland Mountain West Symposium, August 5-6, 1985, Missoula, Montana.* U.S.D.A. Forest Service General Technical Report INT-203. Intermountain Research Station, Ogden, Utah. pp: 145-158.
- Lester, D.T., C.C. Ying, and J.D. Konishi. 1990. Genetic control and improvement of planting stock. *In: Regenerating British Columbia's forests.* University of British Columbia Press, Vancouver, British Columbia. pp: 180-192.
- Nienstaedt, H. and J. Zasada. 1990. White spruce. *In: R.M. Burns and B.H. Honkala (technical coordinators), Silvics of North America. Vol. 1, Conifers.* Agriculture Handbook 654. U.S.D.A. Forest Service, Washington, DC. pp: 204-226.
- Rehfeldt, G.E. 1994. Evolutionary genetics, the biological species, and the ecology of the interior cedar-hemlock forests. *In: Proceedings Interior cedar-hemlock-white pine forests: ecology and management, March 2-4, 1993, Spokane, Washington.* Department of Natural Resource Sciences, Washington State University, Pullman, Washington.
- Ross, S.D. 1991. Promotion of flowering in western larch by girdling and gibberellin A4/7 and recommendations for selection and treatment of seed trees. *Res. Note 105.* British Columbia Ministry of Forests, Victoria, British Columbia. 13 p.
- Ross, S.D., J.E. Webber, R.P. Pharis, and J.N. Owens. 1985. Interaction between gibberellin A4/7 and root pruning on the reproductive and vegetative process in Douglas-fir. 1. Effects on flowering. *Can. J. For. Res.* 15: 341-347.
- Shelbourne, C.J.A. 1969. Tree breeding methods. Technical Paper No. 55. New Zealand Forest Service, Wellington, New Zealand. 43 p.
- Wallinger, D. 1985. Aerial cone harvesting in British Columbia. *In: R. Shearer (compiler), Proceedings Conifer Tree Seed in the Inland Mountain West Symposium, August 5-6, 1985, Missoula, Montana.* U.S.D.A. Forest Service General Technical Report INT-203. Intermountain Research Station, Ogden, Utah. pp: 133-139.
- Webber, J. and R. Painter. 1994. Douglas-fir pollen management manual. Research Program Working Paper WP9402. British Columbia Ministry of Forests, Victoria, British Columbia. 81 p.
- Wheeler, N.C., C.J. Masters, S.C. Cade, S.D. Ross, J.W. Keeley, and L.Y. Hsin. 1985. Girdling: an effective and practical treatment for enhancing seed yields in Douglas-fir seed orchards. *Can. J. For. Res.* 15: 505-510.
- Wilcox, M.D. 1983. Inbreeding depression and genetic variances estimated from self- and cross-pollinated families of *Pinus radiata*. *Silvae Genet.* 32: 39-95.
- Woods, J.H. and J.C. Heaman. 1989. Effect of different inbreeding levels on filled seed production in Douglas-fir. *Can. J. For. Res.* 19: 54-59.
- Zobel, B. and J. Talbert. 1984. Applied forest tree improvement. John Wiley & Sons, New York. 505 p.

8

ALMACENAMIENTO Y MANEJO DE GERMOPLASMA

Ben S.P. Wang y Tannis Beardmore

Resumen

Introducción

Factores que afectan la calidad de la semilla del árbol

Recolección de semillas

Manejo y Procesamiento

Métodos de almacenamiento

Almacenamiento de semillas

Factores que afectan la calidad del germoplasma *in vitro* de árboles

Factores involucrados en la determinación de la calidad de los cultivos de tejidos *in vitro*

Procedimientos de almacenamiento para los cultivos *in vitro*

Aspectos relacionados con el almacenamiento de tejidos *in vitro*

Comentarios finales

ALMACENAMIENTO Y MANEJO DE GERMOPLASMA

Ben S.P. Wang¹ y Tannis Beardmore²

¹Petawawa National Forestry Institute, Canadian Forest Service, Chalk River, Ontario K0J 1J0, Canada.

²Atlantic Forestry Centre, Canadian Forest Service, P.O. Box 4000, Fredericton, New Brunswick E3B 5P7, Canada.

Resumen

La conservación *ex situ* de germoplasma es considerada como un medio viable para la preservación de los recursos, aunque esto puede ser usado como una estrategia complementaria a la conservación *in situ* y otras medidas de conservación *ex situ* de semillas de árboles, debido a los prolongados procesos de regeneración. La longevidad de las semillas de árboles almacenadas es influenciada principalmente por la calidad genética y fisiológica, las condiciones de almacenamiento y los métodos de conservación. Actualmente, el método más adecuado para la conservación de semillas ortodoxas es una combinación de desecantes, con un bajo contenido de humedad (5% o menos) y su almacenamiento en envases sellados a temperaturas bajo cero (-150 a -196°C). En contraste, las semillas recalcitrantes pueden ser preservadas disecando embriones extirpados a bajos contenidos de humedad (15-20% del peso fresco), esterilizándolos y almacenándolos bajo condiciones de frío-conservación.

Los cultivos *in vitro* se pueden conservar a corto (1 semana a dos meses) y a mediano plazo (2 meses a dos años) manipulando las condiciones de crecimiento. La conservación a largo plazo de cultivos *in vitro* se puede lograr usando condiciones de almacenamiento criogénico. El éxito de la *crío-conservación* se relaciona con la habilidad para minimizar la formación de hielo en los espacios intercelulares de los tejidos, ya que existe el problema potencial de un estrés letal. Esto puede lograrse desecando el tejido a aproximadamente 5% del contenido de agua o con una infusión de los tejidos con *crío*protectantes.

Introducción

El germoplasma forestal es un recurso valioso y limitado, que incluye el polen, semillas, partes vegetativas, así como el cultivo de tejidos. El almacenamiento *ex situ* del germoplasma puede ser considerado como una medida viable para la conservación de los recursos, aunque éste puede solamente ser usado como una estrategia complementaria a la conservación *in situ* y a otras medidas de conservación *ex-situ* de semillas de árboles, debido a sus prolongados períodos de regeneración. La calidad del germoplasma es primariamente influenciada por tres factores críticos: recolección, manejo y procesamiento, y conservación. Estos factores están fuertemente relacionados, ya que sus efectos son acumulativos, con un creciente impacto en la calidad de las semillas. Una alta calidad del germoplasma se puede lograr cuando todos los requerimientos y condiciones de estos factores se cumplen satisfactoriamente. La calidad del germoplasma es especialmente importante cuando se destina con fines de conservación *ex situ*.

En este documento nosotros revisamos los factores que afectan la calidad del germoplasma, con especial referencia a las semillas y cultivos *in vitro*. Asimismo, se discuten estrategias apropiadas para la obtención y mantenimiento de una alta calidad del germoplasma.

Factores que afectan la calidad de la semilla del árbol

Los efectos de los tres factores principales que influyen la calidad de la semilla del árbol inician con el período de colecta de ésta, y continúan a través del manejo y proceso de almacenamiento. Cuando todos los requerimientos son cubiertos satisfactoriamente en cada fase, dará como resultado una alta calidad del germoplasma del árbol para una eficiente producción de semilla; asimismo, para el almacenamiento a largo plazo y la conservación *ex situ* del germoplasma (Figura 1). A continuación se discuten estos factores en forma individual y detallada.

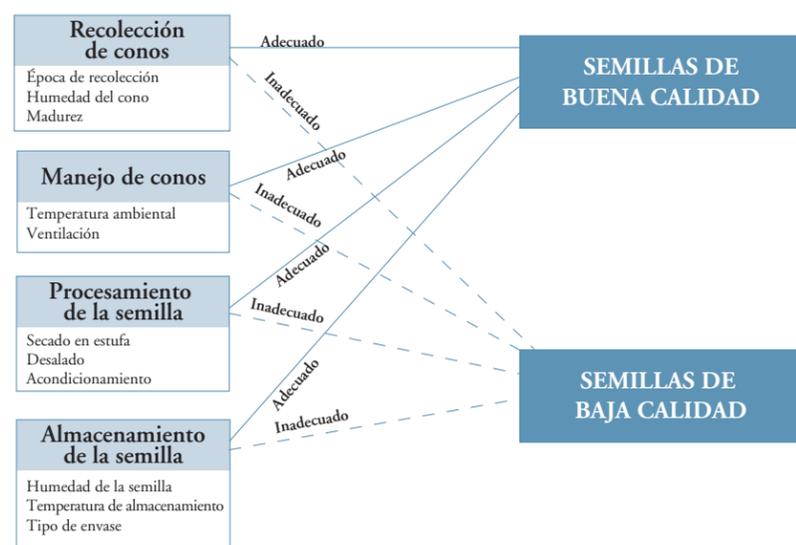


Figura 1. Factores que influyen sobre la calidad de la semilla en especies forestales.

Recolección de semillas

La recolección de las semillas del árbol requiere de una cuidadosa planeación, organización y una adecuada ejecución en tiempo. La regla de las 6 preguntas nos da una sencilla pero confiable guía para realizar esta actividad. Estas preguntas son: ¿Por qué? (objetivo), ¿Qué? (especies), ¿Cuáles? (rodales y árboles), ¿Dónde? (fuente de semillas), ¿Cuándo? (fecha) y ¿Quién? (recolectores).

Objetivos de la recolección (¿Por qué?)

En cualquier programa de recolección de semillas de especies forestales el objetivo específico deberá definirse claramente desde el principio, antes de continuar con otros aspectos de la planificación, ya sea para investigación, conservación de germoplasma o para programas de reforestación.

Especies a ser recolectadas (¿Que?)

Una vez que el objetivo de la recolección se ha definido, el siguiente paso es la selección de especies a recolectar. Esto es relativamente simple si las especies a ser recolectadas son nativas, pero una cuidadosa selección es necesaria para garantizar una especie bien adaptada en el caso de especies exóticas. Por ejemplo, la introducción de especies de rápido crecimiento de *Eucalyptus* y *Acacia* a Taiwán ha estado resultando en una completa falla debido a su intolerancia a los tifones. En el este de África, plantaciones de *Pinus radiata* tuvieron que ser abandonadas debido a los severos ataques de las hojas causados por *Dothistroma pini* (Willan. 1985). Cuando las especies seleccionadas tienen que ser obtenidas de otros países, debería considerarse un plazo de dos años.

Fuente de semillas (¿Dónde?)

Cuando se va a recolectar semilla en rodales naturales, no hay duda de que las poblaciones locales son las más adecuadas, y se utilizan para obtener plántulas para regenerar las mismas áreas. Cuando las semillas de especies exóticas tienen que ser obtenidas de otros países, deberá hacerse una cuidadosa selección de las procedencias. Esto puede ser ejemplificado por un gran número de procedencias de *Tectona grandis* disponibles en la India (Willan. 1985). Después de muchos años de investigación en procedencias, se ha demostrado que sólo ciertas fuentes de semillas de especies exóticas tales como *Pinus caribaea* y *P. oocarpa* de Centro América, y de *Eucalyptus* y *Acacia* de Australia se han adaptado a diferentes países importadores.

Rodaes y características de árboles padre (¿Cuales?)

En recorridos previos a la recolección, los rodaes con muchos árboles con flores masculinas y con características fenotípicas superiores son deseables para una buena recolección de semillas. Una distribución regular de los árboles con abundantes conillos masculinos entre un rodal, facilita una polinización cruzada y contribuye a obtener una mayor variación genética en un lote de semillas. Rodales compuestos de un pequeño número de árboles padres o árboles aislados no son deseables para la recolección.

La recolección dentro de un rodal deberá hacerse en árboles maduros, fenotípicamente superiores, con buena forma, arriba del promedio de la tasa de crecimiento, saludables y vigorosos,

resistentes a plagas y a otros agentes dañinos. Los árboles padres de los cuales las semillas van a ser recolectadas deben estar homogéneamente distribuidos, con una distancia al menos de 50-100 metros entre ellos. Entre más grande sea la distancia entre los árboles padres dentro del rodal, más grande será la posibilidad de tener una diferente constitución genética (Kioko *et al.* 1993).

La estrategia de muestreo y la intensidad de la recolección de semilla dependen en gran medida de los objetivos de la recolección, ya sea para programas de reforestación a gran escala, introducción de especies, ensayos de especies y procedencias, o para conservación de los recursos genéticos. Las recolecciones para la operación de programas a gran escala, usualmente requieren de grandes cantidades de semilla de fuentes o rodales específicos con una estrategia de muestreo por superioridad (selección limitada de fenotipos superiores de una subpoblación). Aquí se pone énfasis en las características deseables con una alta heredabilidad.

Por otro lado, las recolecciones para la conservación de los recursos genéticos requieren de un muestreo al azar y recolectar tantas semillas como sea posible, de cuando menos 50-100 árboles padres por población o "pool" génico a lo largo del área de distribución natural de las especies (Willan. 1985). Por otra parte, Hawkes (1980) sugiere que el número de semillas por población y almacenamiento deberá ser de 25,000 para poblaciones heterogéneas y 10,500 para poblaciones homogéneas. Kioko *et al.* (1993) recomiendan que la recolección deberá hacerse al menos de 30 árboles madre bien distribuidos en una población para minimizar el riesgo de una reducida variación genética. Asimismo, ellos sugieren que una cantidad igual de frutos sea colectada de cada árbol madre para asegurar un igual componente genético en la población. En recolecciones realizadas en huertos semilleros, deberá incluirse un mínimo de 30 árboles padres bien distribuidos después de que se ha observado una distribución regular de flores femeninas y masculinas (Kioko *et al.* 1993).

Cuando se recolecte en algunas especies tropicales tales como Belian (*Eusideroxylon zwageri*), la cual produce pocos frutos en un año semillero en Sarawak, Malasia, se pueden emplear otras estrategias diferentes de muestreo.

Fecha de recolección (¿Cuándo?)

Existen dos factores a considerar al momento de recolectar las semillas, uno de ellos es el año semillero. Para asegurar la mayor ganancia genética y fisiológica de las semillas, las recolecciones deberán hacerse en años con buena floración y una gran cosecha de frutos, ya que es fácil seleccionar los árboles madre, con alto porcentaje de germinación de semillas, y con menor oportunidad de endogamia y ahorros en el tiempo de recolección y costos (Wang. 1976; Turnbull. 1975). El segundo factor es la fecha de recolección, la cual deberá coincidir con la maduración de las semillas. Para la mayoría de las especies, los máximos valores en el desarrollo de las semillas, germinación y vigor se alcanzan en la madurez; por lo tanto, es necesario cosechar las semillas oportunamente; no muy temprano, cuando las semillas están inmaduras, y no muy tarde, para evitar la pérdidas por dispersión.

Existen muchos índices de madurez y otros métodos desarrollados para ayudar a la oportuna recolección, desde análisis en laboratorio del peso seco y fresco de las semillas, hasta cambios bioquímicos, contenido de humedad del fruto, desarrollo anatómico en pruebas de campo empleando la gravedad específica de frutos, o el corte de la testa para examinar el contenido de la semilla y el color de los frutos (Willan. 1985). En Tailandia, los frutos de la Teca (*Tectona grandis*) son suficientemente maduros entre los 120-130 días después de la polinización, pero solamente deben ser cosechados cuando alcanzan su máxima tasa de germinación en abril (Hedegart. 1975). En Malasia, el período de tiempo entre la polinización y la madurez de las semillas varía entre tres semanas para *Pterocymbium javanicum*, hasta

once meses para *Diosperos maingaryi* (Ng y Loh. 1974 citados por Willan. 1985). Por lo tanto, se requiere de un conocimiento previo para establecer un programa de reconocimiento efectivo y periódico (Willan. 1985).

Para algunas especies tales como *Hopea ferrea* en Tailandia, la época de recolección más adecuada es muy corta (7-14 días) e inicia la pérdida de viabilidad después del quinto día de recolectada (P. Pukittayacamee, comunicación personal, 1991). Existe un problema especial en la maduración de semillas de *Pinus merkusii* en Indonesia, donde las semillas maduran a través del año, por lo que la recolección puede realizarse durante los meses en los que los conos son de color café y café-verdoso (Arisman y Powell. 1986).

Métodos de recolección (¿Cómo?)

Los métodos y equipo usados para la recolección de semilla dependen del tipo de rodal, patrón y posición de los frutos en la copa del árbol, disponibilidad de mano de obra calificada y equipo, características en el desprendimiento de la semilla y del terreno. Básicamente, las semillas se recolectan normalmente ya sea del suelo o de los árboles en pie. La recolección de semillas del suelo puede realizarse después de la caída del fruto en forma natural o golpeando las ramas con garrochas de bambú para hacer caer las semillas sobre una manta alquitranada colocada bajo el árbol. Las recolecciones manuales también pueden realizarse después del aprovechamiento del árbol, aunque es importante saber el período de aprovechamiento, para evitar el riesgo de recolectar semillas inmaduras. Sin embargo, cuando se realiza la recolección de frutos del suelo que han caído en forma natural, es esencial cotejar la calidad de la semilla antes de la recolección, debido a la caída de frutos inmaduros. Por ejemplo, observaciones hechas en la maduración de frutos en Teca en una investigación en Tailandia indicaron que, aunque la caída natural del fruto empieza en marzo, las semillas más viables son de los últimos frutos que caen (en abril) (Hedegart. 1975). Esto también es cierto con la dispersión temprana de bellotas de *Quercus* en Norteamérica.

Las recolecciones de conos serotinos de Jack pine (*Pinus banksiana*) y Lodgepole pine (*Pinus contorta*), o semi-serotinos de Black spruce (*Picea mariana*) se hacen satisfactoriamente en Canadá con un método de recolección semi-mecanizado, en el cual las puntas de los ramas con conos se cortan y se colocan en rodillos de lavadora con dos pernos girando en direcciones opuestas. En Europa, algunas de las semillas más grandes, tales como las nueces del haya (*Fagus sylvatica*) y bellotas de encino, se recolectan del suelo después de su dispersión natural con una potente aspiradora portátil. En el sur de los Estados Unidos, los agitadores mecánicos de árboles son ampliamente usados para recolectar conos y semillas en huertos semilleros, donde los conos de *Pinus elliotii* y *Pinus palustris* se pueden separar fácilmente sacudiendo el árbol y recogiendo del suelo. En el caso de *Pinus taeda* y *P. echinata*, las semillas maduras en el huerto se pueden obtener con ayuda de un agitador de conos en el árbol, para después ser recogidas del suelo por un sistema de redes de recuperación (Willan. 1985).

La recolección de semillas de árboles en pie es menos eficiente y más costosa que la recolección del suelo; sin embargo, en muchas ocasiones la primera es necesaria cuando las semillas tienen que conservarse para recolecciones continuas, debido a que son valiosas por ser de árboles "plus" seleccionados, árboles semilleros en los huertos, por ser muy pequeñas y fáciles de dispersar por el viento (por ejemplo, *Cupressus* spp., *Casuarina* spp., *Eucalyptus* spp., *Picea* spp., *Larix* spp., *Abies* spp.), o porque se trata de semillas recalcitrantes de corta vida, susceptibles de pudrirse en el suelo (por ejemplo, *Prunus africana*; Kioko *et al.* 1993).

En el caso de árboles con ramas bajas, los frutos se pueden recolectar directamente del suelo o con ayuda de escaleras y sierras podadoras con mango largo. Para árboles altos, las recolecciones comúnmente se llevan a cabo escalando los árboles con equipo de seguridad (Yeatman y Nieman, 1978), bicicletas para árboles, equipo hidráulico o cosechadoras de cerezas. En el caso de pequeñas cantidades de semillas requeridas para ensayos de procedencias o conservación de recursos genéticos de árboles localizados en áreas incomunicadas, la recolección puede hacerse empleando un helicóptero (Gunn *et al.* 1987) o con una cosechadora de conos canadiense en forma de rastrillo, movida por un helicóptero. La recolección de pequeñas cantidades de semilla con fines de investigación puede realizarse disparándoles a las ramas que tienen conos con un rifle equipado con mira telescópica.

¿Quién hace la recolección?

Como ha sido indicado por Kemp (1975), la recolección y el manejo subsiguiente de las semillas recolectadas son de gran responsabilidad operativa. Debido a que el conocimiento exacto y el control sobre el origen y tratamiento de las semillas son muy importantes para la continuación de la investigación, el grupo recolector deberá estar entrenado con mucho cuidado, especialmente cuando la recolección de semillas es de árboles en pie, los cuales deben ser escalados. El grupo de recolección deberá estar constituido por un supervisor, de dos a tres escaladores de árboles con conocimiento, habilidades y experiencia en la identificación de las especies requeridas, distinguiendo árboles padres deseables de los indeseables y frutos maduros de inmaduros, así como en la utilización de equipo de seguridad para escalar.

Documentación

La documentación de las especies recolectadas, fuente de semillas, designación del lote de semillas, localidad, tamaño de la fuente, nombre de propietario y contacto personal en el sitio a recolectar, datos generales (origen, procedencia, edad, manejo), datos ecológicos del sitio, calidad de los árboles semilleros, fenología, etc., debe realizarse durante la recolección. Los frutos recolectados deben ser identificados adecuadamente y etiquetados en el campo, antes de que sean almacenados temporalmente o transportados a una planta procesadora. Normalmente, existen disponibles registros de semillas o formas para recolección, para anotar la información esencial relacionada con la recolección; de otra manera los lotes de semillas no tienen valor.

Maduración artificial

Para especies nativas con un período corto de crecimiento o con períodos cortos de recolección, los frutos pueden cosecharse antes de que alcancen la madurez. Tales frutos colectados inmaduros pueden madurarse artificialmente para producir semillas de buena calidad. El proceso es relativamente sencillo y consiste en el almacenamiento de dichos frutos en un ambiente bien ventilado y fresco con temperaturas de 5 a 10°C y humedades relativas de 65-75% (Bonner, 1980). Muchas especies han sido probadas con éxito, incluyendo *Picea glauca*, *Pinus resinosa*, *Liquidambar styraciflua*, *Liriodendron tulipifera*, y muchas otras especies de maderas duras.

Manejo y Procesamiento

Manejo

Aunque todos los frutos recolectados deben manejarse adecuadamente de acuerdo con los requerimientos específicos de cada especie, es importante tratar con mucho cuidado el alto contenido de humedad de las semillas de las especies recalcitrantes, a fin de mantener su viabilidad y vigor. De acuerdo con Kioko *et al.* (1993), el contenido de humedad de los frutos recién cosechados en el trópico africano varía desde 15% (peso fresco) en semillas ortodoxas hasta 50% en semillas recalcitrantes. Los autores consideran que un alto contenido de humedad en la semilla es el factor más crítico en su manejo antes de procesarla, y señalan la importancia de mantener un adecuado balance entre el contenido de humedad de la semilla, temperatura y ventilación, para evitar su sobrecalentamiento, sofocación o ataque de hongos. En un estudio muy reciente sobre la desecación de semillas de Neem (*Azadirachta indica* var. *siamensis*) en Tailandia, se encontró que los frutos recolectados recientemente no se deben dejar en bolsas de polietileno cerradas, con el fin de evitar la fermentación durante los procesos de recolección, transportación o almacenamiento temporal (datos no publicados del Dr. K.M Paulsen, DANIDA, 1994). Para la mayoría de las semillas recalcitrantes, es muy importante mantener el contenido original de humedad y secarlas paulatinamente después de madurarlas en capas delgadas en un lugar fresco y a la sombra para prevenirlas de sofocación (Kioko *et al.* 1993). Se ha encontrado que la sensibilidad a la desecación en semillas recalcitrantes se debe a la iniciación del proceso de germinación asociada antes o después de la dispersión natural (Farrant *et al.* 1988). Maury-Lechon *et al.* (1981) encontraron que temperaturas de 39°C durante la transportación de semillas, aceleraron el efecto de envejecimiento en *Shorea parvifolia*, pero no ocurrió lo mismo con semillas de *Dipterocarpus humeratus*, y recomiendan el uso de recipientes refrigerados para la transportación de semillas recalcitrantes recién colectadas. En almacenamiento temporal, las semillas recalcitrantes deben mezclarse con un sustrato húmedo en bolsas delgadas de plástico sin cerrar. En la zona subtropical de Taiwán, muchos de los frutos recalcitrantes fueron recolectados antes de que alcanzaran el estado de maduración completa con diferentes grados de madurez; posteriormente, estos frutos fueron madurados artificialmente empleando bambú o cubetas de plástico con riegos de agua pulverizada en forma intermitente en un invernadero de plástico ventilado, hasta que alcanzaron la maduración total, cambiando su coloración de verde o amarillo a café, morado o negro (por ejemplo, *Machilus Kusanoi*, *Neolitsea variabilis*, *Podocarpus macrophyllus*, *Taxus celebica*) (Chien y Lin, 1994).

Las semillas ortodoxas también deberán secarse con aire, en costales de yute o con bolsas de algodón, o bien en charolas de tela en un lugar frío y sombreado con buena ventilación. Los frutos deberán distribuirse en el suelo o en charolas especiales. Los frutos de la mayoría de las especies ortodoxas pueden secarse a la luz directa del sol sin riesgo alguno; sin embargo, se debe de tener cuidado con los conos recién colectados de *Picea glauca*, los cuales comúnmente tienen un alto contenido de humedad y requieren ser secados con aire seco en capas delgadas sobre lonas o charolas, con movimientos frecuentes de los conos. En el caso de frutos frescos y con pulpa, tales como la cereza (*Prunus* spp., *Podocarpus falcatus*, *Olea* spp.), se les deberá quitar la pulpa tan pronto como sea posible para evitar la fermentación o el posible inicio de los mecanismos de dormancia (Kioko *et al.* 1993).

Maduración de post-cosecha

La calidad de las semillas de muchas especies ortodoxas y recalcitrantes es afectada fuertemente por la maduración de los frutos después de cosechados. Resultados recientes sugieren que la maduración de post-cosecha es esencial para lograr un máximo de germinación de semillas de especies ortodoxas de *Picea glauca* (Caron *et al.* 1990; 1993), *Abies procera* (Rediske y Nicholson. 1965), *Pinus strobus*, *Pinus palustris* y *Pinus taeda* (Bonne. 1991) y semillas recalcitrantes de *Hopea helferi* y *Hopea odorata* (Tang y Tamari. 1973) y *Shorea roxburghii* (Panochit *et al.* 1986). Aparentemente, la materia orgánica es translocada de los conos a las semillas durante el proceso de maduración de post-cosecha (Rediske y Nicholson. 1965).

Procesamiento

Los efectos del procesamiento sobre la calidad de la semilla varían de acuerdo con el grado de madurez del fruto en el momento de la recolección, del contenido de humedad de la semilla y del manejo y tratamiento que hayan recibido antes del procesamiento (Allen. 1957). Es claro que si los frutos no se recolectan y manejan adecuadamente, éstos serán más susceptibles a daños durante el procesamiento, y por lo tanto la calidad de la semilla será pobre al momento del almacenamiento.

El principal daño potencial durante el procesamiento de semillas ortodoxas (principalmente coníferas), es una asociación de las altas temperaturas en el horno y la condensación. Es bien sabido que cuando las semillas están completamente maduras y bien tratadas, son menos susceptibles al daño por calor en el horno de secado (40-60°C). En el caso del procesamiento de conos serotinos de *Pinus contorta*, primero se exponen a temperaturas de 230°C por 1 ó 2 minutos, para luego secarse en el horno a 60°C por espacio de 16-24 horas. Recientemente, se descubrió que un período de quema de 1.5 minutos seguido de 16-24 horas de secado de los conos a una temperatura de 60°C en un horno giratorio, que permita remover inmediatamente las semillas liberadas, produjo semillas de *Pinus contorta* con mayor germinación y vigor (Wang *et al.* 1991).

La mayoría de las semillas de maderas duras de frutos sin pulpa o vainas, puede secarse al aire en el sol o bajo calor artificial que no exceda de 45°C (Bonner, 1980; Kioko *et al.* 1993). La otra fuente potencial de daño para las semillas en procesamiento es la resequedad provocada por ventiladores mecánicos, donde las alas y cubierta de las semillas se remueven. Este proceso de ventilación frecuentemente trae como consecuencia un cierto porcentaje de semillas trituradas, fisuradas o severamente cubiertas con una capa de polvo. Las semillas dañadas normalmente muestran una germinación reducida y poco vigor (Allen. 1957). Sin embargo, el daño por ventilación puede evitarse con el uso de ventiladores húmedos (Wang. 1973). Después del ventilado, las semillas se limpian con limpiadores con navajas, o con una aspiradora de aire para obtener semillas puras, limpias y completas. Si se requiere, posteriormente se puede realizar otra limpieza y selección por tamaño con una mesa de gravedad específica. Una innovación a la mayoría de las plantas procesadoras de semillas es el líquido separador sueco, el cual puede remover efectivamente las resinas. Algunas de las semillas aladas de hoja ancha tales como *Acer saccharum* y *Schima superba* pueden limpiarse con el líquido de flotación (Carl. 1976; Wang, datos no publicados, 1994). Frutos carnosos o con pulpa se encuentran comúnmente tanto en especies ortodoxas como recalcitrantes; dichas semillas deben ser procesadas tan pronto como sean cosechadas a fin de obtener una alta calidad. El retraso en el procesamiento puede resultar en una baja calidad de semillas, debido a la fermentación o al sobrecalentamiento, y la pulpa o carne puede contener químicos que pueden inducir mecanismos de latencia (Kioko *et al.* 1993). El procesamiento de frutos carnosos o con pulpa, normalmente requiere del remojo en agua fría por 24 horas

hasta que la carne o pulpa se ablande; después, las semillas se extraen con la mano frotando los frutos en un tamiz de alambre y separando los desechos con agua (Kioko *et al.* 1993). Las semillas de *Azadirachta indica*, *Prosopis* spp., *Melia azedarach*, y *Podocarpus falcata* pueden extraerse con esta técnica; también se pueden extraer con un depurador de café adaptado, un macerador o un mortero.

Acondicionamiento

El acondicionamiento es la última fase en el procesamiento de semillas. Es especialmente necesario cuando se emplean los procesos de ventilación húmeda o líquido separador; es decir, prácticamente para todas las semillas de coníferas. El objetivo del acondicionamiento es reducir el contenido de humedad de la semilla de todas las especies ortodoxas a aproximadamente 5% (peso fresco) para que el almacenamiento sea efectivo. En el caso de las semillas de maderas duras, el acondicionamiento puede ser útil para una posterior desecación, a un contenido de humedad aceptable si el secado con aire no puede obtener los niveles de humedad requeridos. En la práctica, el acondicionamiento es comúnmente realizado en una secadora caliente a 30-35°C durante 24-48 horas.

Almacenamiento de semillas

El objetivo del almacenamiento para la conservación de las semillas forestales es mantener su calidad genética y fisiológica original hasta que sean usadas o puedan ser regeneradas. Para satisfacer este requisito es necesario considerar los principales factores genéticos y ambientales que afectan a las semillas de los árboles durante el almacenamiento.

Factores genéticos

La longevidad de las semillas en almacenamiento está controlada genéticamente y varía según la especie, aun bajo condiciones óptimas de almacenamiento. Basándose en la longevidad y características del almacenamiento, las semillas pueden clasificarse en diferentes grupos según algunos investigadores. Roberts (1973) y Ellis *et al.* (1990) clasificaron a las semillas en general en tres grupos: ortodoxas, recalcitrantes e intermedias; mientras que Bonner (1990) las clasificó en cuatro categorías principales: ortodoxas verdaderas, subortodoxas, recalcitrantes templadas y recalcitrantes tropicales.

Las semillas ortodoxas verdaderas se caracterizan por su extrema tolerancia a la desecación, bajas temperaturas de almacenamiento y capacidad de retención de viabilidad y vigor; así como un largo tiempo bajo almacenamiento en seco, con bajas temperaturas y en condiciones cerradas (ej. la mayoría de las coníferas y maderas duras de semillas pequeñas).

Las semillas subortodoxas se caracterizan por su tolerancia a la desecación, bajas temperaturas de almacenamiento y capacidad de retención de viabilidad y vigor de 2-12 años. Las semillas de algunas especies en este grupo también contienen muchos lípidos (por ejemplo, *Juglans nigra* y algunas especies de *Carya*) o por su tamaño pequeño con cubierta delgada (por ejemplo, *Populus* spp., *Salix* spp.).

Las semillas recalcitrantes templadas se caracterizan por su sensibilidad a la desecación, pero pueden tolerar temperaturas de almacenaje cercanas a la congelación. Requieren altos contenidos de humedad, de 35-50% (peso fresco), e intercambio de gas para mantener su viabilidad y vigor por un período de 12-30 meses (por ejemplo, *Acer saccharum*, *Aesculus hippocastanum*, *Quercus* spp.).

Las semillas recalcitrantes tropicales se caracterizan por su gran tamaño, alta sensibilidad a la desecación y bajas temperaturas de almacenamiento (por debajo de los 4°C para algunas especies y abajo de los 16°C para muchas otras), requerimientos de altos contenidos de humedad (45-65%) e intercambio de gas para mantener su viabilidad y vigor hasta por un año en almacenamiento. Estas semillas requieren ser almacenadas con sustrato húmedo. La mayoría de las semillas de árboles de *Dipterocarpaceae* y *Araucariaceae* son recalcitrantes tropicales y su longevidad varía de 14 a 365 días (Tompsett, 1987).

Aunque los dos tipos de semillas recalcitrantes son susceptibles a la desecación y al almacenamiento a bajas temperaturas, la aparente diferencia entre ellas parece ser la alta sensibilidad a la desecación y a las bajas temperaturas de almacenamiento, y una menor longevidad de las recalcitrantes tropicales. Cabe señalar que estas clasificaciones pueden cambiarse en la medida de que se disponga de más información.

Factores ambientales

Entre los muchos factores ambientales, la calidad inicial de la semilla, el contenido de humedad y los métodos de almacenamiento y temperatura son considerados los más importantes en la conservación de germoplasma.

Calidad inicial

Para mantener la mayor longevidad de las semillas de las diferentes especies almacenadas, una alta calidad inicial es un prerrequisito antes del almacenaje (IBPGR, 1982); esto sólo se puede lograr a través de un cuidadoso control de la calidad genética y fisiológica original a lo largo de las diferentes etapas de recolección, manejo y procesamiento. Partiendo de que el envejecimiento es un proceso natural e irreversible, entre mayor sea la calidad inicial de las semillas y mejores las condiciones de almacenamiento, menor será el índice de envejecimiento y deterioro. El contenido de humedad es el factor más importante para la calidad inicial de la semilla. IBPGR (1976) recomienda que para el almacenaje a largo plazo, el contenido de humedad de las semillas deberá acondicionarse a 5.1% (peso fresco), aunque este criterio fue refutado por un reporte reciente de Cheng *et al.* (1990) en el cual demostraron que el contenido de humedad de *Brassica pekinensis* puede reducirse de 8.6% a 1.6% por medio de secado en congelador y considerando un ultra mínimo contenido de humedad en almacenamiento potencialmente útil y a bajo costo para la conservación de germoplasma a largo plazo.

Para semillas de los grupos de ortodoxas verdaderas y subortodoxas, el contenido inicial de humedad debería ser condicionado a lo más bajo que sea posible (menos de 5%); y esto puede realizarse por medio del secado en congelador (Surber *et al.* 1973; Cheng *et al.* 1990).

En contraste, las semillas recalcitrantes no pueden deshidratarse para bajar un contenido de humedad relativamente alto, y su longevidad se mejora con un incremento en el contenido de humedad con presencia de oxígeno (King y Roberts, 1979). Para prolongar la longevidad de las semillas recalcitrantes, King y Roberts (1979) sugieren examinar las condiciones e índices de desecación. La Figura 2 ilustra las relaciones del contenido de humedad y germinación de *Acer saccharinum* en un período de 30 días (Wang *et al.* 1993). Berjak *et al.* (1990) usaron una técnica de secado relámpago, la cual consiste en que un torrente de aire comprimido pasa a través de dos columnas consecutivas de gel de sílice activado, para reducir satisfactoriamente el contenido de humedad del embrión recalcitrante de *Landolphia kirkii*, de 33% a 14% (peso fresco), sin efecto dañino en la viabilidad y vigor. Para un almacenamiento efectivo, dirigido a las semillas recalcitrantes, Standwood (1985) desarrolló el "límite de congelamiento de alta humedad" (HMFL). Tompsett (1987) ideó el "valor mas bajo de contenido de humedad" (LSMC0) para las especies de *Dipterocarpaceae*.

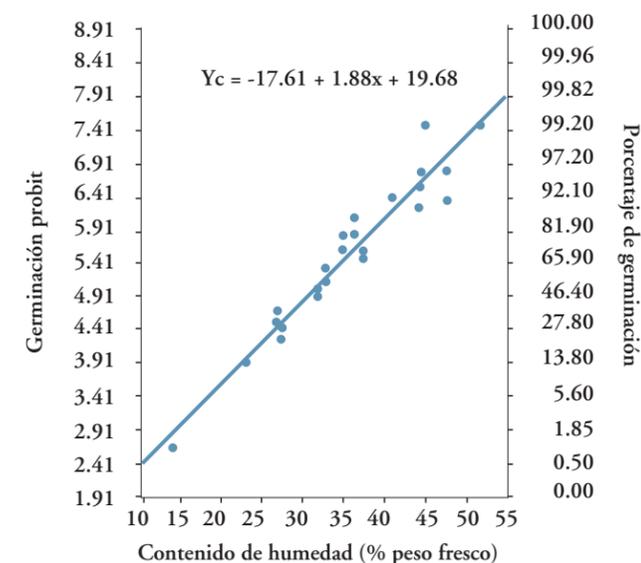


Figura 2. Relación cuantitativa entre el contenido de humedad (como porcentaje de peso fresco) y capacidad germinativa (expresada como porcentaje de germinación y como germinación probit) de semillas de maple plateado (*Acer saccharinum*) secadas al aire libre con temperatura y humedad relativa ambiente durante 30 días (Wang *et al.*, datos no publicados, 1991).

Temperatura de almacenamiento

La temperatura de almacenamiento es otro factor importante que afecta la longevidad de las semillas almacenadas. Las temperaturas óptimas para el almacenamiento varían de acuerdo con la fisiología de los diferentes grupos de especies.

El efecto de la temperatura de almacenamiento en la calidad de la conservación de las semillas ha sido bien documentada (Holmes y Buszewicz, 1958; Barton, 1961; Heit, 1967a, 1967b; Wang, 1971, 1974, 1975; King y Roberts, 1979, 1980; Bonner, 1990; Wang *et al.* 1993). En general, se recomienda que el almacenamiento exitoso a largo plazo de semillas ortodoxas para propósitos de conservación puede lograrse si las semillas se deshidratan hasta 1-5% del contenido de humedad (peso fresco) y se almacenan en contenedores cerrados a una temperatura de -18°C (IBPGR 1976; Roberts y Ellis, 1977).

Sin embargo, el envejecimiento de la semilla y la pérdida de viabilidad y vigor aun pueden ocurrir bajo tales condiciones de almacenamiento al incrementarse el tiempo y puede resultar en una pérdida de material genético valioso (Standwood, 1985). En un estudio reciente, Dickie *et al.* (1990) indicaron que para semillas ortodoxas, entre más baja sea la temperatura de almacenamiento, más grande será su potencial de vida en tales condiciones. Basado en esta relación parece ser que la crío-preservación es la estrategia preferida para la conservación de germoplasma a largo plazo (Wang *et al.* 1993).

En el caso de las semillas recalcitrantes, las temperaturas de almacenamiento pueden conservar la viabilidad y el contenido de humedad a 12°C para *Dryobalanops aromatica*, y a 15°C para *Shorea curtisii* y *S. platyclados* (Maury-Lechon *et al.* 1981). En un análisis de las condiciones óptimas de almacenamiento para semillas de Dipterocarpaceas, Tompsett (1987) encontró que dichas temperaturas, para 48 especies recalcitrantes, varían de 4°C para *Shorea adorata*, *Hopea wightiana*, *H. subalata* y *H. ferrea*, a 25°C para otras 10 especies de Dipterocarpaceas. En Taiwán, las semillas nativas de especies recalcitrantes subtropicales pueden tolerar 4-5°C de almacenamiento húmedo o en forma de estratificación húmeda fría.

Métodos de almacenamiento

El mejor método de almacenamiento depende de las características de almacenamiento de las semillas. Para semillas verdaderamente ortodoxas y subortodoxas, el almacenamiento en seco en recipientes cerrados con poco o sin intercambio de aire da los mejores resultados (Wang, 1974). Este método mantiene un contenido de humedad constante en la semilla, reduce la respiración como resultado del incremento del bióxido de carbono y la disminución de oxígeno, y protege las semillas de insectos y enfermedades (Harrington, 1972; Wang, 1974).

En el almacenamiento en húmedo con semillas completamente hidratadas, se han reportado algunas ventajas fisiológicas (Villiers, 1974; Villiers y Edgcumbe, 1975). Aparentemente, bajo condiciones hidratadas, las enzimas, la membrana celular y el ADN reparan los mecanismos de las semillas y permanecen intactas; el daño cuando ocurra será eliminado y la integridad de la membrana asegurará una compartimentalización apropiada de las enzimas y de los procesos metabólicos. Por otro lado, las semillas recalcitrantes requieren de un alto contenido de humedad para mantener su viabilidad y vigor, y serían dañadas en condiciones de almacenamiento prolongado cerrado (Wang, 1974). Existen otros problemas asociados con el almacenamiento de semillas recalcitrantes, tales como el desarrollo de bacterias y hongos, y la germinación durante el almacenamiento.

El almacenamiento de semillas recalcitrantes con sustratos húmedos tales como aserrín, turba o musgo, vermiculita o arena, han sido reportados como un éxito para el roble (Korstian, 1930; Gardener, 1937; Suszka, 1976), *Aleurites fordii* (Large *et al.* 1947), caucho (Ang, 1976), *Castanea spp.* (Texeira, 1955; Jaynes, 1969), café (León, 1974), *Citrus spp.* (Honjo y Nakagawa, 1978), rambutan (Chin, 1975), y cacao (Evans, 1953).

Lin y Wu (1995) utilizaron exitosamente turba o musgo húmedo como medio para almacenar *Michelia compressa* sin problemas de moho. Kioko *et al.* (1993) afirmaron que la arena es un medio menos conveniente porque no retiene bien la humedad. Los autores dan una lista de especies sensibles a la desecación cuyas semillas deben ser almacenadas con un sustrato húmedo de 1 - 4°C para mantener la viabilidad hasta por un año.

Las bellotas recalcitrantes templadas de las especies de *Quercus* han sido almacenadas con moderado éxito cuando sus contenidos de humedad se reducen a 30% (peso fresco) en bolsas de polietileno de 0.1-0.25 mm. de grueso y a una temperatura de -3 a +3°C (Bonner y Vozzo, 1987; Suszka y Tylkowski, 1981, 1982). Las bolsas de plástico con un espesor de 0.1-0.25 mm permiten el suficiente intercambio de gases, pero evitan la pérdida de vapor de agua (Bonner, 1980). El almacenamiento más prolongado de bellotas se ha logrado en atmósferas de almacenamiento ricas en bióxido de carbono (Vozzo, 1976; Tylkowski, 1976). Un método prometedor usado comúnmente para almacenar semillas recalcitrantes tropicales consiste en su desecación parcial por pocas horas, tratándolas con fungicidas, sellándolas en bolsas de polietileno y almacenándolas a 15°C aproximadamente (por ejemplo, *Theobroma cacao*, *Dryobalanops aromatica*, *Hopea helferi*, *H. odorata*) (King y Robert, 1980).

El método más factible para prolongar el tiempo de vida en almacenamiento de semillas recalcitrantes tropicales fue realizando la extirpación del embrión de las semillas, secándolos a 20% de contenido de humedad (peso fresco), y almacenándolos en nitrógeno líquido (Chin y Roberts, 1980; Pritchard y Prendergast, 1986; Pence, 1990, 1992). Aparentemente, la extirpación del embrión y su posterior almacenamiento en nitrógeno líquido (*Araucaria hunsteinii* y *Elaeis guineensis*) no sólo permitió su supervivencia al almacenamiento en nitrógeno líquido, sino que facilitó su reproducción *in vitro*. De acuerdo con Chin (1978), al realizar la extirpación de embriones de *Artocarpus heterophyllus*, *Nephelium lappaceum*, *Coccus nucifera* y *Dryobalanops aromatica* todos han sobrevivido exitosamente al

almacenamiento en nitrógeno líquido por lo menos 8 meses, permitiendo ser recultivados en medio rico en nutrientes. Esta técnica puede ser benéfica para prolongar el tiempo de vida durante el almacenamiento de otras especies recalcitrantes, pero aún deberán hacerse algunos refinamientos a la técnica.

Comprobación

Para un manejo eficiente y efectivo de un lote de semillas almacenadas, es importante diseñar y desarrollar un método estandarizado de monitoreo en forma calendarizada. Dichos métodos de monitoreo deberán considerar un tamaño de muestra adecuado, el cual proporcionará información de los cambios en el contenido de humedad, porcentaje de germinación, vigor y daños provocados por insectos y enfermedades. Las reglas internacionales establecidas por el ISTA para pruebas de semillas (ISTA 1993) pueden emplearse como una forma estándar o haciendo algunas modificaciones.

Factores que afectan la calidad del germoplasma *in vitro* de árboles

Introducción

El cultivo *in vitro* es conocido también como cultivo de tejidos vegetales, el cual es un proceso en el que las células, tejidos, órganos vegetales o cualesquiera partes son cultivadas en condiciones asépticas en un ambiente controlado (Scowcroft, 1984). Los tipos de cultivo *in vitro* son numerosos y han sido desarrollados para más de 1000 especies vegetales (FAO, 1994).

Las plantas propagadas vegetativamente, como *Dioscorea spp.*, *Manihot spp.*, *Musa spp.* y algunas plantas que producen semillas recalcitrantes, como *Juglans spp.*, *Quercus spp.* y *Coffea spp.* no pueden ser preservadas usando métodos convencionales de almacenamiento por períodos largos (FAO, 1994). La preservación de germoplasma en la forma de cultivos *in vitro* representa una forma alternativa de conservación de genes que puede utilizarse para aquellas especies que son típicamente difíciles de almacenar.

Tipos de cultivo *in vitro*

En general, existen dos métodos para la preservación de cultivos *in vitro* (revisados por George y Sherrington, 1984). El primer método involucra el cultivo de yemas del tallo (meristemo apical con varios primordios foliares) así como yemas adventicias con la subsiguiente producción de tallos. La tecnología involucrada es simple: las yemas aisladas se cultivan en medios nutritivos que contienen citocininas para estimular el desarrollo de yemas axilares múltiples. Esto da como resultado un incremento aproximado de 3 a 6 veces el número de tallos cada 4 a 6 semanas (Karthi *et al.* 1974). Este sistema tiene el potencial de que un explante genera uno o varios millones de plantas de cada meristemo apical cultivado en un año.

El segundo método involucra la diferenciación de tejidos del explante. Estos cultivos *in vitro* se basan en la formación *de novo* de meristemas apicales en cultivo de callo y en la inducción de embriogénesis somática. Este método requiere más habilidad técnica y condiciones controladas de laboratorio para la multiplicación de propágulos. Una diferencia importante entre los dos métodos consiste en que el método anterior no involucra la diferenciación de tejidos del explante para la formación de subsecuentes propágulos. Los dos tipos de métodos para la generación de cultivos *in vitro* serán discutidos en conjunto en las secciones siguientes.

Factores involucrados en la determinación de la calidad de los cultivos de tejidos *in vitro*.

Tres factores son considerados importantes para la calidad de los cultivos *in vitro*:

1. La fuente original del tejido (la fuente de explantes).
2. Manejo y procesamiento: métodos de propagación *in vitro* usados.
3. Procedimiento de almacenaje y duración.

Estos factores serán discutidos individualmente enseguida:

Fuente de explantes

La selección del explante (i.e. el genotipo de la planta), la edad fisiológica del tejido (i.e. tejidos juveniles *vs.* tejidos adultos) y la época del año en la que se obtiene el explante, pueden tener efectos importantes en el éxito del procedimiento de cultivo *in vitro*, en la calidad de los propágulos generados por el cultivo y en el almacenamiento subsecuente de los propágulos generados. Estos factores varían en importancia dependiendo de la especie y del sistema de cultivo utilizado (revisado por George y Sherrington. 1984).

Manejo y procesamiento

El manejo y el procesamiento de los cultivos *in vitro* varían con cada sistema de cultivo (i.e. protoplasto *vs.* callo) y para cada especie. Generalmente, el sustrato en el cual crecen los cultivos *in vitro*, así como el ambiente bajo el cual crecen, influyen sobre su morfología y su crecimiento. Comúnmente, los cultivos *in vitro* necesitan ser subcultivados o transferidos a medios de cultivo frescos cada 2 ó 3 semanas. Esto asegura el crecimiento continuo del tejido, de lo contrario, éstos experimentarán senescencia y morirán. Los tipos de medios de cultivo y las condiciones ambientales que inducen el crecimiento, comúnmente necesitan ser modificados de un género a otro o de una especie a otra.

El fenómeno conocido como variación somaclonal puede presentarse en los cultivos *in vitro* (Larkin y Scowcroft. 1981). La variación somaclonal consiste en cambios genéticos inducidos en el material vegetativo; la razón de estos cambios genéticos es incierta. Se ha postulado que son el resultado del procedimiento del cultivo *in vitro* y de la duración del mismo. Se pueden presentar alteraciones en el número de cromosomas y también rompimiento de cromosomas, así como inserciones y supresiones (Karp. 1989; Brown. 1991).

Ciertos tipos de cultivos *in vitro* son más susceptibles a la variación somaclonal. Parece que el grado de des-diferenciación que se presenta durante el cultivo *in vitro* está correlacionado con la ocurrencia de la variación somaclonal (Scowcroft. 1984). Por ejemplo, se ha detectado la variación somaclonal en plantas regeneradas a partir del cultivo de células y tejidos (tejido que se ha desdiferenciado previamente a la formación del embrión o de la plántula), pero comúnmente no es evidente en las plantas generadas de yemas auxiliares o del cultivo de tejidos de las puntas del tallo (tejido que no se desdiferencia previamente a la formación de la plántula) (Karp. 1989). Otros factores que parecen estar relacionados con la frecuencia de la variación somaclonal son: el nivel de poliploidía del explante (los poliploides dan origen a mayor variación), la edad de los cultivos *in vitro* y la duración que el explante ha estado en cultivo (Orton. 1984; Larkin. 1987).

Cuando se utilizan los cultivos *in vitro* para la preservación de germoplasma, la variación somaclonal puede tener consecuencias severas, debido a que el genotipo original puede no ser preservado. La variación somaclonal puede detectarse por medio de varias técnicas: isoenzimas, análisis de la variación

en la longitud de fragmentos de restricción del ADN (RFLP) y variación de fragmentos de ADN amplificados al azar (RAPD). Estas técnicas pueden usarse para los ensayos de los cultivos *in vitro* después del almacenamiento.

Procedimientos de almacenamiento para los cultivos *in vitro*

Los cultivos *in vitro* y sus propágulos pueden almacenarse por períodos cortos, medianos y largos. Las principales diferencias entre las diferentes duraciones de almacenamiento se relacionan con el estado fisiológico en el que los tejidos se almacenan. Por ejemplo, durante un almacenamiento de corto plazo se promueve el crecimiento de los cultivos *in vitro*, en tanto que en el almacenamiento por plazos medianos y largos se puede reducir fuertemente el crecimiento o incluso inhibirlo. Los métodos de almacenamiento por períodos cortos y medianos pueden usarse para todos los tipos de cultivos *in vitro*; sin embargo, los métodos de almacenamiento por períodos largos no están disponibles para un gran número de especies.

Métodos de almacenamiento a corto plazo.

La duración del almacenamiento de corto plazo es comúnmente de 1 semana a 2 meses y puede usarse para todas las formas de cultivos *in vitro*. Este tipo de almacenamiento se consigue por medio del subcultivo regular de los tejidos en medios de cultivo frescos. Estos medios proporcionan una fuente de carbono, nitrógeno y de reguladores del crecimiento de la planta para el cultivo, de tal manera que se promueve el crecimiento del tejido. Este método es práctico en el corto plazo, pero no es apropiado para el almacenamiento de mediana duración debido al peligro de contaminación de los cultivos, fallas de equipo, elevados costos de almacenamiento y trabajo intensivo. El subcultivo continuo del tejido también da como resultado un potencial incremento en la presencia de la variación somaclonal.

Métodos de almacenamiento a mediano plazo.

Los cultivos *in vitro* pueden almacenarse por plazos de mediana duración minimizando el crecimiento del tejido. El método de almacenamiento de mediano plazo es apropiado para tallos, plántulas, cultivos de tallos y de callo. Este método incrementa los intervalos entre la transferencia de los cultivos *in vitro* a medios de cultivo frescos. Esta forma de almacenamiento es apropiada para períodos de aproximadamente 2 meses a 2 años. Los tejidos se subcultivan usando este procedimiento, en forma similar al método usado para el almacenamiento de corto plazo, pero el crecimiento de los cultivos *in vitro* es minimizado. Esta declinación en el crecimiento del cultivo puede conseguirse por métodos variados; por ejemplo, reduciendo la temperatura, la concentración de oxígeno o la intensidad de la luz en donde se mantienen los cultivos, minimizará el crecimiento.

El almacenamiento en frío se puede aplicar a una amplia variedad de especies. Las temperaturas cercanas al punto de congelamiento son efectivas para el almacenamiento de especies templadas, mientras que temperaturas entre 14 y 18°C se requieren para el almacenamiento de especies tropicales. Los nutrientes disponibles para los cultivos pueden también alterarse de tal forma que minimicen el crecimiento. Los altos contenidos de sacarosa y manitol han demostrado minimizar el crecimiento de los cultivos *in vitro*. Esta reducción en crecimiento se debe al efecto del carbono; sin embargo, se debe tener mucho cuidado al usar este procedimiento, dado que esto puede conducir a una reducción

en la viabilidad del cultivo. La adición de inhibidores del crecimiento (por ejemplo, ácido abscísico) minimizará también el crecimiento del cultivo. Se postula que el ácido abscísico puede minimizar el crecimiento induciendo latencia en el tejido. Si los cultivos *in vitro* crecen por un período en presencia de inhibidores del crecimiento, se pueden inducir cambios fisiológicos en el tejido, haciendo difícil la regeneración de ese tejido.

Debe notarse que alterando las condiciones de crecimiento de los cultivos, uno puede, inadvertidamente, estar seleccionando tejidos que son resistentes o tolerantes a las “nuevas” condiciones de crecimiento. Asimismo, mientras más largos son los períodos de almace-namiento, más grande es el potencial para la inducción de variación somaclonal.

Métodos de almacenamiento a largo plazo

La crio-preservación (preservación a bajas temperaturas) es el método disponible más apropiado para el almacenamiento a largo plazo de cultivos *in vitro* y de sus propágulos. En teoría, los cultivos *in vitro* pueden almacenarse indefinidamente usando crio-preservación. La crio-preservación ha sido aplicada exitosamente en plantas tropicales como *Manihot* spp. y *Mussa* spp (Engelmann, 1992), también se ha aplicado exitosamente a muchas especies de árboles forestales, como en embriones cigóticos de *Quercus petraea*, *Aesculus hippocastanum* (Jorgensen, 1990), *Artocarpus* y *Juglans* (Whithers, 1992), en líneas embriogénicas de *Picea abies* (Durzan y Gupta, 1988), *Pinus taeda* (Gupta *et al.* 1987) y *Picea glauca*, *Acer pseudo-platanus* (Whithers, 1992), y en puntas de tallos de *Eucalyptus gunni* (Monod *et al.* 1992).

Hay seis pasos involucrados en la crio-preservación de cultivos *in vitro*: selección inicial del material vegetativo, pre-tratamientos, congelamiento, almacenamiento, des-congelamiento y post-tratamientos. Estos pasos se describen enseguida.

Selección de material vegetativo. El daño principal que se presenta durante el congelamiento (crio-preservación), es la formación de cristales de hielo intracelular con la subsecuente ruptura de las membranas celulares (revisado por Bajaj, 1985). Este tipo de daño puede minimizarse escogiendo tejido que contenga células pequeñas, densamente compactadas, con bajo contenido de agua. Los meristemas apicales son relativamente fáciles de crio-preservar debido a que contienen células pequeñas con bajo contenido de agua (Whithers, 1987). Asimismo, las semillas ortodoxas desecadas (con aproximadamente 3% de contenido de agua) (Styles *et al.* 1982), el polen (Bajaj, 1988) y las yemas latentes de árboles acondicionados para el invierno, son capaces de sobrevivir a la crio-preservación (Whithers, 1987). Pocos, si no es que ningún cultivo *in vitro*, son tolerantes al congelamiento. Por ejemplo, es difícil crio-preservar callo debido al alto contenido de agua en este tejido. De aquí que se deban seguir pasos específicos para asegurar que la viabilidad se mantenga durante el congelamiento y el des-congelamiento.

Pre-tratamientos. La tolerancia del tejido a la crio-preservación puede incrementarse por un buen número de métodos conocidos como pre-tratamientos. Estos métodos disminuyen el contenido de agua del tejido, minimizando así la incidencia de formación de hielo intracelular; o bien, el tejido se somete a una infusión de “crioprotectores”, inhibiendo, así, la formación de cristales de hielo intracelular.

No todos los tejidos son tolerantes a la desecación hasta un contenido bajo de agua. El polen y las semillas ortodoxas están clasificados como tolerantes a la desecación y la crio-preservación de estos tipos de tejidos es usualmente exitosa (Jorgensen, 1990). Muy pocos cultivos *in vitro* son tolerantes a la desecación hasta un bajo contenido de agua, de aquí que otros pre-tratamientos diferentes a la desecación deber ser usados.

Los cultivos *in vitro* que son intolerantes a la desecación pueden someterse a infusiones con “crioprotectores”. Los crioprotectores son sustancias químicas que alteran la permeabilidad de la

membrana celular, el punto de congelamiento y la respuesta del tejido al congelamiento (Whithers, 1992). Los crioprotectores más comúnmente utilizados son dimetil-sulfóxido (DMSO), glicerol, sorbitol o polietilen-glicol. El DMSO altera la permeabilidad de la membrana celular, permitiendo que otros crioprotectores también puedan minimizar el daño debido a la formación de hielo intracelular, protegiendo a las membranas celulares y sitios de dobleces enzimáticos del daño por formación de hielo. Si concentraciones muy altas de crioprotectores llegan por infusión dentro del tejido, las células se pueden vitrificar. La vitrificación es un estado físico que se presenta cuando un líquido adquiere tan alta viscosidad que semeja el estado sólido de un cristal amorfo (Leopold *et al.* 1994). El agua, como la que se encuentra en el citoplasma retenida en estado vitrificado no puede congelarse, es por esto que no se presenta la cristalización (Engelmann, 1991). Los tejidos se exponen a los crioprotectores por un corto período (aproximadamente 1 hora) a 0oC y entonces se congelan.

Congelamiento. El ritmo al que el cultivo *in vitro* es congelado puede ser crucial para su supervivencia. Generalmente, un ritmo lento de congelamiento inducirá deshidratación celular, normalmente con la subsecuente formación de cristales de hielo extracelulares. Un ritmo rápido de congelamiento causa congelamiento intracelular y deshidratación celular relativamente pequeña.

El congelamiento del tejido se hace normalmente en un congelador programable, que permite conducir el congelamiento a un ritmo predeterminado. Comúnmente, las células se enfrían a -1oC/ minuto hasta -30 ó -35oC y luego se mantienen a esta temperatura por aproximadamente 30 minutos, tiempo después del cual el tejido congelado se transfiere a nitrógeno líquido (Whithers y King, 1980).

Almacenamiento. Los tejidos congelados se almacenan a una temperatura mínima de -100oC. El nitrógeno líquido es usado como la sustancia de enfriamiento y esto da como resultado una temperatura de -196oC en el líquido mismo o una temperatura de aproximadamente -150oC en el material mantenido en fase de vapor sobre una fuente de nitrógeno líquido (Whithers, 1987).

Descongelación. Los tejidos retirados de la crio-preservación son descongelados de inmediato. Si el tejido es descongelado demasiado lentamente, se puede presentar la re-cristalización de hielo en el tejido. De aquí que se use una descongelación rápida. Normalmente, el tejido se coloca en agua tibia (aproximadamente a 45oC) o se coloca directamente en un medio de cultivo (Whithers, 1987).

Post-tratamientos. Los post-tratamientos se utilizan para estabilizar el material que ha sobrevivido al congelamiento. La mayoría de los cambios biofísicos que se presentaron en la célula como resultado del proceso de congelamiento y descongelación, han predispuesto al cultivo para daños posteriores. Una vez que el tejido ha sido descongelado, se lava para remover cualquier crioprotector que pudiera ser tóxico. El tejido se coloca entonces en un medio de cultivo y luego en un ambiente que promueva el crecimiento.

Aspectos relacionados con el almacenamiento de tejidos *in vitro*

Los dos aspectos de mayor interés asociados con el almacenamiento de cultivos *in vitro* son: 1) que la estabilidad genética del material vegetativo se preserve y, 2) que la viabilidad se mantenga. Debieran hacerse esfuerzos que puedan minimizar cualesquiera cambios genéticos durante el almacenamiento de los cultivos *in vitro* (ver la Sección 2: Manejo y procesamiento). Los cambios genéticos pueden detectarse simplemente con el examen de cualquier variación fenotípica en los cultivos (i.e. durante el almacenamiento de corto y mediano plazos). Los cambios genéticos de los cultivos *in vitro* después del almacenamiento pueden también detectarse mediante exámenes citológicos (i.e. número de cromosomas y contenido de DNA) y bioquímicos (i.e. electroforesis de enzimas).

Es necesario monitorear periódicamente la viabilidad del cultivo durante el almacenamiento. Esto es principalmente aplicable durante el almacenamiento de mediano y largo plazos. La prueba definitiva para la viabilidad es el crecimiento subsecuente del tejido. Sin embargo, los ensayos de viabilidad pueden usarse para realizar una evaluación rápida de ésta (Oberle y Watson. 1953; Kho y Baer. 1968). Estos ensayos de viabilidad involucran el teñido del tejido con tinturas como diacetato fluorescente o cloruro de tetrazolium, las cuales permiten la identificación de células viables. Sin embargo, la presencia de células viables no es una garantía de que el tejido crecerá. El tejido que ha sido crio-preservado puede estar en un estado conocido como "crio-shock". Las células, aunque viables, son incapaces de crecer. Los mecanismos bioquímicos de este proceso no son conocidos, pero se está realizando investigación en esta área.

El uso de la crio-preservación para el almacenamiento de germoplasma en la forma de cultivos *in vitro* tiene un potencial tremendo. Se requiere de más investigación para definir la combinación óptima de crioprotectores y para desarrollar procedimientos de evaluación para reforzar la recuperación después de la crio-preservación. La investigación actual sugiere que los procedimientos para la crio-preservación de cultivos *in vitro* son específicos para especies o para líneas. Por el momento, se desconoce si pueden desarrollarse procedimientos generalizados.

Comentarios finales

La calidad de la semilla es afectada por tres factores principales desde la recolección de frutos, a través de su manejo y procesamiento, hasta el almacenamiento. Conseguir semillas de alta calidad requiere grandes esfuerzos para asegurar que todos los requerimientos y condiciones involucradas en cada etapa sean satisfechos apropiadamente.

Aunque el almacenamiento de la semilla como tal es posible por extensos períodos para muchas especies de árboles, es importante entender su debilidad estática fundamental y sus grandes dificultades en la regeneración de las existencias de semillas cuando se utiliza almacenamiento de especies de árboles para la conservación de recursos genéticos (Finkeldey y Hattemer. 1993). Sin embargo, está claro que, por el momento, el almacenamiento de semillas de árboles forestales puede ser solamente considerado como una medida complementaria a la conservación *in situ* o de colecciones vivas de varias categorías de edad establecidas en el campo y disponibles para las colecciones de semillas y otros materiales reproductivos en una base continua (Wang *et al.* 1993).

Para el almacenamiento de cultivos *in vitro*, los principales aspectos de interés son la estabilidad genética del material vegetativo a ser preservado y el mantenimiento de su viabilidad. Para detectar cambios en la calidad genética y fisiológica de los cultivos *in vitro*, se requiere un monitoreo frecuente con una metodología rápida y confiable de evaluación. Aunque los hallazgos recientes señalan hacia un futuro promisorio de la crio-preservación, se necesita más investigación para desarrollar combinaciones óptimas de crioprotectores y procedimientos de evaluación para reforzar la recuperación después del crio-almacenamiento.

Literatura citada

- Allen, G.S. 1957. Better handling of a scarce commodity. *British Columbia Lumberman* 41: 32, 36.
- Ang, B.B. 1976. Problems of rubber seed. *In: H.F. Chin et al. (eds.), Seed technology in the tropics.* University of Pestanian, Kuala Lumpur, Malaysia. pp: 117-122.
- Arisman, H. and G.R. Powell. 1986. Effect of cone colour and seed extraction methods on yield and quality of seeds of *Pinus merkusii*. *Embryon* 211: 9-18.
- Bajaj, Y.P.S. 1985. Cryopreservation of embryos. *In: K.K. Kartha (ed.), Cryopreservation of plant cells and organs.* CRC Press, Boca Raton, Florida. pp: 227-242
- Bajaj, Y.P.S. 1988. Cryopreservation of pollen and pollen embryos and the establishment of pollen banks. *Int. Rev. Cryobiol.* 102: 397-420.
- Barton, L.V. 1961. *Seed preservation and longevity.* Leonard Hill Books, London.
- Berjak, P., J.M. Ferrant, D.J. Mycock, and N.W. Pammer. 1990. Recalcitrant (homoiohydrous) seed: the enigma of their desiccation sensitivity. *Seed Sci. Technol.* 18: 297-310.
- Bonner, F.T. 1980. Collection, conditioning and certification of forest tree seed. *In: P.K. Khosla (ed.), Advances in Forest Genetics.* Ambika Publications, New Delhi. pp: 60-78.
- Bonner, F.T. 1990. Storage of seeds: potential and limitations for germplasm conservation. *For. Ecol. Manage.* 35: 35-43.
- Bonner, F.T. 1991. Effect of cone storage on pine seed storage potential. *Southern J. Appl. For.* 15: 216-221.
- Bonner, F.T. and J.A. Vozzo. 1987. *Seed biology and technology of Quercus.* U.S.D.A. Forest Service General Technical Report SO-66. Southern Forest Experiment Station, New Orleans, Louisiana. 21 p.
- Brown, P.T.H. 1991. The spectrum of molecular changes associated with somaclonal variation. *IAPTC Newsletter* 66: 14-25.
- Carl, C.M., Jr. 1976. Effect of separation in n-pentane on storability of sugar maple seeds. U.S.D.A. Forest Service Research Note NE-218. Northeastern Forest Experiment Station, Broomhall, Pennsylvania.
- Caron, G.E., B.S.P. Wang, and H.O. Schooley. 1990. Effect of tree spacing and prechilling on germination of *Picea glauca* seed. *For. Chron.* 66: 388-392.
- Caron, G.E., B.S.P. Wang, and H.O. Shooley. 1993. Variation in *Picea glauca* seed germination associated with the year of cone collection. *Can. J. For. Res.* 23: 1306-1313.

- Cheng, H.Y., G.H. Zheng, and K.L. Tao. 1990. Effects of ultradrying on aging, cell ultrastructure, and vigour of Chinese cabbage seed. *Plant Genetic Resources Newsletter* 83/84: 9-14.
- Chien, C.T. and T.P. Lin. 1994. Mechanism of hydrogen peroxide in improving the germination of *Cinnamomun camphora* seeds. *Seed Sci. Technol.* 22: 231-236.
- Chin, H.F. 1975. Germination and storage of rambutan (*Nephelium lappaceum*) seeds. *Malaysian Agric. Res.* 4: 173-180.
- Chin, H.F. 1978. Production and storage of recalcitrant seeds in the tropics: seed problems. *Acta Hort. (Wageningen)* 83: 17-21.
- Chin, H.F. and E.H. Roberts (eds). 1980. Recalcitrant crop seeds. Tropical Press, Kuala Lumpur, Malaysia. 152 p.
- Dickie, J.B., R.H. Ellis, H.L. Kraak, K. Ryder, and P.B. Tompsett. 1990. Temperature and seed storage longevity. *Ann. Bot.* 65: 197-204.
- Durzan, D.J. and P.K. Gupta. 1988. Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in conifers. *Adv. Biotechnol. Process* 9: 53-81.
- Ellis, R.H., T.D. Hong, and E.H. Roberts. 1990. An intermediate category of seed storage behavior. *J. Exp. Bot.* 41: 1167-1174.
- Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. *Euphytica* 57: 227-243.
- Engelmann, F. 1992. Cryopreservation of embryos. *In: Y. Dumas and A. Gallais (eds.), Reproductive biology and plant breeding.* Springer-Verlag, Berlin. pp: 281-290.
- Evans, H. 1953. Results of some experiments on the preservation of cocoa seed in a viable condition. *Trop. Agric. (Thailand)* 27: 48-55.
- FAO. 1994. Biotechnology in forest tree improvement. *FAO Forestry Paper* 118, Rome. pp: 31-35.
- Farrant, J.M., N.W. Pammenter, and P. Berjak. 1988. Recalcitrance - a current assessment. *Seed Sci. Technol.* 16: 155-166.
- Finkeldey, R. and H.H. Hattemer. 1993. Gene resources and gene conservation with emphasis on tropical forests. *FAO/BPGR Plant Genetic Resources Newsletter (1993)* 94/95: 5-10.
- Gardener, R.C.B. 1937. Storage of acorns. *Quarterly J. For.* 31: 32-33.
- George, E.F. and P.D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Limited, Eversley, England. 709 p.
- Gunn, B., M. McDonald, and J. Moriarty (compilers). 1987. Seed collections of *Acacia auriculiformis* from natural populations in Papua New Guinea and northern Australia. Multi-purpose Tree Species Network Research Series Report No. 4. Forestry/Fuelwood Research and Development Project, Bangkok, Thailand. 58 p.
- Gupta, P.K., D. Shaw, and D.J. Durzan. 1987. Loblolly pine; micropropagation, somatic embryogenesis and encapsulation. *In: J.M. Bonga and D.J. Durzan (eds.), Cell and tissue culture in forestry.* Vol. 3, Case histories: gymnosperms, angiosperms and palms. Martinus Nijhoff, Dordrecht. pp: 101-108.
- Harrington, J.F. 1972. Seed storage and longevity. *In: T.T. Kozłowski (ed.), Seed biology,* Vol. 3. Academic Press, New York. pp: 145-240
- Hawkes, J.G. 1980. Crop genetic resources field collection manual for seed crops, root and tuber crops, tree fruit crops and related wild species. International Board for Plant Genetic Resources and European Association for Research on Plant Breeding (EUCARPIA), Wageningen, Netherlands. 37 p.
- Hedegart, H. 1975. Seed collection of teak. Report on the FAO/DANIDA Training Course on Forest Seed Collection and Handling, vol. 2: 274-279.
- Heit, C.E. 1967a. Propagation from seed. Part 10: storage methods for conifer seeds. *Am. Nurseryman* 126: 14-15, 38-54.
- Heit, C.E. 1967b. Propagation from seed. Part 11. storage of deciduous tree and shrub seeds. *Am. Nurseryman* 126: 12-13, 86-94.
- Holmes, G.D. and G. Busziewicz. 1958. The storage of seed of temperate forest tree species. *For. Abstracts* 19: 313-322; 19: 455-475.
- Honjo, H. and Y. Nakagawa. 1978. Suitable temperature and seed moisture content for maintaining the germinability of citrus seed for long term storage. *In: T. Akihima and K. Nakajima (eds.), Long-term preservation of favorable germplasm in arboreal crops.* Forest Tree Research Station, M.A.F., Japan. pp: 31-35.
- IBPGR. 1976. Report of IBPGR Working group on engineering, design and cost aspects of long-term seed storage facilities. International Board for Plant Genetic Resources Secretariat, Rome. 19 p.
- IBPGR. 1982. Report of the first meeting of the IBPGR *ad hoc* advisory committee on seed storage. International Board for Plant Genetic Resources Secretariat, Rome. 13 p.
- International Seed Testing Association (ISTA). 1993. International rules for seed testing 1993. *Seed Sci. Technol.* 21 (suppl.): 7-21.

- Jaynes, R.A. 1969. Long-term storage of chestnut seed and scion wood. 60th Annual Report, Northern Nut Growers Association (East Lansing, Michigan): 163-166.
- Jorgensen, J. 1990. Conservation of valuable gene resources by cryopreservation in some forest tree species. *J. Plant Physiol.* 136: 373-376.
- Karp, A. 1989. Can genetic instability be controlled in plant tissue cultures? *IAPTC Newsletter* 58: 2-11.
- Kartha, K.K., F. Constabel, and J.P. Shyluk. 1974. Regeneration of cassava plants from apical meristems. *Plant Sci. Letters* 2: 107-113.
- Kemp, R.H. 1975. Seed collection: temporary storage and transport, documentation, training, safety and supervision. *In: Report on FAO/DANIDA Training Course on Forest Seed Collection and Handling, vol. II.* FAO, Rome. pp: 123-128.
- Kho, Y.O. and J. Baer. 1968. Observing pollen tubes by means of fluorescence. *Euphytica* 17: 298-302.
- King, M.W. and E.H. Roberts. 1979. The storage of recalcitrant seeds- achievements and possible approaches. International Board for Plant Genetic Resources Secretariat, Rome.
- King, M.W. and E.H. Roberts. 1980. Maintenance of recalcitrant seeds in storage. *In: H.F. Chin and E.H. Roberts (eds.), Recalcitrant crop seeds.* Tropical Press, Kuala Lumpur, Malaysia. pp: 53-79.
- Kioko, J., J. Albrecht, and S. Uncovsky. 1993. Seed collection and handling. *In: J. Albrecht (ed.), Tree seed handbook of Kenya.* GTZ Forestry Seed Centre, Muguga, Kenya. German Development Cooperation, Kenya Forestry Seed Centre, Nairobi, Kenya. pp: 30-54.
- Korstian, C.F. 1930. Acorn storage in the southern states. *J. For.* 28:858-863.
- Large, J.R., D.F. Fernholz, S. Merrill, Jr., and G.F. Potter. 1947. Longevity of tung seed as affected by storage temperatures. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 49: 147-150.
- Larkin, P.J. 1987. Somaclonal variation: history, method, and meaning. *Iowa State J. Res.* 61: 393-434.
- Larkin, P.J. and W.R. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Gen.* 60: 197-214.
- Leon, J. 1974. Coffee (*Coffea*) spp. *In: Handbook of plant introduction in tropical crops.* Plant Protection Division, FAO, Rome.
- Leopold, A.C., W.Q. Sun, and I. Bernal-Lugo. 1994. The glassy state in seeds: analysis and function. *Seed Sci. Res.* 4: 267-274.
- Lin, T.P. and J.C. Wu. 1995. Seed storage behaviour of *Michelia compressa* (Max.) Sargent. *Seed Sci. Technol.* 23: 309-319.
- Maury-Lechon, G., A.M. Hassan, and D. Bravo. 1981. Seed Storage of *Shorea parvifolia* and *Dipterocarpus humeratus*. *Malaysian Forester* 44: 267-280.
- Monod, V., M. Poissonnier, J. Dereuddre, and M. Paques. 1992. Successful cryopreservation of *Eucalyptus gunnii* shoot-tips in liquid nitrogen. *In: Proceedings: Mass production technology for genetically improved fast growing forest tree species, 14-18 September 1992, Bordeaux.* AFOCEL, Nangis. pp: 135-145.
- Ng, F.S.P. and H.S. Loh. 1974. Flowering to fruiting periods of Malaysian trees. *Malaysian Forester* 37: 127-133.
- Oberle, G.B. and R. Watson. 1953. The use of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride in viability tests of fruit pollen. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 61: 299-303.
- Orton, T. J. 1984. Genetic variation in somatic tissues: method or madness. *Adv. Plant Pathol.* 2: 153-159.
- Panochit, J., P. Wasuwanich, and A.K. Hellum. 1986. Collection and storage of seeds of *Shorea roxburghii* D. Don. ASEAN-Canada Forest Tree Seed Centre, Muak-Lek, Saraburi, Thailand. *Embryon* 2: 62-67.
- Pence, V.C. 1990. Cryostorage of embryo axes of several large-seeded temperate tree species. *Cryobiology* 27: 212-218.
- Pence, V.C. 1992. Desiccation and the survival of *Aesculus*, *Castanea*, and *Quercus* embryo axes through cryopreservation. *Cryobiology* 29: 391-399.
- Pritchard, H.W. and F.G. Prendergast. 1986. Effects of desiccation and cryopreservation on the *in vitro* viability of embryos of recalcitrant seed species *Araucaria hunsteinii* K. Schum. *J. Exp. Bot.* 37: 1388-1397.
- Rediske, J. and D.C. Nicholson. 1965. Maturation of noble fir seed - a biochemical study. *Forestry Paper* 2. Weyerhaeuser Company, Centralia, Washington. 15 p.
- Roberts, W.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Sci. Technol.* 63: 53-63.
- Roberts, E.H. and R.H. Ellis. 1977. Prediction of seed longevity at sub-zero temperatures and genetic resources/conservation. *Nature* 268: 431-433.
- Scowcroft, W.R. 1984. Genetic variability in tissue culture: impact of germplasm conservation and utilization. International Board for Plant Genetic Resources Secretariat, Rome. pp: 1-47.

- Standwood, P.C. 1985. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. *In*: K.K. Kartha (ed.), Cryopreservation of plant cells and organs. CRC, Boca Raton, Florida. pp: 199-226.
- Styles, E.D., J.M. Burgess, C. Mason, and B.M. Hubber. 1982. Storage of seed in liquid nitrogen. *Cryobiology* 19: 195-199.
- Surber, E., I. Kälin, A. Simonett, and E. Frehner. 1973. Freeze-drying of forest tree seeds, especially of spruce (*Picea abies* (L.) Karst) for long-term storage. Paper No. 24, Proceedings International Symposium Seed Processing, Bergen, Norway, 1973. Vol. I. IUFRO Working Party S2.01.06. Royal College of Forestry, Stockholm. 13 p.
- Suszka, B. 1976. Studies on long-term storage of acorns. Final Report 1970-1976. Polish Academy of Sciences, Institute of Dendrology, Kórnik, Poland. 24 p.
- Suszka, B. and T. Tylkowski. 1981. Storage of acorns of the English oak (*Quercus robur* L.) over 1-5 winters. *Arboretum Kornickie* 25: 199-229.
- Suszka, B. and T. Tylkowski. 1982. Storage of acorns of the northern red oak (*Quercus borealis* Michx. = *Q. rubra* L.) over 1-5 winters. *Arboretum Kornickie* 26: 253-306.
- Tang, H.T. and C. Tamari. 1973. Seed description and storage tests of some dipterocarps. *Malaysian Forester* 36: 38-53.
- Texeira, M.R. 1955. Chestnut storage trials. Report to the FAO of the United Nations, No. FAO/CH/13-A, Paper 3e, Rome.
- Tompsett, P.B. 1987. A review of the literature on storage of dipterocarp seeds. *In*: Proceedings, International Symposium on Forest Seed Problems in Africa. Department of Forest Genetics, Swedish University of Agricultural Sciences, Umeå. pp: 348-365.
- Turnbull, J. W. 1975. Seed collection-sampling considerations and collection techniques. Report on the FAO/DANIDA Training Course on Forest Seed Collection and Handling, vol. 2: 101-122.
- Tylkowski, T. 1976. Respiration of northern red oak (*Quercus borealis* Michx.) acorns. *Arboretum Kornickie* 21: 313-322.
- Villiers, T.A. 1974. Seed aging: chromosome stability and extended viability of seeds stored fully imbibed. *Plant Physiol.* 53: 875-878.
- Villiers, T.A. and D.J. Edgcumbe. 1975. On the cause of deterioration in dry storage. *Seed Sci. Technol.* 3: 761-774.
- Vozzo, J.A. 1976. Effects of CO₂ storage atmospheres on viability of *Quercus nigra* acorns. *In*: Proceedings Second International Symposium on Physiology of Seed Germination, October 18-30, 1976, Fujii, Japan. Government Forest Experiment Station, Tokyo, Japan. pp: 175-178.
- Wang, B.S.P. 1971. The role of forest tree seed storage in conservation. *In*: D.P. Fowler and C.W. Yeatman (eds.), Proceedings of a Symposium on Conservation of Forest Gene Resources. Thirteenth Meeting of the Committee on Forest Tree Breeding in Canada. Part 2. Canadian Forest Service, Department of Environment, Ottawa. pp: 25-29.
- Wang, B.S.P. 1973. Collecting, processing and storing tree seed for research use. Proceedings IUFRO International Symposium on Seed Processing, Bergen, Norway, vol. 1. Paper No. 17. 12 p.
- Wang, B.S.P. 1974. Tree seed storage. Department of Environment, Canadian Forest Service Publication No. 1335. Ottawa. 32 p.
- Wang, B.S.P. 1975. Tree seed and pollen storage for genetic conservation: possibilities and limitations. *In*: The methodology of conservation of forest genetic resources. Report, FAO, Rome. pp: 93-103.
- Wang, B.S.P. 1976. Forest tree seed quality. Proceedings of the Fifteenth Meeting of the Canadian Tree Improvement Association. Part 2. pp: 68-78.
- Wang, B.S.P., P.J. Charest, and B. Downie. 1993. *Ex situ* storage of seeds, pollen and *in vitro* cultures of perennial woody plant species. FAO Forestry Paper 113, FAO, Rome. pp: 16-28.
- Wang, B.S.P., B. Downie, S. Wetzel, D. Palamarek, and R. Hamilton. 1991. Effects of cone scorching on germinability, vigour, and seed extraction efficiency of lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia* Engelm.) seeds in Alberta. *Seed. Sci. Technol.* 20: 409-419.
- Whithers, L.A. 1987. Long-term preservation of plant cells, tissues and organs. Oxford surveys of plant molecular and cell biology, vol. 4. pp: 221-272.
- Whithers, L.A. 1992. *In vitro* conservation. *In*: F.A. Hammerschlag and R.E. Litz (eds.), Biotechnology of perennial fruit crops. CAB, Wallingford, England. pp: 57-63.
- Whithers, L.A. and P.J. King. 1980. A simple freezing unit and routine cryopreservation method for plant cell cultures. *Cryo-letters* 1: 213-220.
- Willan, R.H. (compiler). 1985. A guide to forest seed handling. FAO Forestry Paper 20/2, FAO, Rome. 443 p.
- Yeatman, C.W. and T.C. Nieman. 1978. Safe tree climbing in forest management. Forestry Technical Report 24. Canadian Forest Service, Ottawa. 35 p.

9

DISEÑOS GENÉTICOS Y MÉTODOS
ESTADÍSTICOS EN LA EVALUACIÓN DE
GERMOPLASMA DE ESPECIES FORESTALES

*J. Jesús Vargas-Hernández y
Javier López-Upton*

Resumen

Introducción

Elección de un diseño de cruzamiento adecuado

Análisis estadístico de los ensayos genéticos

DISEÑOS GENÉTICOS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS EN LA EVALUACIÓN DE GERMOPLASMA DE ESPECIES FORESTALES

J. Jesús Vargas-Hernández y Javier López-Upton

Programa Forestal, Colegio de Postgraduados,
Km. 35.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Edo. de México, México. C.P. 56230.
vargashj@colpos.mx y uptonj@colpos.mx

Resumen

La etapa de evaluación genética es esencial en los programas de manejo y conservación de los recursos genéticos forestales. Esta etapa permite generar la información necesaria para caracterizar y seleccionar los materiales adecuados para las siguientes fases del programa. Debido a que el tipo y calidad de la información que se obtiene de los ensayos de evaluación genética dependen de los diseños de cruzamiento y diseños experimentales que se utilicen, es necesario considerar y priorizar los objetivos de los ensayos para elegir los diseños más adecuados a cada caso en particular.

En algunas situaciones es posible emplear diseños de cruzamiento complementarios que permitan cumplir en forma eficiente varios objetivos en menor tiempo y costo. Subdividir la población de cruzamiento puede ser útil para reducir el número de cruza necesarias y evitar los efectos de la endogamia en las poblaciones de producción de semilla mejorada (huertos semilleros). Al establecer el ensayo de campo es necesario considerar el tipo, tamaño y distribución de las parcelas para satisfacer los objetivos de la evaluación. El mantenimiento de los ensayos es importante para reducir la mortalidad y la variabilidad ambiental durante el período de evaluación. El análisis estadístico de la información se complica cuando se presentan fuertes desbalances en el diseño experimental debido a diferencias en el número de individuos y/o parcelas por entidad genética

Introducción

En las etapas iniciales de un programa de mejoramiento, los individuos que se eligen para la obtención de semilla en forma inmediata o para el establecimiento de huertos semilleros y la continuación del programa, generalmente se seleccionan con base en sus características fenotípicas superiores a las de los árboles vecinos. Sin embargo, debido al efecto de las condiciones ambientales sobre el fenotipo, es posible que la superioridad observada en estos árboles no se deba a causas genéticas, sino a diferencias ambientales de los sitios donde están creciendo los árboles.

La única manera de asegurar que las características fenotípicas observadas se deben a factores genéticos es evaluando el comportamiento de estos individuos directamente, mediante clonación o indirectamente mediante la progenie, en condiciones ambientales similares. Esta fase del programa de mejoramiento genético es lo que se conoce como evaluación genética del material, y es indispensable para asegurar el éxito de la selección fenotípica en todo programa de mejoramiento genético serio. Además de estimar el valor genético de los individuos, la etapa de evaluación genera la información genética básica necesaria para diseñar la estrategia de selección y manejo de las poblaciones de producción de germoplasma (huertos semilleros) y los materiales indispensables para los ciclos de selección en las generaciones siguientes del programa de mejoramiento genético.

Debido a lo anterior, es importante diseñar y establecer el programa de evaluación genética en forma cuidadosa para optimizar las ganancias genéticas tanto a corto como a largo plazo. De hecho, esta fase del programa de mejoramiento genético es una de las etapas más costosas, pero la rentabilidad del programa estará relacionada directamente con la calidad de la información obtenida en la fase de evaluación genética.

Los ensayos de evaluación genética pueden cumplir varios objetivos diferentes; sin embargo, un solo diseño de evaluación difícilmente podrá cumplir adecuadamente con todos los objetivos, por lo que es necesario elegir el diseño adecuado para cada objetivo. En algunas ocasiones es posible desarrollar diseños complementarios para satisfacer varios objetivos simultáneamente.

Los objetivos particulares de los ensayos de evaluación genética pueden ser (Burdon y Shelbourne. 1971; McKinley. 1983; Zobel y Talbert. 1984):

1. Evaluación de los padres (Pruebas de progenie). La evaluación del comportamiento de la progenie en un ambiente determinado permite estimar el valor reproductivo (valor genético aditivo) de los padres. Es decir, permite identificar aquellos progenitores que tienen un fenotipo superior por causas genéticas, de aquellos que son superiores por crecer en condiciones ambientales favorables. De esta manera, los individuos cuya superioridad fenotípica no tiene bases genéticas pueden ser eliminados del programa de mejoramiento genético y de las poblaciones de producción de semilla.
2. Estimación de parámetros genéticos. Los ensayos de evaluación permiten estimar los componentes de varianza, heredabilidades y correlaciones genéticas entre las características de interés en el programa de mejoramiento genético. Con esta información se pueden tomar decisiones sobre los caracteres que se deben enfatizar en el programa y establecer los métodos de selección más eficientes para optimizar las ganancias genéticas a corto y a largo plazo (Stonecypher. 1969).
3. Producción de una población base para el siguiente ciclo de selección y cruzamiento. Esta es quizás la función más importante de los ensayos de evaluación genética, ya que permite la continuidad del programa de mejoramiento genético a largo plazo (van Buijtenen. 1976). Sin embargo, las posibilidades de seleccionar los genotipos superiores directamente en los

ensayos de evaluación dependen de los esquemas de cruzamiento que se hayan empleado para establecer la prueba.

4. Demostración de ganancias genéticas. Si en los ensayos de evaluación se incluye material no seleccionado como testigo, se podrán determinar fácilmente las ganancias genéticas alcanzadas por el programa de mejoramiento genético. Este objetivo es importante para convencer a las personas responsables del financiamiento del programa.
5. Producción de semilla mejorada. En ocasiones es posible utilizar los ensayos de evaluación, una vez que se ha hecho la selección de los mejores individuos o familias, para la producción comercial de semilla mejorada. La conversión de un ensayo de evaluación en un huerto semillero permite acelerar la obtención del germoplasma mejorado para los programas de plantaciones. Sin embargo, difícilmente se puede optimizar la cantidad y calidad genética de la semilla producida de esta manera, debido a las condiciones iniciales de crecimiento y distribución del material genético en el ensayo.

En la mayoría de los casos es difícil que un solo diseño de evaluación genética permita cumplir todos los objetivos anteriores en forma satisfactoria, pues comúnmente las características que favorecen un objetivo en particular tienden a limitar el logro de otros. Lo ideal es diseñar los ensayos de evaluación para optimizar el logro de un solo objetivo; sin embargo, debido a las restricciones en recursos disponibles esto tampoco es posible. Bajo estas circunstancias, se hace necesario asignar prioridades a los objetivos deseados en función de las metas del programa de mejoramiento genético. Así, el ensayo se establece con el diseño más adecuado que permita satisfacer el objetivo más importante y a la vez genere la mayor información posible para cumplir los otros objetivos.

En función de las prioridades establecidas con respecto a los objetivos, es necesario definir el diseño de cruzamiento y el diseño experimental más adecuados para generar las progenies y establecer los ensayos de evaluación genética en el campo. El tipo y calidad de la información que se derive de los ensayos de campo depende de los diseños de cruzamiento y experimentales que se hayan empleado.

Elección de un diseño de cruzamiento adecuado

La elección del diseño de cruzamiento a emplear entre los individuos de la población base de mejoramiento constituye la decisión central del programa de evaluación genética. De estos diseños dependen el tipo, número y tamaño de las progenies distintas que se generen y, por lo tanto, el tipo de información genética que se pueda obtener de los ensayos de campo para la evaluación de los progenitores y la estimación de parámetros genéticos, así como el tipo de material disponible para las siguientes generaciones de selección (van Buijtenen y Namkoong. 1983).

Existen dos tipos generales de diseños de cruzamiento: (a) diseños de pedigrí incompleto, en donde sólo se conoce la fuente materna, por lo que las progenies resultantes constituyen familias de medios hermanos, y (b) diseños de pedigrí completo, donde se conocen las dos fuentes parentales, por lo que las progenies constituyen familias de hermanos completos. En este último caso es indispensable realizar cruces controladas entre los progenitores.

Diseños de pedigrí incompleto.

Los diseños más comúnmente empleados dentro de este grupo son los de polinización libre y el de policruza. El primer caso es el más simple y económico de todos, ya que consiste en coleccionar la semilla producto de la polinización libre en los árboles seleccionados, ya sea en rodales naturales, plantaciones, ensayos de evaluación o en huertos semilleros. La policruza es similar al anterior, pero en lugar de depender de una mezcla natural de polen para cada progenitor femenino, se usa una mezcla de polen de varios árboles seleccionados para hacer cruza controladas en los progenitores femeninos. De esta manera se conoce el número y calidad promedio de los progenitores machos.

Estos diseños permiten estimar la aptitud combinatoria general (ACG) de los padres y estimar los parámetros genéticos relacionados con la varianza aditiva sin necesidad de realizar cruza controladas, pero no permiten la estimación de la aptitud combinatoria específica (ACE) ni de la varianza no aditiva. Debido a que no se conoce la relación genética entre las familias de medios hermanos, se corren riesgos de aumentar la endogamia si se utiliza como población de selección para las siguientes generaciones. Burdon y Shelbourne (1971) describen en forma detallada el diseño clásico de la policruza y algunas de sus posibles modificaciones para resolver los problemas mencionados anteriormente.

Diseños de pedigrí completo.

Dentro de este grupo de diseños se incluyen los dialelos (completo, medio, parcial y desconectado), los factoriales (completo y desconectado), el diseño anidado o jerárquico, y el de cruza simple (Figura 1). Con excepción del diseño de cruza simple, todos los diseños de pedigrí completo permiten estimar en forma adecuada (aunque unos de manera más precisa que otros) tanto la ACG como la ACE y los componentes de varianza genética (aditiva y no aditiva) para definir la estrategia de selección más adecuada (Namkoong *et al.* 1966; Namkoong y Roberds. 1974). Sin embargo, generalmente el tamaño de las familias se reduce, y se requiere una gran cantidad de cruza controladas para generar un número adecuado de familias no emparentadas genéticamente entre sí para usarse en los siguientes ciclos de selección.

a) Dialelo completo

		Machos											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Hembras	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

144 Cruzas controladas
6 Familias no relacionadas genéticamente

b) Dialelos modificados

		Machos											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Hembras	1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	2		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	3			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	4				X	X	X	X	X	X	X	X	X
	5					X	X	X	X	X	X	X	X
	6						X	X	X	X	X	X	X
	7							X	X	X	X	X	X
	8								X	X	X	X	X
	9									X	X	X	X
	10										X	X	X
	11											X	X
	12												X

Menor número de cruza controladas
Igual número de familias no relacionadas genéticamente

c) Factorial

		Machos											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Hembras	1												
	2												
	3												
	4												
	5	X	X	X	X								
	6	X	X	X	X								
	7	X	X	X	X								
	8	X	X	X	X								
	9	X	X	X	X								
	10	X	X	X	X								
	11	X	X	X	X								
	12	X	X	X	X								

Factorial 4X8: 32 cruza
4 Familias no relacionadas genéticamente

d) Anidado

		Machos											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Hembras	1												
	2	X											
	3	X											
	4	X											
	5												
	6					X							
	7					X							
	8					X							
	9												
	10									X			
	11									X			
	12									X			

3 Grupos anidados (1 en 3): 9 cruza
3 Familias no relacionadas genéticamente

Figura 1. Diseños de cruzamiento de pedigrí completo más utilizados en especies forestales.

El dialelo completo consiste de todas las cruza posibles entre los progenitores disponibles, incluyendo autofecundaciones y cruza recíprocas, por lo que sólo es posible en especies monoicas (Figura 1). En especies forestales es prácticamente imposible cuando se tienen más de 25 individuos en la población, debido a los costos y la cantidad de flores necesarias; los dialelos modificados (medios, parciales y desconectados) permiten reducir substancialmente el número de cruza, pero también se reduce la precisión de la información genética (van Buijtenen y Namkoong. 1983).

En el diseño factorial, los progenitores se separan en dos grupos (machos y hembras), realizando todas las cruza posibles entre los dos grupos. Este diseño es empleado en especies dioicas, aunque

también puede usarse en monoicas, asignando un sexo en particular a cada individuo (Figura 1). El diseño factorial es eficiente para la estimación de parámetros genéticos cuando se utiliza un número igual de machos y hembras (Namkoong y Roberds. 1974). Sin embargo, debido a que generalmente uno de los grupos (machos) es más pequeño que el otro, una gran proporción de las cruzas realizadas produce familias emparentadas entre sí. Este problema se reduce si se utiliza un factorial desconectado, en donde la población se divide en varios grupos pequeños y los individuos de cada grupo se cruzan de acuerdo con el diseño factorial.

En el diseño anidado o jerárquico, un individuo de un sexo (generalmente paterno) se cruza con un grupo de individuos del otro sexo (materno), de tal manera que se generan varias familias de hermanos completos (maternos), que constituyen una familia de medios hermanos paternos (Figura 1). El número de familias no emparentadas que resultan con este diseño depende del número de progenitores del sexo empleado con menor frecuencia en las cruzas (machos, en este caso). Este diseño es útil para la estimación de parámetros genéticos, especialmente si se genera un buen número de familias de medios hermanos, pero no para la evaluación de los progenitores o selección de familias (Pepper y Namkoong. 1978; van Buijtenen y Namkoong. 1983). Por lo anterior, generalmente se recomienda su uso como un diseño complementario a otro donde se puedan cumplir los otros objetivos (van Buijtenen y Bridgwater. 1986).

El diseño de cruzas simples es el opuesto al diseño dialelo, ya que en este caso cada progenitor participa exclusivamente en una sola cruce con otro individuo (sería equivalente a un dialelo medio desconectado con grupos de dos individuos). Este diseño permite obtener el máximo número de familias no emparentadas genéticamente con el mínimo número de cruzas, por lo que es muy adecuado para generar la población base para el siguiente ciclo de selección (Burdon *et al.* 1977). Sin embargo, debido a que sólo se tiene una cruce por individuo, no permite generar información sobre los valores reproductivos o aptitud combinatoria de los progenitores, ni estimar los parámetros genéticos necesarios para la selección (Zobel y Talbert. 1984).

En la práctica ningún diseño de cruzamiento es eficiente para cumplir por sí solo los tres objetivos principales de los ensayos de evaluación genética en forma satisfactoria. El único diseño que en teoría permite lograrlo (el dialelo completo o medio), es sumamente costoso e impráctico de realizar en un programa operativo de mejoramiento genético. Una alternativa útil para resolver este problema es emplear dos o más diseños complementarios que en forma combinada sean eficientes para cumplir los tres objetivos principales (van Buijtenen y Namkoong. 1983; van Buijtenen y Bridgwater. 1986).

Por ejemplo, si únicamente se desea estimar la ACG y la heredabilidad en sentido estricto, los diseños de pedigrí incompleto son suficientes. Estos diseños se pueden complementar con un diseño de cruzas simples para generar la población de selección para las siguientes generaciones. Además de su simplicidad, estos diseños son de bajo costo y permiten obtener con rapidez un número elevado de familias de tamaño adecuado para aumentar las posibilidades de selección combinada (entre y dentro de familias).

En estudios donde se ha comparado la eficiencia práctica de varios diseños genéticos, se ha demostrado que independientemente del costo, los diseños sencillos y rápidos de realizar permiten obtener casi las mismas respuestas por unidad de tiempo que los diseños más sofisticados (Cotteril. 1986). Debido a que la mayoría de las características de importancia en las especies forestales tiene una heredabilidad baja, es importante estimar con precisión los valores promedio por familias y generar un diferencial de selección relativamente elevado para aumentar la eficiencia de la selección. Para ello se requiere tener el mayor número posible de familias con un buen número de individuos cada una (van Buijtenen y Namkoong. 1983).

Subdivisión de la población de mejoramiento

Uno de los problemas fundamentales de los ensayos de evaluación es establecer la población para las generaciones avanzadas de mejoramiento genético, ya que a menos que el número de familias no emparentadas genéticamente sea muy elevado (tamaño efectivo de la población), en las generaciones siguientes se tendrán problemas de endogamia, con los posibles efectos negativos de depresión genética en las poblaciones de producción de semilla (Namkoong *et al.* 1966; Lobby. 1973).

En la primera generación del programa no existe ese problema, pues generalmente los progenitores provienen de diferentes rodales naturales o plantaciones. Aun cuando la progenie se haya originado por polinización libre, difícilmente existirá consanguinidad entre las familias. A partir de la siguiente generación el problema se puede controlar si se asegura un número suficiente de familias no relacionadas entre sí mediante cruzas controladas y se selecciona únicamente un individuo por familia para la siguiente generación de cruzamiento.

Sin embargo, en las siguientes generaciones es necesario mantener registros de las cruzas para evitar en lo posible cruces entre parientes, o al menos controlar el aumento en la endogamia dentro de la población de cruzamiento. Existen varios esquemas de cruces simples que permiten evitar o controlar el avance de la endogamia durante las primeras generaciones, aunque tarde o temprano ésta empezará a aumentar más rápidamente (Namkoong. 1979).

Una alternativa al problema de la endogamia es la subdivisión de la población de cruzamiento en lo que se conoce como "sublíneas" (Burdon y Namkoong. 1983). Este esquema está diseñado para evitar la endogamia en los huertos semilleros de producción comercial, aun cuando ésta se presente en la población de cruzamiento. Con este propósito, la población de mejoramiento se divide en varios grupos de cruzamiento pequeños (15-30 individuos). Las cruces sólo se realizan entre los individuos de cada sublínea, pero no entre individuos de diferentes sublíneas (Burdon *et al.* 1977; McKeand. 1982; Kang y Nienstaedt. 1987).

Al momento de establecer los huertos semilleros, se selecciona un solo individuo de cada sublínea, de tal manera que se evita por completo la posibilidad de consanguinidad genética entre ellos, aun cuando las sublíneas ya hayan acumulado cierto nivel de endogamia (Figura 2). Con este sistema no es indispensable realizar cruces controladas dentro de cada sublínea, aunque su realización puede ayudar a mantener un nivel similar de endogamia entre los individuos de cada grupo (van Buijtenen y Namkoong. 1983). McKeand *et al.* (1986) describen el uso de una estrategia de este tipo en el manejo de generaciones avanzadas en un programa de mejoramiento genético de *Pinus taeda* L. en el Sureste de Estados Unidos.

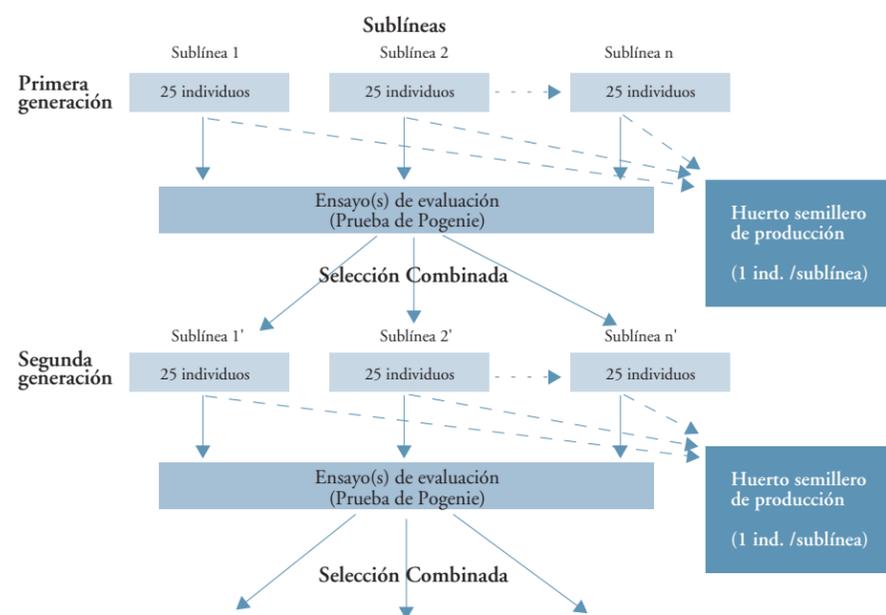


Figura 2. Separación de la población de cruzamiento en sublíneas para evitar el problema de la endogamia en los huertos semilleros (Adaptado de Zobel y Talbert, 1984).

Diseños experimentales utilizados en los ensayos de evaluación genética

La calidad (precisión) de la información que se obtiene de un ensayo de evaluación genética depende del diseño experimental que se utilice. La elección de un diseño experimental para el establecimiento de los ensayos de evaluación en campo no es una decisión fácil, debido a que comúnmente se deben satisfacer varios objetivos simultáneamente en términos del uso de la información.

El objetivo general del diseño experimental es separar la variación ambiental de la variación genética, de tal manera que se puedan estimar con precisión los valores reproductivos de los padres y los parámetros genéticos necesarios para definir la estrategia de selección. Sin embargo, la eficiencia con que un diseño en particular logra estos propósitos depende de muchos factores, incluyendo la variabilidad del sitio y el número y tamaño de las familias consideradas en el ensayo (Bridgwater *et al.* 1983).

La evaluación de los progenitores (pruebas de progenie) requiere una estimación precisa de los valores promedio de cada familia, para detectar diferencias entre un número reducido de ellas, como cuando se desea establecer o aclarar un huerto semillero clonal. Para lograr lo anterior, las familias deben estar representadas por un buen número de individuos (20-30), que permitan muestrear adecuadamente la variación ambiental y genética (Robertson, 1959).

En el caso de la estimación de parámetros genéticos, el diseño experimental debe estar orientado a estimar con precisión los componentes de varianza y covarianza y la heredabilidad, lo cual normalmente requiere un mayor número de familias. Cuando el objetivo es producir una población base para el siguiente ciclo de selección, se deben tener el número y tamaño de familias suficiente para alcanzar los diferenciales de selección apropiados entre y dentro de familias; sin embargo si se aumenta el tamaño del ensayo en forma excesiva, la varianza ambiental reducirá la precisión de la selección (Bridgwater *et al.* 1983).

Características de los diseños más comunes

Los tres diseños experimentales más ampliamente utilizados en los ensayos de evaluación genética de especies forestales son: (a) completamente al azar, (b) bloques completos al azar y (c) bloques incompletos (por ejemplo, látices). En la mayoría de los libros de diseños experimentales se describen las ventajas y desventajas estadísticas de estos diseños (Steel y Torrie, 1960; Martínez, 1988).

Los diseños completamente al azar permiten incluir familias con diferente número de individuos, y el análisis estadístico es muy simple, aun si se pierden parcelas completas por mortalidad, situación relativamente común en el caso de los ensayos con especies forestales. Sin embargo, debido a la extensión requerida para los ensayos y a la variabilidad natural de la mayoría de los sitios donde se establecen éstos, la variación entre parcelas se confunde con la variabilidad del sitio, reduciendo la precisión del análisis. Este problema se reduce si se utilizan los bloques (completos o incompletos).

El diseño en bloques completos al azar es el más utilizado en los ensayos con especies forestales, debido a su relativa facilidad de establecer y analizar estadísticamente. La conformación de los bloques permite controlar una parte de la variación ambiental presente en el terreno, en particular cuando ésta sigue un gradiente en una dirección determinada; por ejemplo, la pendiente, la profundidad, o la distancia a una fuente de humedad en el suelo. En este caso, la conformación de las parcelas dentro del bloque debe permitir que las familias estén expuestas al mismo gradiente ambiental. Así, en el caso de la pendiente del terreno, los bloques se establecen perpendiculares a la pendiente, y las parcelas, paralelas a ella.

Aunque los bloques incompletos son más eficientes que los bloques completos cuando se usa un número elevado de familias, ya que se evita que aumente en forma excesiva el tamaño del bloque, su establecimiento y análisis es más complicado y en algunos casos es difícil comparar las familias de un bloque incompleto con las de otro, si no existen entidades genéticas que “conecten” estos bloques. El desbalance en el diseño ocasionado por la pérdida de individuos o parcelas completas, o un número desigual de repeticiones por familia hace más complicado el análisis estadístico de los diseños en bloques al azar.

Cuando además de la evaluación de las familias se desea incluir el efecto de otros factores, como fertilización, riego o procedencias, es común que se utilicen parcelas divididas para la asignación de estos factores; las familias se asignan a las “parcelas chicas”, y el otro factor a las parcelas “grandes”. Land *et al.* (1986) presentan el modelo de análisis de varianza para un ensayo donde se contempla la inclusión de procedencias en parcelas grandes y de progenies (dentro de procedencias) en parcelas chicas, en un diseño experimental en bloques completos al azar.

Distribución del material en el campo

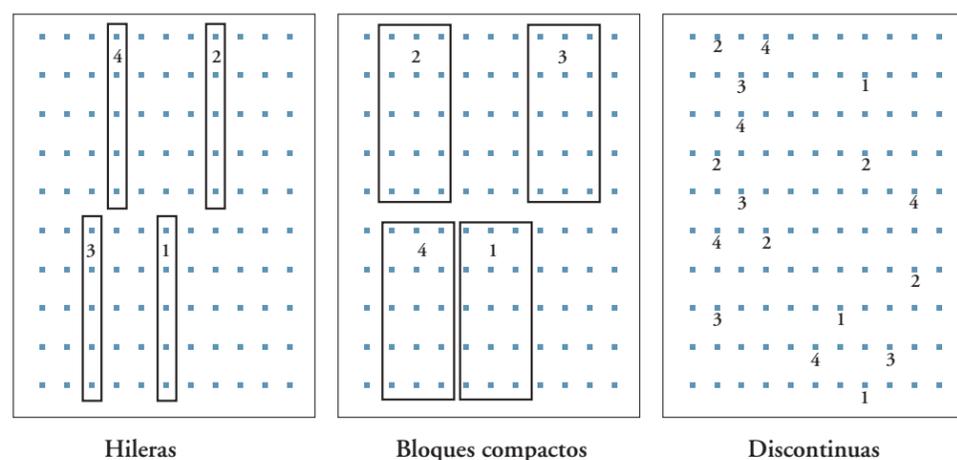
Una vez que se ha definido el diseño experimental a utilizar, es necesario definir los criterios para optimizar la distribución del material en el ensayo en términos del número de sitios y del tipo, tamaño y número (repeticiones) de parcelas por familia en cada sitio de prueba, ya que estos criterios van a influir sobre la eficiencia en la estimación de los parámetros genéticos y de las medias de familias (Bridgwater *et al.* 1986).

Existen varias razones para establecer el ensayo en varios sitios. Por razones prácticas, es conveniente que el ensayo esté repetido cuando menos en dos localidades, para evitar pérdidas de los materiales o de la información a largo plazo si uno de los ensayos es destruido por agentes naturales. La razón más importante, sin embargo, es la presencia de interacción genotipo-ambiente, situación que es común en la mayoría de especies forestales. Cuando la interacción es significativa y el ensayo se establece

en un solo sitio, estos efectos se confunden con los efectos genéticos, ocasionando una sobreestimación de la heredabilidad y sesgos en la estimación de correlaciones genéticas y valores promedio de las familias (Bridgwater y Stonecypher. 1978).

Debido a las limitaciones de recursos, en muchas ocasiones no es posible establecer el ensayo en un número elevado de sitios. En estos casos es recomendable regionalizar primero el área de influencia del programa de mejoramiento y con base en esto definir el número de sitios requeridos, en función de si se desea seleccionar individuos con una amplia adaptabilidad o individuos con adaptación a una condición ambiental específica. Cuando por limitantes del tamaño de los ensayos o del número de plantas por familia no es posible incluir todas las familias en todos los sitios (es decir, las familias se dividen en grupos para cada sitio), es necesario incluir un lote común en todos los sitios, que permita hacer las comparaciones entre las familias de diferentes grupos.

En lo que respecta al tipo y tamaño de las parcelas, existen varias configuraciones que se emplean comúnmente, incluyendo las parcelas de varios árboles en hileras, en bloques compactos, o en puntos discontinuos, y las parcelas de un solo árbol (Figura 3).



1, 2, 3 y 4 representan a individuos o parcelas pertenecientes a familias o entidades genéticas diferentes en el ensayo de evaluación

Figura 3. Tipos de parcelas utilizadas más comúnmente en los ensayos de evaluación genética de especies forestales.

Las parcelas de dos a diez árboles colocados en hileras son las más comunes en ensayos con especies forestales, por su simplicidad en el establecimiento, medición y realización de operaciones silvícolas como aclareos. Este tipo de parcelas también permite evaluar competencia inter e intra-familiar y, por lo tanto, se puede realizar selección a los dos niveles (Adams *et al.* 1973). Las parcelas en hileras son útiles si los individuos seleccionados se van a emplear en plantaciones con mezclas de genotipos.

Desde el punto de vista estadístico, sin embargo, las parcelas de un solo árbol o las parcelas discontinuas (donde los miembros de una familia están dispersos en todo el bloque) son más eficientes

para separar la varianza ambiental de la varianza genética entre familias (Lambeth *et al.* 1983; Loo-Dinkins y Tañer. 1987). Las parcelas de un solo individuo reducen drásticamente el tamaño del bloque o repetición, pero tienen el inconveniente de que la mortalidad puede ocasionar un fuerte desbalance, lo que complica el análisis estadístico, además de que dificulta la selección dentro de familias. Las parcelas discontinuas permiten resolver el problema del desbalance, aunque son más complicadas de establecer y de mantener la identidad de los genotipos a lo largo del ensayo. Debido a los huecos ocasionados por la mortalidad, todos los árboles deben estar debidamente etiquetados.

Cuando el número de árboles por parcela es elevado, es común que se utilicen las parcelas en bloques compactos (rectangulares o cuadrados). Este tipo de parcela es útil para la selección intra-familiar, pero puede ocasionar confusión de efectos ambientales con efectos genéticos entre las familias, sobre todos si las parcelas son relativamente grandes (Loo-Dinkins y tañer. 1987). Debido a que permite evaluar la competencia intrafamiliar, esta configuración es útil cuando el material seleccionado se pretende establecer en plantaciones puras; es decir, en bloques extensos con una sola familia.

Existen otras configuraciones de parcelas que se han propuesto, como la parcela hexagonal o las parcelas interconectadas que ofrecen ciertas ventajas para la realización de operaciones silvícolas sin alterar el balance del diseño original (Libby y Cockerham. 1980); sin embargo su utilización en ensayos genéticos ha sido relativamente limitada.

El tamaño y número de parcelas por familia en los ensayos depende de la precisión deseada en la estimación de las medias de familias y de los parámetros genéticos así como del patrón de variabilidad del sitio. En general, se considera que se requieren entre 30 y 40 árboles por familia en el ensayo para lograr una buena estimación. Si se parte de este número total de individuos por familia, la decisión sobre el tamaño y número de parcelas depende de otras consideraciones, como la variabilidad del sitio, (tamaño máximo de las repeticiones) y la intención de hacer selección entre o dentro de familias (Bridgwater *et al.* 1983). Así, por ejemplo, 40 árboles por familia se pueden distribuir en 40 parcelas (repeticiones) de un solo árbol o en dos parcelas de 20 árboles, pero también se pueden acomodar en ocho parcelas (repeticiones) de cinco árboles en línea.

Establecimiento y mantenimiento de los ensayos

Existe una serie de consideraciones prácticas que se deben hacer en esta fase del ensayo, incluyendo aspectos como elección del sitio, distribución de los bloques, producción de la planta en vivero, preparación del terreno, espaciamiento de plantación, control de malezas y operaciones de manejo silvícola (fertilización, aclareos, podas, etc). Debido a razones de espacio y tiempo, estas actividades no se discuten en el escrito, por lo que las personas interesadas en estos y otros aspectos prácticos del establecimiento de los ensayos de evaluación pueden consultar los escritos de Goddard *et al.* (1983), Kellison y Lea (1983), Weir *et al.* (1983) y Zobel y Talbert (1984), entre muchos otros.

Sin embargo, es conveniente señalar que las actividades de establecimiento y mantenimiento de los ensayos tienen fuertes implicaciones sobre la precisión estadística de la información que se obtenga de ellos. Si las actividades no se realizan en forma correcta y oportuna, se puede aumentar la variación ambiental dentro del ensayo. Por otro lado, un mantenimiento inadecuado de los ensayos puede ocasionar un aumento considerable en la mortalidad, lo cual genera desbalances en el diseño y complica el análisis estadístico, además de reducir la precisión de los resultados.

Análisis estadístico de los ensayos genéticos

La información generada en los ensayos de campo debe ser analizada estadísticamente para satisfacer los objetivos planteados inicialmente. En forma rutinaria, el análisis incluye al menos la estimación de los componentes de varianza para el cálculo de los parámetros genéticos y la estimación de valores promedio por familia para el ordenamiento y selección de los progenitores.

Aunque estos análisis parecen simples, en la práctica pueden ofrecer serios problemas para su realización e interpretación. Existen varios métodos para estimar los componentes de varianza con el paquete estadístico SAS. Cuando los datos están balanceados, la decisión es simple, ya que el procedimiento ANOVA (análisis de varianza) o VARCOMP presenta las características adecuadas para la estimación. El problema aparece cuando los datos están desbalanceados, que es el caso más común en los ensayos con especies forestales, pues no existe un método de estimación que sea apropiado para todas las situaciones (Littell y McCutchan, 1986). Al utilizar este procedimiento es conveniente especificar la opción REML (siglas en inglés de “Restricted Maximum Likelihood” ó “Método de Máxima Verosimilitud Restringida”), la cual produce estimadores no sesgados. Este método restringe la estimación de cualquier componente de varianza a un mínimo de cero (Littell et al. 1996).

Es necesario consultar fuentes especializadas en estadística para definir el procedimiento más adecuado a cada caso en particular. Sin embargo, existen tres procedimientos que se utilizan con mayor frecuencia, el GLM (General Lineal Models), el VARCOMP (procedimiento que permite la estimación directa de componentes de varianza) y el MIXED (procedimiento para modelos mixtos, que incluye tanto efectos aleatorios como fijos). En función del procedimiento elegido se estiman los componentes de varianza con base en la composición y estructura de los cuadrados medios esperados que se especificaron en el modelo. El modelo estadístico depende del diseño de cruzamiento y del diseño experimental que se hayan empleado en el ensayo de evaluación genética. En el documento de van Buijtenen y Tuskan (1986) se presentan los modelos estadísticos para algunos de los diseños más utilizados en especies forestales.

El procedimiento GLM es adecuado cuando los datos están desbalanceados (parcelas perdidas o incompletas); sin embargo, requiere de un sistema de cómputo de mayor capacidad, y es necesario especificar las fuentes de variación en el modelo que tienen efectos aleatorios mediante la especificación RANDOM y la opción TEST, para obtener los coeficientes (k_i) asociados a cada componente de variación. Además, cuando el coeficiente asignado a un componente en particular difiere notoriamente de una fuente de variación a otra, es necesario combinar los cuadrados medios de dos o más fuentes de variación para estimar correctamente los componentes de varianza. En el Cuadro 1 se presenta un ejemplo sencillo de estimación de componentes de varianza con este procedimiento, para un modelo donde sólo se contemplan los efectos de familias de medios hermanos, en un diseño experimental en bloques al azar.

Cuadro 1. Estructura de los cuadrados medios y estimación de los componentes de varianza empleando el procedimiento GLM de SAS.

Fuente de Variación	Cuadrado Medio Esperado
Bloques	$CM_b = \sigma_e^2 + k_4 \sigma_{bf}^2 + k_5 \sigma_b^2$
Familias	$CM_f = \sigma_e^2 + k_2 \sigma_{bf}^2 + k_3 \sigma_f^2$
Bloques x Familias (entre parcelas)	$CM_{bf} = \sigma_e^2 + k_1 \sigma_{bf}^2$
Error (dentro de parcelas)	$CM_e = \sigma_e^2$

$$\sigma_e^2 = CM_e$$

$$\sigma_{bf}^2 = (CM_{bf} - CM_e) / k_1$$

$$\sigma_f^2 = \{CM_f - [(k_2/k_1) CM_{bf} + (1 - (k_2/k_1)) CM_e]\} / k_3$$

donde:

k_1, k_2, k_3, k_4 y k_5 , son los coeficientes asociados a los componentes de varianza en cada fuente de variación.

Con el procedimiento VARCOMP se pueden estimar directamente los componentes de varianza de cada una de las fuentes incorporadas en el modelo, pero requiere que todos los factores involucrados sean de efectos aleatorios. Además, cuando los datos están fuertemente desbalanceados, es necesario utilizar la opción REML para evitar sesgos en la estimación de los componentes; igual que en el caso del procedimiento GLM, cuando el modelo es relativamente complicado o muestra fuertes desbalances, se requiere un sistema de cómputo con suficiente capacidad de memoria y un procesador relativamente rápido. Afortunadamente, en las condiciones actuales estas características del sistema de cómputo ya no son una limitante fuerte en el uso de estos procedimientos de análisis de datos y estimación de parámetros genéticos.

El procedimiento MIXED es más apropiado para modelos que incluyen efectos fijos y aleatorios, ya que este procedimiento define los efectos aleatorios como verdaderamente aleatorios y los separa del resto de efectos. Este procedimiento utiliza de base como algoritmo de cómputo el REML. Este procedimiento es más conveniente que los demás cuando los datos se encuentran fuertemente desbalanceados. Puede ser utilizado para modelar datos de efectos fijos y aleatorios, mediciones repetidas, datos con heterogeneidad de varianza y observaciones auto-correlacionadas. El procedimiento MIXED, al igual que el VARCOMP, no produce un cuadro de análisis de varianza como el procedimiento GLM; en cambio, presenta los resultados de la prueba de F para los efectos fijos, y la estimación de los componentes de varianza para los efectos aleatorios, mismos que se usan en la estimación de heredabilidad, y otros parámetros genéticos. Otra ventaja de este procedimiento es que permite calcular adecuadamente los grados de libertad del denominador de la prueba de F utilizados en diseños de parcelas divididas, lo que se logra especificando la opción SATTERTHWAITTE. Sin embargo, debido a que el algoritmo es de tipo iterativo, el programa MIXED requiere mayor capacidad de memoria de cómputo; además, sólo maneja una variable a la vez, por lo que requiere repetir el programa tantas veces como el número de variables que se desea analizar.

El cálculo de los valores promedio de las familias para calificar y ordenar los progenitores con base en sus valores reproductivos puede ocasionar sesgos en la selección si los datos están desbalanceados, especialmente cuando no todas las familias están igualmente representadas en todos los bloques o sitios del ensayo, o cuando existen grandes diferencias entre los valores medios de estos bloques o sitios (White et al. 1986). Para reducir el sesgo, los valores de los individuos se pueden expresar como desviaciones del

valor promedio de las unidades mayores en el ensayo, y corregir por el diferente número de individuos presentes de cada familia (Hatcher *et al.* 1981; Cotterill *et al.* 1983). Este mismo tipo de ajuste se recomienda cuando dentro de una repetición se detectan gradientes definidos de variación ambiental; en este caso, los bloques se subdividen en estratos y los valores de los individuos se ajustan de acuerdo con el valor promedio del estrato en que están ubicados.

Literatura citada

- Adams, W.T., J.H. Roberds, and B.J. Zobel. 1973. Intergenotypic interactions among families of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Theor. Appl. Genet.* 43: 319-322.
- Bridgwater, F.E. and R.W. Stonecypher. 1978. Genotype x environmental interaction: implication in tree breeding programs. *In: Proceedings of the Fifth North American Forest Biology Workshop*, March 15-19, 1978. Gainesville, Florida. pp: 49-63
- Bridgwater, F.E., J.T. Talbert, and D.L. Rockwood. 1983. Field design for genetic tests of forest trees. *In: Progeny testing of forest trees. Southern Cooperative Series Bulletin No. 275.* Department of Agricultural Communications, Texas A&M University, College Station, Texas. pp: 28-39.
- Burdon, R.D. and G. Namkoong. 1983. Short note: Multiple populations and sublines. *Silvae Genet.* 32: 221-222.
- Burdon, R.D. and C.J.A. Shelbourne. 1971. Breeding populations for recurrent selection: conflicts and possible solutions. *N. Z. J. For. Sci.* 1: 174-193.
- Burdon, R.D., C.J.A. Shelbourne, and M.D. Wilcox. 1977. Advanced generation strategies. *In: Third World Consultation on Forest Tree Breeding.* Canberra, Australia. pp: 1137-1147.
- Cotterill, P.P. 1986. Genetic gains expected from alternative breeding strategies including simple low cost options. *Silvae Genet.* 35: 212-223.
- Cotterill, P.P., R.L. Chorell, and R. Boardman. 1983. Methods of estimating the average performance of families across incomplete open-pollinated progeny tests. *Silvae Genet.* 32: 28-32.
- Goddard, R., S. Land, and S. Kossuth. 1983. Test establishment, maintenance and measurement. *In: Progeny testing of forest trees. Southern Cooperative Series Bulletin No. 275.* Department of Agricultural Communications, Texas A&M University, College Station, Texas. pp: 40-50.
- Hatcher, A.V., F.E. Bridgwater, and R.J. Weir. 1981. Performance level - standardized score for progeny test performance. *Silvae Genet.* 30: 184-187.
- Kang, H. and H. Nienstaedt. 1987. Managing long-term tree breeding stock. *Silvae Genet.* 36: 30-39.
- Kellison, R.C. and R. Lea. 1983. Progeny test methodology: raising the seedlings. *In: Progeny testing of forest trees. Southern Cooperative Series Bulletin No. 275.* Department of Agricultural Communications, Texas A&M University, College Station, Texas. pp: 16-23.
- Lambeth, C.C., W.T. Gladstone, and R.W. Stonecypher. 1983. Statistical efficiency of row and noncontiguous family plots in genetic tests of loblolly pine. *Silvae Genet.* 32: 24-28.
- Land, S.B., Jr., B.C. Bongarten, and J.R. Tolliver. 1986. Genetic parameters and selection indices from provenance/progeny tests. *In: Statistical considerations in genetic testing of forest trees. Southern Cooperative Series Bulletin No. 324.* Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, Florida. pp: 59-74.
- Libby, W.J. 1973. Domestication strategies for forest trees. *Can. J. For. Res.* 3: 265-276.
- Libby, W.J. and C.C. Cockerham. 1980. Random non-contiguous plots in interlocking field layouts. *Silvae Genet.* 29: 183-190.
- Littell, R.C. and B.G. McCutchan. 1986. Use of SAS for variance component estimation. *In: Statistical considerations in genetic testing of forest trees. Southern Cooperative Series Bulletin No. 324.* Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, Florida. pp: 75-86.
- Littell, R.C., Milliken, G.A., Stroup, W.W., and Wolfinger, R.D. 1996. SAS system for mixed models. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina. 633 p.
- Loo-Dinkins, J.A. and C.G. Tauer. 1987. Statistical efficiency of six progeny test field designs on three loblolly pine (*Pinus taeda* L.) site types. *Can J. For. Res.* 17: 1066-1070.
- Martínez G., A. Diseños experimentales: métodos y elementos de teoría. Ed. Trillas, México. 756 p.
- McKeand, S.E. 1982. Sublining for half-sib breeding populations for forest trees. *Silvae Genet.* 31: 14-17
- McKeand, S.E., G.S. Foster, and F.G. Bridgwater. 1986. Breeding system for pedigree-controlled production populations of loblolly pine. *In: Advanced generation breeding of forest trees. Southern Cooperative Series Bulletin No. 309.* Louisiana Agricultural Experiment Station, Louisiana State University Agricultural Center, Baton Rouge, Louisiana. pp: 53-61.
- McKinley, C.R. 1983. Objectives of progeny tests. *In: Progeny testing of forest trees. Southern Cooperative Series Bulletin No. 275.* Department of Agricultural Communications, Texas A&M University, College Station, Texas. pp: 2-5.
- Namkoong, G. 1979. Introduction to quantitative genetics in forestry. U.S.D.A. Forest Service Technical Bulletin No. 1588. 342 p.

- Namkoong, G., E.B. Snyder, and R.W. Stonecypher. 1966. Heritability and gain concepts for evaluating breeding systems such as seedling seed orchards. *Silvae Genet.* 15: 76-84.
- Namkoong, G. and J.H. Roberds. 1974. Choosing mating designs to efficiently estimate genetic variance components for trees. *Silvae Genet.* 23: 43-54.
- Pepper, W.D. and G. Namkoong. 1978. Comparing efficiency of balanced mating designs for progeny testing. *Silvae Genet.* 27: 161-169.
- Robertson, A. 1959. Experimental design in the evaluation of genetic parameters. *Biometrics* 15: 219-226.
- Steel R.G.D. and J.H. Torrie. 1960. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill Inc., New York. 481 p.
- Stonecypher, R.W. 1969. Recurrent selection in forest tree breeding. *In: Proceedings of the Tenth Southern Conference on Forest Tree Improvement, June 17-19, 1969. Houston, Texas.* pp: 7-16.
- van Buijtenen, J.P. 1976. Mating designs. *In: IUFRO joint meeting on advanced generation breeding, June 14-18, 1976. Bourdeaux, France.* pp: 11-27.
- van Buijtenen, J.P. and F.E. Bridgwater. 1986. Mating and genetic test designs. *In: Advanced generation breeding of forest trees. Southern Cooperative Series Bulletin No. 309. Louisiana Agricultural Experiment Station, Louisiana State University Agricultural Center, Baton Rouge, Louisiana.* pp: 5-10.
- van Buijtenen, J.P. and G. Namkoong. 1983. Mating designs. *In: Progeny testing of forest trees. Southern Cooperative Series Bulletin No. 275. Department of Agricultural Communications, Texas A&M University, College Station, Texas.* pp: 7-13.
- van Buijtenen, J.P. and G.A. Tuskan. 1986. Design of control pollinated progeny and clonal tests. *In: Statistical considerations in genetic testing of forest trees. Southern Cooperative Series Bulletin No. 324. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, Florida.* pp: 9-21.
- Weir, R.J., J.P. van Buijtenen, and R.E. Goddard. 1983. Robert's rules of disorder or what not to do. *In: Progeny testing of forest trees. Southern Cooperative Series Bulletin No. 275. Department of Agricultural Communications, Texas A&M University, College Station, Texas.* pp: 24-27.
- White, T.L., G.R. Hodge, and M.A. DeLorenzo. 1986. Best linear prediction of breeding values in forest tree improvement. *In: Statistical considerations in genetic testing of forest trees. Southern Cooperative Series Bulletin No. 324. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, Florida.* pp: 99-122.

- Zobel B.J. and J.T. Talbert. 1984. Applied forest tree improvement. John Wiley & Sons, New York. pp: 231-267.

10

DISEÑO Y MANEJO DE BASES DE DATOS Y SISTEMAS COMPUTARIZADOS

Jay H. Kitzmiller

Resumen

Introducción

Necesidades de información para el programa

El uso del sistema de cómputo en campo

Sistemas de Información Geográfica (SIG)

DISEÑO Y MANEJO DE BASES DE DATOS Y SISTEMAS COMPUTARIZADOS

Jay H. Kitzmiller

Genetic Resource Center, U.S.D.A. Forest Service,
2741 Cramer Lane, Chico, California 95926, E.U.A.

Resumen

Los programas de mejoramiento de árboles requieren del uso de métodos eficientes para el manejo de la información. Los objetivos de los programas determinan cuáles datos son necesarios y cómo se deberán usar. El flujo completo de materiales vegetales y de información debe considerarse en conjunto. Algunos métodos sencillos y estandarizados debieran usarse para capturar y transferir datos electrónicamente entre las unidades de trabajo colaboradoras. Los programas de cómputo deben usarse para facilitar el trabajo de campo y documentar los resultados. En los programas genéticos de gran escala, las bases de datos relacionadas son superiores en diseño sobre las bases de datos planas. Las bases de datos relacionadas son muy compatibles con los ambientes de cómputo de Sistemas de Información Geográfica (SIG). Las aplicaciones de SIG incluyen las actividades de manejo relacionadas con árboles individuales dentro de un huerto semillero o de un rodal, así como aquellos relacionados con plantaciones individuales o rodales dentro de un paisaje o zona forestal.

Introducción

El éxito de los programas de mejoramiento de árboles depende del desarrollo de materiales vegetales, del manejo de la información que identifica y caracteriza estos materiales vegetales y de las actividades de cultivo. Una raza genéticamente mejorada es un producto valioso que resulta de una cuidadosa planificación y ejecución de actividades coordinadas durante muchos años y en diferentes localidades. Comúnmente, el proceso de selección y cruzamiento empieza con la selección de árboles padre con características deseables en rodales naturales. A continuación se recolecta la semilla, las púas y a veces también polen y se envían a un vivero para su procesamiento. Subsecuentemente, las plántulas, los injertos y los acodos se plantan y se realiza la polinización en árboles con características deseables en los huertos. Cada actividad produce datos y resultados importantes. La mayoría de los programas también incluye actividades de investigación aplicada en cooperación con otras agencias, compañías o grupos, para compartir información, cargas de trabajo y material vegetal.

El manejo de la información es crucial en un programa de mejoramiento genético de árboles. Debe construirse una base de conocimiento al iniciarse nuevos programas, proyectos o actividades de cultivo. Las observaciones y experiencias deben documentarse para mostrar que es lo que funciona y que es lo que no funciona. Asimismo, es imperativo dar seguimiento a actividades históricas y a los resultados logrados. Mucha de esta información se usa para la toma de decisiones que guiarán la dirección de un programa. Los manejadores (administradores) deben apoyar cada programa con información apropiada para justificar sus acciones y decisiones, así como para demostrar su propia credibilidad y la confiabilidad de sus productos.

La integridad genética del material debe mantenerse a través de todo el proceso. Algunas veces, esto involucra rastrear la identidad de cientos de miles de árboles individuales (Cuadro 1). Por ejemplo, la Región del Suroeste del Pacífico (Pacific Southwest Region) del Servicio Forestal de los Estados Unidos de América usa un programa de alto nivel. Cuando esté completamente desarrollado, el programa incluirá cuatro especies, 7,200 árboles padre superiores, 1'800,000 árboles procreados y 108,800 árboles injertados en huertos semilleros.

Cuadro 1. Número de semillas, árboles e injertos para manejarse en un programa de alto nivel.

Programa Unidad	Padres	Semilla (Banco de semillas)	Semilla (Vivero)	Ensayos de campo	Árboles injertados (huertos)
1 Padre	1	1,000	500	250	16
1 Zona de cruza	200	200,000	100,000	50,000	3,200
1 Especie (= 9 ZMs)	1800	1'800,000	900,000	450,000	27,200
1 Programa de alto nivel (= 4 Spp.)	7,200	7'200,000	3'600,000	1'800,000	108,800

Necesidades de información para el programa

El primer paso consiste en determinar que información se requiere para apoyar el programa. Disponer los objetivos del programa en forma paralela a las actividades que apoyarán esos objetivos. Considerar el tipo, calendario, localización, fuerza de trabajo, datos y productos involucrados en cada actividad (Cuadro 2). A continuación, examinar cómo están conectadas todas estas actividades unas con otras en términos de datos comunes y necesarios. Todos estos, junto con el presupuesto, guiarán la identificación de la información esencial.

Cuadro 2. Vista general de los elementos y secuencia en el proceso de mejoramiento.

Secuencia de localización	Secuencia de materiales genéticos	Secuencia de acciones humanas	Tiempo (años)	Información (datos)
Rodal natural	árbol padre selecto	seleccionar	0	Localidad, fecha actividad, observaciones
>>>>>>>>	flores polen	polinizar colectar	1-5	---
>>>>>>>>	Semillas	---	1-5	---
Vivero	brinzales, injertos, acodos	---	2-7	% germinación, % injerto/raíz, cultivo, crecimiento, enfermedades, conjunto de yemas
Plantación	árbol	---	3-8	% supervivencia, plagas, competencia, calidad de sitio, clima

Herramientas de cómputo

Dentro del contexto del “marco general”, una decisión muy importante es la relacionada con el tipo de hardware (equipo) y software (paquetería) a ser adoptados y utilizados. A menudo, esta decisión está determinada por restricciones de presupuesto, soporte técnico disponible, nivel de habilidades del usuario y oportunidades de entrenamiento, así como de las necesidades básicas del programa. Antes de seleccionar entre un vasto arreglo de sistemas de hardware/software (equipo/paquetería) uno debiera considerar cuidadosamente todas las facetas: recolección de datos, captura, transferencia, almacenaje, análisis y presentación.

Como regla general, usualmente lo mejor es: 1) mantener un manejo sencillo de la información, 2) cuando sea posible, usar el software (paquetería) existente para minimizar la costosa programación acostumbrada, 3) evitar la recolección de datos innecesarios, 4) coordinar la adquisición de equipo y paquetería para obtener compatibilidad y estandarización (uniformidad) entre las unidades de trabajo del programa, y 5) proveer en la “caja de herramientas de cómputo” suficiente diversidad, flexibilidad y posibilidad de evolución tecnológica a fin de cumplir con todo el trabajo.

Estandarización

El sistema de base de datos debe estandarizarse con el fin de mantener en una línea prefijada el flujo de información de manera eficiente y oportuna entre las unidades de trabajo y sus clientes. Esto significa un acercamiento relativamente uniforme del hardware (equipo), del software (paquetería), de la estructura de archivos, de los campos de datos, y de los métodos de procesamiento a través de las unidades de trabajo y de las actividades del programa. En un programa coordinado de gran tamaño, los datos históricos más viejos se comparten entre las unidades de trabajo, y los nuevos datos que se generan en varias etapas de desarrollo del material vegetal también deben ser compartidos. Compartir datos y materiales vegetales por las diferentes personas que coordinan las actividades del programa en diferentes etapas y localidades, proporciona la base e incentivo para la estandarización y consistencia en el manejo de datos.

Comunicación de información y transferencia de datos

El flujo completo de información, desde el origen de los datos hasta la presentación de los resultados, deberá considerarse al diseñar un sistema eficiente de manejo de información. Nuestros genetistas utilizan pequeñas computadoras de mano para recolectar la mayor parte de información de campo. Los datos son alimentados ya sea electrónicamente desde instrumentos de medición o dispositivos de códigos de barra, directamente a la computadora, o son capturados a mano. Una vez en la computadora, los datos son revisados en su precisión; mientras tanto, las cuadrillas de campo están aún en el sitio. En gabinete, los datos se transfieren a una Computadora Personal (PC) IBM-compatible. La mayoría del procesamiento de datos se hace en programas de PC con base en hojas desplegables, gráficas y análisis estadísticos. Al nivel de la PC, las bases de datos se pueden relacionar a pesar de que los usuarios no estén conectados a la red.

Siempre que sea posible, es muy ventajoso conectar las PC a un servidor principal de una red de cómputo. El Servicio Forestal del Departamento de Agricultura de los EUA utiliza normalmente un servidor principal de Datos Generales que está conectado a cada oficina y estación de campo en toda la nación. El correo electrónico, que incluye archivo de datos y mensajes, se transfiere a través de líneas telefónicas. Este sistema crea una amplia variedad de opciones para compartir información y tener acceso a la paquetería (software). Las PC están conectadas a ese sistema de servidor principal para su almacenamiento y/o subsecuente transferencia a cualquier localidad. Asimismo, los usuarios de localidades remotas pueden tener acceso y ver los datos vía telecomunicaciones. En general, recolectamos en computadoras de mano, transferimos los datos de una PC, los cargamos a un servidor principal para su almacenamiento y procesamiento inicial, los descargamos hacia las PC para desplegarlos en hojas, para analizarlos y para graficarlos. En cualquier punto del procesamiento, podemos enviar datos por correo a otra unidad de trabajo, de tal forma que ellos pueden descargar y utilizar programas de PC de acuerdo con sus necesidades.

Cada entrada de datos hecha a mano introduce un incremento en el riesgo de error humano. Con frecuencia, los datos son inicialmente capturados a mano y luego transferidos electrónicamente a otras computadoras para minimizar los errores de captura. Por ejemplo, los datos de mediciones de plántulas en ensayos de progenie en la etapa de vivero se procesan con instrumentos electrónicos conectados directamente a las computadoras de mano. Un código de barras puede conectarse directamente a la computadora para que lea automáticamente las etiquetas para identificar la ascendencia, la localidad y el tratamiento de los individuos que se miden, y para transferir los datos al disco (duro). Con este procedimiento de recolección de datos, todos estos se capturan electrónicamente. Las características importantes de las computadoras de mano para el campo incluyen: pilas (baterías) de larga duración, con gran capacidad de memoria, que sean programables y compatibles con DOS, de amplio despliegue de pantalla y de diseño adecuado para soportar el manejo rudo en el campo.

Diseño de bases de datos

Una vez que se ha generado una primera visión de las consideraciones del “marco general”, examinaremos ahora aspectos de mayor detalle en el diseño de las bases de datos. La primera parte del diseño de la base de datos consiste en identificar los datos esenciales que serán recolectados para cada actividad (Cuadro 2). En general, los tipos de datos incluirán las siguientes categorías:

1. Localidad (i.e. de origen genético, de actividad) de fecha (i.e. de eventos, de actividades).
2. Desempeño fenotípico de rasgos (i.e. peso de semillas, supervivencia, floración, altura).
3. Genealogía (i.e. linaje ancestral, fuentes paternas).
4. Actividades de cultivo (i.e. tratamiento de fertilización, poda, plantación).
5. Ambiental y ecológica (i.e. temperatura, especie, profundidad del suelo, densidad del rodal).
6. Tiempo y costo (i.e. presupuesto y análisis económico).

Estos datos caracterizan la biología y desempeño de los materiales genéticos a través del tiempo y espacio en un programa de manejo.

Base de datos plana versus relacionada

Una decisión importante consiste en definir si se va a usar una base de datos con estructura plana o con estructura relacionada. La estructura convencional de un archivo plano consiste en un arreglo común de hileras y columnas en un formato de hoja desplegada, con información en una serie de grandes cuadros que comparten mucha información común, pero que no están unidos (interconectados). Una base de datos de estructura relacionada es diferente en el sentido de que la información está contenida en una serie de cuadros que están conectados unos con otros (interconectados) por un campo común.

La base de datos de estructura relacionada es más eficiente, pero requiere mayor experiencia (pericia) para su diseño, desarrollo y manejo. Las principales desventajas de un archivo de estructura plana son: duplicación, formatos inconsistentes y falta de integración de los datos. Estos conducen a más errores y mayor esfuerzo de mantenimiento. La ventaja clave es la simplicidad de la estructura del archivo plano.

Las estructuras de archivos plano y relacionado se comparan en la Figura 1a y 1b. En este ejemplo, toda la información está contenida en un solo cuadro en un archivo plano y esa misma información está contenida en tres cuadros de un archivo relacionado. El archivo plano tiene ocho campos de datos y 11 líneas de registro para un total de 88 celdillas de datos. El archivo plano tiene 40 repeticiones, 11 celdillas en blanco (vacías) y 37 datos originales. Los cuadros del archivo relacionado totalizan 48 celdillas de datos. Este archivo utilizó solamente 11 campos de datos no originales, en comparación con los 51 usados por el archivo plano; además, estos 11 campos fueron identificadores comunes para conectar los cuadros. De esta forma, la estructura relacionada utiliza sólo $48/88=55\%$ del espacio usado por el archivo plano, en este ejemplo. Por si fuera poco, el archivo plano tiene casi cinco veces más duplicaciones. Dentro de un cuadro de una base de datos relacionada, existe una relación uno a uno entre los campos de datos (no duplicación). Entre dos cuadros de una base de datos relacionada, hay comúnmente una relación de uno a muchos para un campo común (ver la explicación posterior para la Figura 2).

(a) Base de datos plana

Árbol No.	Latitud	Longitud	Elevación	Zona	Fecha	Semilla	Púas
001	39.44.1	121.38.8	46	531	09/86	190	
001	39.44.1	121.38.8	46	531	11/86		12
001	39.44.1	121.38.8	46	531	09/89	380	
001	39.44.1	121.38.8	46	531	11/89		10
111	40.22.4	122.06.6	55	526	09/87	315	
111	40.22.4	122.06.6	55	526	10/87		8
111	40.22.4	122.06.6	55	526	09/90	602	
111	40.22.4	122.06.6	55	526	11/90		14
222	41.30.0	123.11.1	22	741	08/91	683	
222	41.30.0	123.11.1	22	741	08/93	410	
222	41.30.0	123.11.1	22	741	11/93		18

(b) Base de datos relacionada

Ident. árbol	Latitud	Longitud	Elevación	Zona
001	39.44.1	121.38.8	46	531
111	40.22.4	122.06.6	55	526
222	41.30.0	123.11.1	22	741

Ident. árbol	Fecha de semilla	No. semilla
001	09/86	190
001	09/89	380
111	09/87	315
111	09/90	602
222	08/91	683
222	08/93	410

Ident. árbol	Fecha de Púas	No. de Púas
001	11/86	12
001	11/89	10
111	10/87	8
111	11/90	14
222	11/93	18

Figura 1. Comparación entre bases de datos plana (a) y relacionada (b).

Agregar un nuevo campo a un archivo plano, da como resultado más hileras y más duplicación de datos, debido a que se generan más combinaciones de hileras y columnas. La opción para este problema de estructura de archivo consiste en separar los archivos planos para mantenerlos relativamente pequeños. De cualquier manera, esto crea un nuevo problema, los datos que residen ahora en los diferentes archivos planos ya no están integrados. En los programas genéticos, el problema de escala es significativo y los datos deben estar integrados y automatizados.

El Programa de Genética de la Región Suroeste del Pacífico (Pacific Southwest Region) está en el proceso de modificar el almacenamiento de datos en archivos planos a un arreglo de cuadros en ORACLE,

que es un programa popular de bases de datos relacionadas. ORACLE permite el acceso múltiple de usuarios y capacidad de red, es muy flexible y puede ampliarse en cualquier momento para satisfacer las necesidades futuras. Nuestra base de datos genéticos (GENDAT) contiene más de 10 cuadros base.

Seguimiento (rastreo) de la identidad del material genético

El diseño de la base de datos es el proceso de determinar cuáles grupos de campos de datos deben estar acomodados en cada cuadro. El diseño de las bases de datos depende del diseño del programa de mejoramiento genético de árboles y de cómo se dará seguimiento a la información. Un objetivo crucial de cualquier programa genético consiste en dar seguimiento a la identidad y pedigrí o ancestría del material genético. Sin embargo, algunos programas pueden elegir dar seguimiento únicamente a la ascendencia materna, mientras que otros pueden decidir en seguir la pista a ambas ascendencias, paterna y materna. Mantener la capacidad para dar seguimiento a todos los materiales, eventos, localidades, etc., a través de todas las sendas puede no ser realista. Lo primero es construir los cuadros de bases de datos esenciales para darles seguimiento. Enseguida, evaluar las ventajas y desventajas de añadir otros datos de menor importancia.

Los cuadros base de genealogía se usan como ejemplo para mostrar la naturaleza relacionada del sistema (Figura 2). Este cuadro-diagrama de relación muestra la senda para dar seguimiento al pedigrí y a los materiales reproductivos. Cada celdilla representa un cuadro base. Los cuadros base están conectados por una senda uno-a-uno, o con mayor frecuencia, uno-a-muchos (tri-ramificada). Los campos comunes que conectan dos cuadros base se muestran a lo largo de la senda. Dando seguimiento primero a la ascendencia femenina, una planta puede producir una o muchas cosechas de semilla, que terminan en diferentes recolecciones de semilla. Un lote de semillas se convierte en un lote de vivero cuando se siembra. Este puede estar compuesto de una a muchas mezclas que producen de una a muchas plantas.

Dando seguimiento a la ascendencia masculina, una sola planta puede producir muchas cosechas de polen (i.e. ser un padre). Asimismo, la misma planta puede ser polinizada muchas veces por otros machos (i.e. ser una madre). En forma similar, un lote de polen puede estar compuesto de una o muchas colecciones, y un lote de polen puede ser usado en uno o muchos eventos de polinización. Una fuente de semilla-polen es una cruce controlada específica de un lote de semilla de un árbol madre particular con una fuente conocida de polen, una fecha de polinización conocida y una fecha conocida de recolección de semilla. El diseño de la estructura de los cuadros base y sus inter-conexiones, ilustran la naturaleza integrada de una base de datos relacionada.

El diagrama del cuadro de relaciones es más útil como referencia para establecer búsquedas y escribir reportes de la base de datos. Por ejemplo, si quisiéramos conocer el pedigrí de un árbol particular, en una plantación particular, deberíamos primero encontrar la identidad de la planta de la progenie, mediante el conocimiento de su localidad en campo y luego localizar la identidad de la planta de la progenie hasta su identidad de vivero, luego hasta su identidad de lote de semilla y más atrás hasta su identidad parental. Esta senda utiliza tres cuadros: Planta, Mezcla de Lote de Semilla y Colección de Semilla, así como tres campos comunes (Figura 2). En un Programa de mejoramiento genético más simple debe tomarse una decisión consciente para permitir y dar seguimiento sólo a un árbol femenino hasta una colección de semilla, una colección de semilla hasta un lote de semilla, y un lote de semilla hasta un lote de vivero.

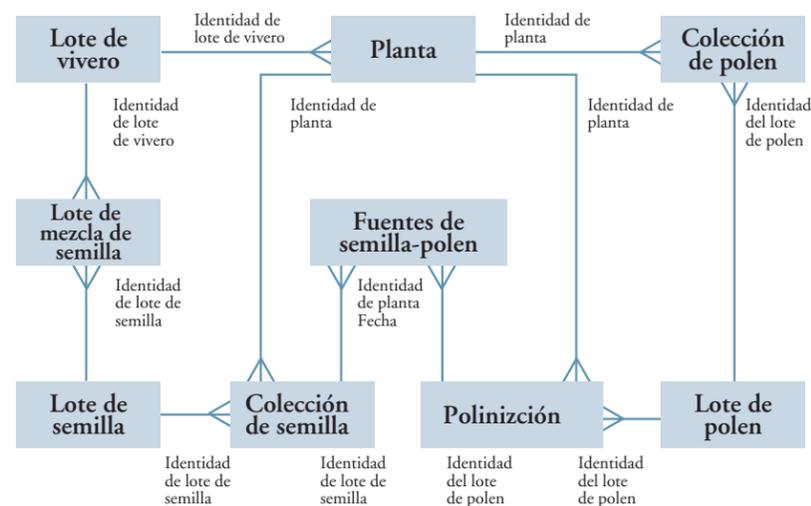


Figura 2. Cuadros base de genealogía.

En este caso, los cuadros deben estar conectados por un campo común --la identidad de la planta. De esta manera, cualquier dato en los cuadros de la semilla o vivero podría ser conectado directamente al cuadro de datos de la planta a través de la identidad de la planta.

Se puede agregar más información a estos cuadros base de Genealogía según se desee (i.e. almacenamiento de semilla y polen, ensayos, etc.). Adicionalmente, GENDAT contiene otros cuadros base para: especie, localidad, actividad, clon, mediciones, vivero, régimen de propiedad, sustancias químicas, etiquetas de campo, validación, etc.

El uso del sistema de cómputo en campo

Se presentarán dos muestras de su aplicación para ilustrar cómo se usan las computadoras con el fin de facilitar el trabajo de campo en nuestro Programa de Mejoramiento Genético. El primer ejemplo es para la selección de árboles superiores en rodales naturales. El segundo es para un ensayo de progenie.

Selección de árboles superiores

Una vez localizado un rodal candidato, los cinco mejores árboles se evalúan visualmente en sus características de forma (fenológicas) y se miden para determinar su edad, altura, diámetro y grosor de corteza. Estos datos, junto con otra información, incluyendo número de árbol, localidad, fecha, calidad de sitio, tipo forestal (asociación forestal), cosecha de semilla, exposición, altitud y régimen de propiedad, se capturan en una computadora de mano en el sitio y se almacenan en disco. El programa es muy amigable al usuario. Apunta siempre rápidamente a cada campo de datos y, si se comete un error, las correcciones se realizan enseguida. No se requiere ninguna otra entrada manual. La computadora está programada para calcular el volumen total del árbol con y sin corteza, así como el incremento medio anual en altura y volumen para cada árbol candidato. Con esta información, el árbol superior es seleccionado, etiquetado y ubicado en un mapa.

De manera inmediata se puede generar una copia impresa del Reporte de Selección de Árboles Superiores en el mismo sitio, de la forma como se indica a continuación: La PC y la impresora se conectan a la batería de un vehículo por medio de un convertidor de energía. El reporte consiste de dos páginas. La primera página es generada totalmente por la computadora en campo. Esta contiene la localidad y los datos de campo de las mediciones, observaciones y otra información práctica relacionada con las actividades de escalar el árbol y recolectar semillas o varetas. La siguiente página es un formato que es pre-impreso en gabinete y después llenado a mano en campo. Esta página consiste en una especie de bitácora con indicaciones de cómo llegar en vehículo al rodal y un mapa de los árboles candidatos en el rodal. Así pues, la segunda página se completa a mano en campo y se alimenta en la impresora de matriz de puntos, para que la información de la primera página sea impresa en el otro lado.

Una mejora de calidad, en el aspecto de la recolección de datos de selección de árboles, es el uso de los Sistemas de Posicionamiento Global (SPG) para proporcionar el dato preciso de la localidad. Este dato se transfiere a la PC y, mediante el uso de un programa de Dibujo Auxiliar de la Computadora (DAC), se generan mapas de alta calidad en gabinete. Sin embargo, a la fecha, no podemos producir mapas impresos con SPG en campo durante la selección.

Ensayos de progenie

En 1979, el Programa de Genética de la Región Suroeste del Pacífico (PSW) adoptó un novedoso, relativamente complejo y altamente eficaz, diseño experimental para ensayos de progenie. Este consiste en dos partes: un "diseño de materiales genéticos" y un "diseño ambiental". El diseño de materiales genéticos involucra el arreglo de las familias de polinización libre del ensayo en grupos o conjuntos, de tal forma que cada conjunto es una muestra de la zona de cruzamiento, y el uso de lotes de semilla como "control" o estándar para "unir" estadísticamente los conjuntos. El diseño experimental es un diseño especial de Bloques Completamente al Azar (BCA) que contiene parcelas no contiguas distribuidas al azar con repetición entrelazada dentro de los bloques (Libby y Cockerham 1980, *Silvae Genetica* 29 (5-6)). La repetición interna (dentro del bloque) permite una reducción sistemática de repeticiones dentro de los bloques, manteniendo aún un diseño balanceado (i.e. todas las familias son consideradas y están representadas equitativamente, después de entresacar una muestra en cada repetición). Un patrón de espaciado hexagonal economiza el requerimiento de superficie de terreno, permitiendo 15% más de árboles por acre y una utilización más completa del ambiente del sitio. Después de que la segunda repetición dentro del bloque se entresaca, se presenta un espaciado uniforme entre todos los árboles (i.e. supóngase 100% de supervivencia). Este diseño se repite posteriormente, a través de ocho bloques de cada uno de cuatro o cinco sitios.

Este diseño especial no ha sido usado ampliamente en grandes ensayos de campo, debido a: 1) la dificultad de clasificar (ordenar), manejar y rastrear la identidad de las plantas producidas a raíz desnuda de un vivero para este arreglo en campo y, 2) los problemas con el arreglo real en campo, el estacado de la posición de plantación, la propia plantación, y el mapeo de las identidades genéticas. Sin embargo, desarrollamos una articulación operativa entre un sistema de contenedores de vivero (Leach Supercell Containers) y un diseño de campo específico, con el propósito de facilitar el manejo del material del ensayo y la conservación de registros.

El sistema de contenedores que seleccionamos está muy bien adaptado para el cultivo de plantas de alta calidad en vivero, es ampliamente utilizado en la industria de los viveros y facilita la manipulación física de los contenedores individuales. El tamaño y configuración de las charolas, así como la capacidad de remover y ordenar (clasificar) los contenedores individuales lo hacen fácilmente adaptable a nuestro

diseño experimental deseado. Además, hemos desarrollado un sistema de mapeo computarizado y de ordenamiento (clasificación) basado en este sistema específico de contenedores y al diseño de campo. Con este sistema podemos ubicar cada plántula en el ensayo dentro de una charola de contenedores en el vivero, de tal modo que el mapa de cada charola corresponda exactamente con el mapa de plantación de cada repetición en el campo. Esto es, cada charola contiene plántulas para una repetición y esas plántulas se establecen en el campo con un arreglo exacto al que tienen en la charola.

Durante la fase de vivero de los ensayos de progenie, la semilla se siembra para producir cerca del doble del número de plántulas requeridas para ser trasplantadas en el campo. Esto permite diferentes capacidades de germinación entre los lotes y poder elegir (escoger) las plántulas más grandes y más sanas. Una charola tiene ranuras para 98 celdillas (contenedores individuales). Nosotros sembramos cuatro o cinco charolas de cada familia y el lote testigo, dependiendo del número de plantaciones en el ensayo. Cada celdilla individual (contenedor) es etiquetada por lote de familia. Una charola de cada lote integra un bloque en la fase de vivero. De esta forma, hay cuatro o cinco bloques en esta fase. Al final de la estación de crecimiento, todas las charolas de cada familia se colocan en un banco de invernadero para ser ordenadas (clasificados) en charolas de posiciones de trasplante, con base en los programas de cómputo. Las familias se ordenan (clasifican) una a la vez para evitar confusiones. La clasificación incluye primero la selección de los mejores brinzales y luego su colocación (ubicación) dentro de vasijas de 1 galón, las cuales se etiquetan por bloque y repetición en una pequeña carriola. Dentro de cada vasija de bloque-repetición, hay 8 ó 10 brinzales. La clasificación continúa hasta que todas las 24 vasijas (ocho bloques X tres repeticiones) tienen sus brinzales. La carriola es llevada hasta una cabecera del invernadero donde las charolas vacías se colocan en mesas en un arreglo bloque-repetición-plantación para recibir los brinzales. Los mapas generados por cómputo identifican las coordenadas de localización en la charola en la que cada brinjal deberá colocarse.

Nosotros hemos usado nuestra base de datos y sistema de cómputo para realizar las siguientes tareas:

- 1) Distribuir al azar la posición de los árboles dentro de cada repetición y bloque.
- 2) Crear (generar) una lista de charolas de vivero con coordenadas para cada familia en un grupo o conjunto.
- 3) Transferir las coordenadas de la charola en el vivero a coordenadas de bloque en el campo.
- 4) Generar un mapa de bloques en campo para el trasplante.
- 5) Facilitar la recolección de datos, la verificación de errores y el análisis de datos de los ensayos de progenie.

En el sitio de la plantación se marca cada posición de plantación. Los brinzales se extraen de las charolas y se plantan en el mismo arreglo en el que estaban en la charola. Cada etiqueta de los brinzales se coteja contra el mapa para verificar que cada brinjal a plantar sea el correcto para esa posición.

Sistemas de Información Geográfica (SIG)

La más reciente tendencia en el manejo de información está dirigida a la integración total de datos espaciales con los datos de texto. Muy pronto, todos los datos genéticos de texto serán capturados en una base de datos relacionada. Por ahora, los datos espaciales existen en mapas de papel y en la base de datos. Actualmente contamos con SPG y DAC para desplegar mapas de recursos genéticos, sin embargo, éstos no están integrados con los datos de los atributos. Por ahora necesitamos trasladar los datos espaciales dentro de un ambiente SIG. Los ambientes SIG combinan los componentes espaciales (puntos, líneas,

polígonos) con los componentes de atributos textuales en una base de datos relacionada.

En el trabajo genético, la capacidad de los SIG generaría mapas de materiales genéticos manteniendo cualquier combinación de atributos. También posibilitaría la captura de datos tomados por otros programas de recursos en las vecindades del material genético y expandiría gradualmente el enfoque de datos asociados con los recursos genéticos. Los SIG son una herramienta nueva que nos estimulará y ayudará a contestar preguntas de investigación y manejo que previamente eran imprácticas. Por ejemplo, los patrones de cruzamiento en huertos semilleros podrían estudiarse mediante la información visualizada de cuáles árboles están produciendo polen y flores femeninas al mismo tiempo. También podrían desplegarse los recursos genéticos, como árboles individuales o plantaciones, conforme a como se presenten en diferentes tipos de suelos a través del paisaje para examinar las relaciones genecológicas.



Ensayo de evaluación de progenies de *Pinus greggii* en el Ejido 18 de Marzo, en Nuevo León.



Evaluación genética de *Cedrela odorata* (Cedro rojo) en el Campo Experimental "El Palmar" del INIFAP, en el estado de Veracruz.

11

TÉCNICAS ECOFISIOLÓGICAS EN LA EVALUACIÓN DE GERMOPLASMA

Kurt H. Johnsen y John E. Major

Introducción

Razones para estudiar los componentes de procesos

Técnicas y herramientas fisiológicas

Incorporación de la genética fisiológica en programas tradicionales

TÉCNICAS ECOFISIOLÓGICAS EN LA EVALUACIÓN DE GERMOPLASMA

Kurt H. Johnsen y John E. Major

Atlantic Forestry Centre, Canadian Forest Service,
P.O. Box 4000, Fredericton, New Brunswick E3B 5P7, Canada.

Introducción

Las pruebas de procedencias y progenies son los soportes principales de los programas de mejoramiento genético forestal en todo el mundo. Los lotes de semilla se plantan en ensayos de campo en forma aleatorizada y con repeticiones. Posteriormente se evalúa el crecimiento (altura y diámetro) y la supervivencia de los árboles a través del tiempo. El análisis cuantitativo de estos datos permite determinar la variación genética y separarla en componentes entre y dentro de fuentes de semilla. Esta información se usa para establecer zonas de mejoramiento, eligiendo las procedencias superiores y seleccionando los árboles individuales para su inclusión en los huertos semilleros y posterior cruzamiento. De esta manera, los ensayos de campo proporcionan la información básica e indispensable para los programas de mejoramiento genético forestal.

El desempeño individual en crecimiento de los árboles se considera como su fenotipo (**P**), el cual es el resultado de una multitud de factores externos e internos. El fenotipo de cualquier árbol individual depende principalmente de la oportunidad; esto es, del tipo de micrositio en que se plantó, del cuidado del plantador, del ataque de depredadores, etc. Estos factores se agrupan generalmente en la categoría de “ambiente” (**E**). El desempeño de cualquier individuo es también una función de su constitución genética (**G**). Además, la variación genética puede expresarse en forma diferencial de un sitio a otro, lo que se considera como interacción genotipo por ambiente (**G x E**). La repetición y aleatorización apropiada del ensayo permite la estimación de la varianza fenotípica atribuible a causas genéticas, ambientales y a la interacción genotipo x ambiente, de tal manera que: $P = G + E + G \times E$.

Los ensayos de campo tradicionales proporcionan información limitada sobre el porqué determinados genotipos difieren en la supervivencia y tasa de crecimiento. La expresión de la variación genética en el crecimiento y la supervivencia se debe a variación heredable en componentes de procesos fisiológicos. Un modelo conceptual de rendimiento derivado, usando componentes de procesos morfológicos y fisiológicos, es: $\text{Rendimiento} = f(\text{Desempeño} + \text{Persistencia} + \text{Partición o distribución})$. Los componentes de procesos de desempeño incluyen características como fotosíntesis, respiración, uso de agua, y absorción de nutrientes los cuales reflejan eficiencia. Las características de desempeño también incluyen la tolerancia al calor y al frío, la resistencia a la sequía, crecimiento, morfología y arquitectura de hojas y raíces. La persistencia involucra la integración de los componentes de procesos a través del tiempo. La partición es la distribución de recursos a los componentes de la planta como las raíces, tallo, hojas y órganos reproductivos. La mayoría de las ganancias en rendimiento en la agricultura se ha obtenido al modificar los patrones de partición de los cultivos. La genética fisiológica estudia la variación genética en los componentes de los procesos y en los mecanismos que contribuyen a la productividad y supervivencia de los organismos. En este trabajo se discuten las características enumeradas arriba, con diferente nivel de detalle en la sección sobre técnicas ecofisiológicas.

Este documento tiene tres partes principales. Primero, presentamos las razones potenciales para estudiar la variación genética en componentes de procesos. En segundo lugar, presentamos una descripción panorámica de las técnicas ecofisiológicas. Usamos el término de técnica ecofisiológica en un sentido amplio para discutir tanto los métodos estrictamente fisiológicos como los métodos para examinar el crecimiento que permiten determinar los componentes de procesos. Al final, discutimos la incorporación de los estudios de genética fisiológica en programas de mejoramiento genético tradicionales.

Razones para estudiar los componentes de procesos

¿Por qué estamos interesados en los componentes de procesos? Existen varias razones potenciales que se discutirán en los siguientes párrafos. La validez de cada una de estas razones depende de la biología y de los aspectos económicos en cada situación particular.

Selección indirecta

La selección directa no se práctica en programas de mejoramiento genético de árboles forestales. La característica de interés forestal en la mayoría de los casos es el rendimiento, o valor (rendimiento y calidad), a la edad del turno. Esta edad puede variar desde 5 a 10 años en turnos cortos de cultivo intensivo para la producción de biomasa, hasta más de 80 años para coníferas de climas fríos, e incluso más largos para especies de latifoliadas con madera de calidad elevada. La selección siempre se realiza mucho antes de la edad del turno, aun cuando el rendimiento final es la característica de interés, por lo que esto representa una selección indirecta. La medición de características ecofisiológicas conjuntamente con el rendimiento se ha propuesto frecuentemente como un complemento para aumentar la eficiencia de la selección. Como lo discute Bongarten (1985), la selección de características fisiológicas será útil si la característica fisiológica “representa una porción grande de la variación genética en el rendimiento, pero sólo una porción pequeña de la variación fenotípica, o puede medirse en árboles jóvenes, y se correlaciona bien con el crecimiento en edades maduras, y este crecimiento explica una porción considerable de la variación en el rendimiento total”. En los últimos 30 años se han realizado muchos estudios sobre las relaciones

genéticas entre las características fisiológicas y el crecimiento de los árboles. Algunos, como Larson y Wellendorf (1990) han encontrado que la medición de características como la fotosíntesis, el uso del agua y la tolerancia al frío muestran potencial para aumentar la precisión de la selección. Sin embargo, en una revisión reciente del tema, Greenwood y Volkaert (1992) señalaron que las características fisiológicas generalmente no han sido muy útiles en la selección temprana y que, generalmente, el crecimiento en altura de las plántulas es todavía el mejor predictor del desempeño posterior en campo.

Combinación de componentes

Se ha propuesto que la selección y cruzamiento de individuos usando componentes de características pueden resultar en genotipos con combinaciones deseables de éstas. Por ejemplo, el crecimiento total del brote puede considerarse como el producto de dos componentes: el número de unidades del tallo (número de entrenudos) y la longitud de estas unidades (longitud de entrenudos). Cannell *et al.* (1976) sugirieron que podrían obtenerse genotipos superiores cruzando árboles con un valor de cruzamiento elevado en el número de unidades de tallo con árboles con un valor de cruzamiento elevado en la longitud de unidades de tallo. El éxito de este enfoque depende en gran medida de que los componentes de las características sean genéticamente independientes. Aunque es desafortunado, estudios realizados con varias especies han mostrado que los dos componentes de crecimiento del brote están genéticamente correlacionados en forma negativa (Kremer y Larson. 1983; Bongarten. 1986). Esto es, entidades genéticas (tales como familias) con mayor número de unidades de tallo comúnmente tienen menores longitudes de unidad de tallo. A pesar de las fallas potenciales debido a las correlaciones negativas entre características deseables, la selección de componentes es un concepto digno de exploración adicional.

Interacción genotipo x ambiente (G x E)

La interacción genotipo ambiente se considera típicamente como una molestia en los programas de mejoramiento forestal, ya que aumenta el número de poblaciones de cruzamiento requeridas. Con el pino radiata (*Pinus radiata* L.) en Nueva Zelanda, Johnson y Burdon (1990) demostraron que debido a la interacción **G x E**, el cruzamiento con base en la evaluación en una sola región (suelos volcánicos arenosos) reduciría las ganancias potenciales en 50% o más si los genotipos se plantaran en otra región (suelos arcillosos). Sin embargo, también encontraron que era posible seleccionar familias que mostraran superioridad en las dos regiones. En Australia, Pederick (1990) concluyó que el cruzamiento, a nivel estatal, de *Pinus radiata* es más eficiente en términos de costos que el cruzamiento a nivel regional. En una discusión sobre la utilidad de la interacción **G x E**, Matheson y Cotterill (1990) señalaron que ésta es útil sólo si las respuestas de los genotipos son repetibles y las respuestas de los sitios son predecibles. Esto último significa que las diferencias entre sitios deberán ser interpretables con respecto a algún factor ambiental, lo cual no es generalmente el caso en Australia. La interacción **G x E** puede, sin embargo, ser interpretable. Por ejemplo, en *Pinus taeda* los árboles del estado de Texas son más productivos en los sitios expuestos a sequía (Long. 1980; Yeiser *et al.* 1981).

La evaluación fisiológica puede ser útil para interpretar la interacción **G x E**. La Figura 1 muestra un ejemplo de interacción **G x E** con *Picea mariana* (Mill.) B.S.P., donde las diferencias entre familias no se expresan en los dos sitios más productivos, pero son claramente evidentes en un tercer sitio, menos productivo. Así, dos de las familias (que tienen una madre en común) muestran un crecimiento relativamente estable a través de los sitios mientras las otras dos familias (que tienen otra madre en

común) muestran un crecimiento inestable en los sitios. El sitio menos productivo ha mostrado en forma consistente estar bajo mayor estrés hídrico que los otros dos sitios, como resultado de un mayor drenaje en el suelo. La evaluación fisiológica de estas familias durante un período de tres años mostró que las familias estables tienen consistentemente una tasa de fotosíntesis neta más alta que las familias inestables (Figura 2) (Johnsen y Major. 1995; Flanagan y Johnsen. 1995). La evaluación fisiológica ha confirmado que esta interacción **G x E** es más que una simple aberración estadística, ya que tiene una base biológica y es potencialmente explotable con fines forestales.

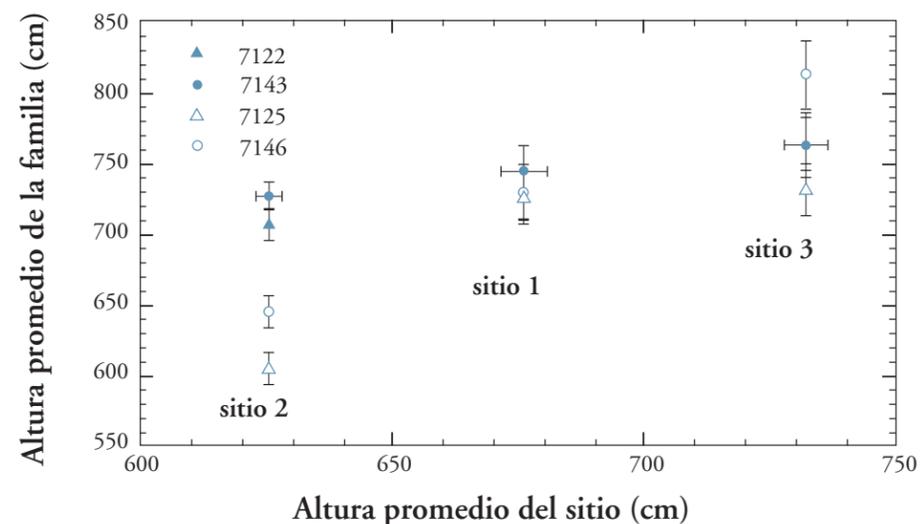


Figura 1. Altura promedio de la familia vs. altura media del sitio en cuatro familias de hermanos completos de *Picea mariana* (tomado de Johnsen y Major. 1995).

Además de comprender la evidente interacción **G x E** en los ensayos de campo existentes, es posible realizar una evaluación preliminar masiva para identificar las fuentes de semilla apropiadas a sitios particulares. Esta evaluación comúnmente es sistemática, primero trabajando a nivel de procedencias y después dentro de éstas. Por ejemplo, Allan y Chambers (1994) han evaluado plántulas de ahuehuate (*Taxodium distichum* L.) en la tolerancia a estrés por salinidad e inundación. Se han examinado tanto características de crecimiento como ecofisiológicas. Los primeros esfuerzos se concentraron en probar si había diferencias en la tolerancia entre procedencias originadas en una gama de ambientes salinos. También se evaluaron familias de polinización libre dentro de procedencias. Se ha encontrado variación genética en ambos niveles, y los resultados sugieren que la selección para aumentar la tolerancia a la salinidad podría tener éxito.

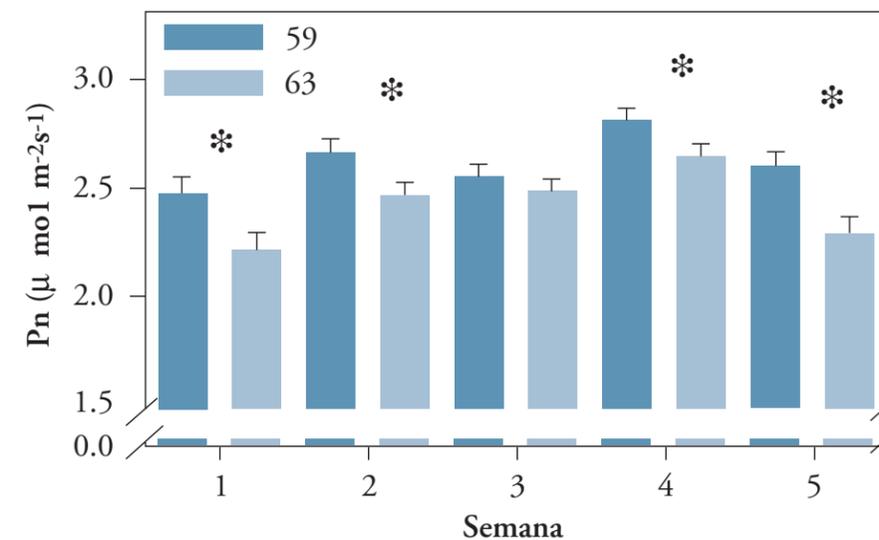


Figura 2. Fotosíntesis neta promedio (Pn) de la progenie de dos fuentes maternas de *Picea mariana* (59 y 63) evaluada en árboles de 21 años de edad durante cinco semanas (tomado de Johnsen y Major. 1995).

Riesgo

Loehle y Namkoong (1987) presentaron evidencias de que las especies con un crecimiento juvenil rápido tienden a tener ciclos de vida más cortos, menor resistencia a insectos y a patógenos, y menor distribución de materia seca a la raíz que al tallo. Ellos conjeturan que estas diferencias comparativas también ocurren dentro de especies y que la selección para aumentar la tasa de crecimiento juvenil puede ocasionar impactos negativos sobre características adaptativas. Al nivel de procedencias, el trabajo de Rehfeldt (1978, 1983, 1985, 1993) muestra claramente que las procedencias de climas más severos (mayores elevaciones) generalmente crecen más lento y son más resistentes al estrés que procedencias de climas más favorables (menores elevaciones). Teskey *et al.* (1987) presentan datos que muestran correlaciones negativas débiles entre la tasa de crecimiento promedio y la tolerancia al frío a nivel de familias en *Pinus taeda* L.

En un estudio más detallado, L'Hirondelle *et al.* (1994) mostraron que las familias de *Pinus contorta* Dougl. con mayor velocidad de crecimiento, alcanzaron ese crecimiento debido a una extensión en la temporada de crecimiento, lo que resultó en una menor tolerancia al frío durante el otoño, aumentando el riesgo de daños por heladas tempranas.

La evaluación ecofisiológica proporciona un medio de evaluar los riesgos asociados con la selección basada exclusivamente en la tasa de crecimiento. Los genotipos superiores pueden evaluarse con varias herramientas fisiológicas para examinar su susceptibilidad al estrés. Las respuestas se pueden evaluar bajo una mayor gama de condiciones ambientales que a las que se verán expuestas en cualquier sitio durante cualquier período particular de tiempo. Aunque pueden existir correlaciones genéticas negativas entre la tasa de crecimiento y la tolerancia al estrés, es posible, especialmente a nivel de clones, identificar individuos que no presentan esa correlación al combinar un crecimiento rápido con una suficiente tolerancia al estrés.

Cambio climático

Las concentraciones de CO₂ atmosférico se están elevando y existe un consenso general de que se duplicarán durante el próximo siglo. Un aumento en el CO₂ ha mostrado, por lo menos temporalmente, que aumenta la tasa de crecimiento en plántulas de árboles forestales. Una elevación en el CO₂ también puede alterar los componentes de procesos fisiológicos de la productividad. Por ejemplo, se ha mostrado que un aumento en el CO₂ aumenta la fotosíntesis neta y la eficiencia de uso de agua, disminuye la capacidad fotosintética, altera la distribución de biomasa y la fenología del crecimiento del brote, y disminuye la tolerancia al frío. (Eamus y Jarvis 1989; Margolis y Vecina. 1990; Johnsen. 1993; Murray *et al.* 1994; Samuelson y Seiler. 1994).

Como se señaló, la variación genética entre y dentro de poblaciones de árboles se manifiesta por medio de la variación genética en procesos fisiológicos, incluyendo aquellos enumerados arriba. ¿Mediante su influencia sobre estos procesos, podría el aumento en CO₂ alterar el desempeño genético en el crecimiento y supervivencia de las plantas? Si la respuesta a esta pregunta es sí, entonces el establecimiento de las fuentes de semilla y de los genotipos con base en pruebas realizadas en las condiciones actuales de CO₂ podría resultar en un menor potencial productivo o incluso en una mala adaptación de los bosques futuros.

La evaluación fisiológica es útil para establecer la importancia potencial de las interacciones genotipo x ambientes futuros. En el Instituto Nacional de Silvicultura de Petawawa se estableció una serie de experimentos para examinar la variación genética en el crecimiento de *Picea mariana* y las respuestas fisiológicas al aumento en el CO₂ y a otros factores ambientales. El trabajo realizado con material de una amplia gama de procedencias indicó que la clasificación de los materiales con base en el crecimiento, distribución de materia seca e intercambio de gases fueron similares bajo condiciones ambientales actuales y elevadas de CO₂ (Johnsen y Seiler. 1996). En forma opuesta, en un estudio que usa una gama más reducida de procedencias del Norte de Ontario, los resultados muestran diferencias entre procedencias en el crecimiento bajo condiciones ambientales actuales, pero no bajo CO₂ elevado (Figura 3, Johnsen. 1994).

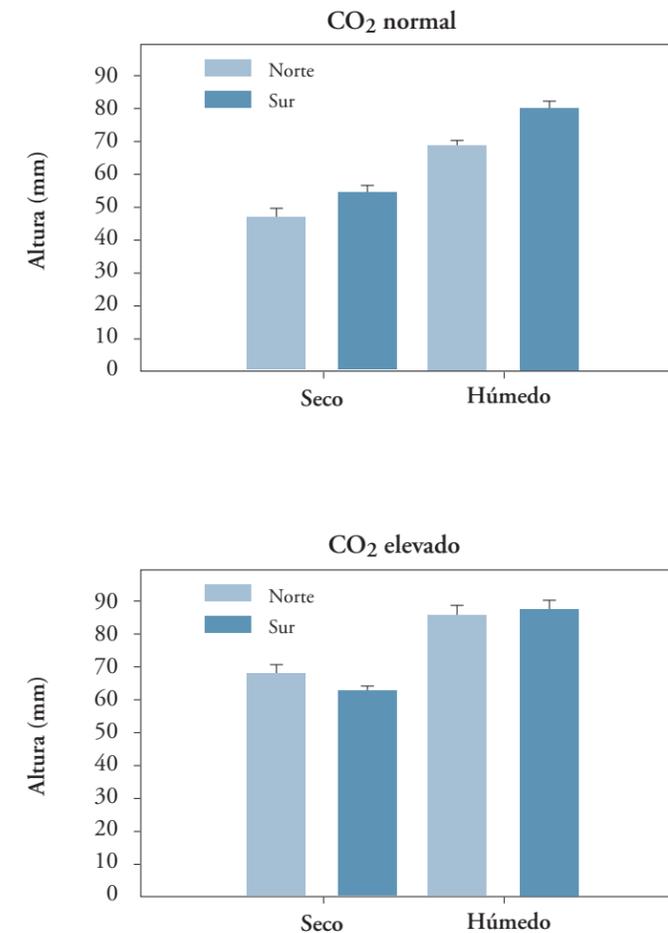


Figura 3. Altura media a un año de edad en procedencias de *Picea mariana* (Norte y Sur) creciendo bajo condiciones húmedas y secas en dos niveles de CO₂ atmosférico (CO₂ normal = 350 ppm; CO₂ elevado = 700 ppm).

Además, en un estudio de invernadero usando familias de un programa de cruzamiento, el crecimiento en invernadero se relacionó con el crecimiento en campo bajo condiciones ambientales de CO₂, pero no bajo condiciones elevadas de CO₂ (Figura 4, Johnsen, datos inéditos). Estos resultados preliminares sugieren que los mejoradores de árboles deberían considerar las ramificaciones potenciales de las estrategias de mejoramiento actuales en vista del aumento en los niveles atmosféricos de CO₂. La selección de genotipos para respuestas a mayores niveles de CO₂ es básicamente una extensión del concepto de evaluar la interacción **G x E**.

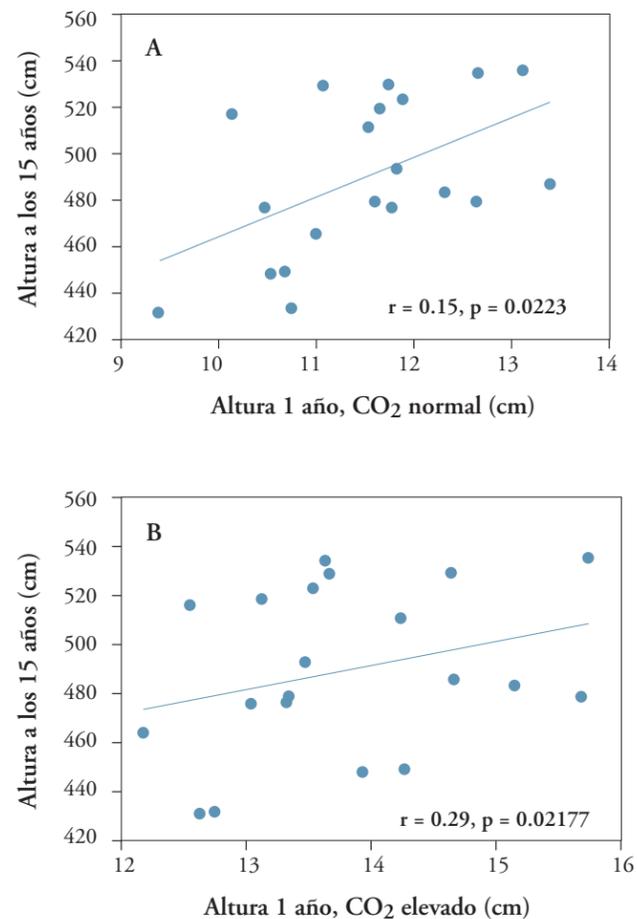


Figura 4. Correlaciones entre la altura promedio a los 15 años de edad en condiciones de campo y al año de edad en condiciones de invernadero de 20 familias de *Picea mariana*, bajo condiciones normales (A) y elevadas (B) de CO₂.

Además de los efectos directos del CO₂ sobre la fisiología y crecimiento de las plantas, el aumento del CO₂ puede resultar en un cambio de clima debido al “efecto de invernadero”. Los pronósticos varían de aumentos de 1 a 5°C de temperatura durante el próximo siglo, con diversas variantes en los patrones de precipitación. Los trabajos de Rehfeldt (1978, 1983, 1985, 1993) y de Fryer y Ledig (1972) indican que los árboles pueden mostrar adaptaciones fenológicas y fisiológicas estrechamente sincronizadas con el ambiente. Además, los árboles frecuentemente muestran una amplia variación genética dentro de la población, que puede amortiguar los efectos del cambio climático. La investigación en genética fisiológica puede aumentar el valor de la investigación genética tradicional (Stettler y Bradshaw, 1994) para evaluar el potencial de des-adaptación de los bosques naturales con el cambio climático y proporcionar bases para la intervención humana si es necesario.

Técnicas y herramientas fisiológicas

Las herramientas y las técnicas disponibles para la evaluación fisiológica son diversas y varían desde aquellas bastante primitivas (análisis de crecimiento) a aquellas sumamente sofisticadas (uso de isótopos estables). Cada una de ellas tiene sus aplicaciones, ventajas y desventajas. En muchas técnicas, la tecnología ha avanzado tremendamente durante la década pasada, aumentando la calidad potencial de las mediciones, la facilidad de éstas y los tamaños potenciales de muestreo. En muchos casos, los costos de las herramientas más nuevas frecuentemente inhiben su uso en escalas pertinentes genéticamente. En las secciones siguientes, se proporciona una descripción breve de algunas de estas herramientas, indicando sus métodos de uso, ventajas, desventajas y costos.

Análisis de crecimiento

El análisis de crecimiento representa uno de los métodos más elementales de obtener información fisiológica. El análisis de crecimiento de las plantas es una técnica que separa el crecimiento en los procesos componentes. Es útil para atribuir las diferencias en crecimiento entre tratamientos a cuatro fuentes: diferencias en el tamaño inicial, diferencias en la asimilación neta de carbono, diferencias en la duración de la asimilación del carbono, y diferencias en la distribución del carbono entre raíces, tallos y hojas.

Una ventaja general del análisis de crecimiento es que se puede realizar bajo muchas condiciones diferentes y no necesita de equipo especial. El análisis de crecimiento proporciona información integrada sobre el desempeño de las plantas. Sin embargo, el análisis de crecimiento es muy laborioso y requiere atención extrema a los detalles para obtener resultados útiles.

El peso seco final de una plántula puede ser descrito por la ecuación: $W_t = W_{(t-x)} e^{R \cdot x}$, donde: W = peso seco de la plántula, R = tasa relativa de crecimiento, e = base de los logaritmos naturales, t = tiempo, y x = duración del intervalo de crecimiento. Para que esta ecuación se aplique estrictamente, el crecimiento debe ser exponencial. En realidad, el crecimiento de los árboles es únicamente exponencial durante el desarrollo temprano de las plántulas. Sin embargo, aun después de este período, la ecuación todavía proporciona una descripción razonablemente buena del crecimiento durante períodos cortos.

La tasa de crecimiento relativo (R) se puede separar posteriormente en sus partes componentes, la tasa fotosintética por unidad de hoja (E) y la proporción de área foliar (LAR) tal que $R = E \times LAR$, donde E es el aumento en el peso seco por unidad de hoja por unidad de tiempo y LAR es el área foliar dividida entre el peso total de la planta. Así, R se divide en un componente de asimilación de carbono (E) y un componente de distribución de biomasa (LAR).

El análisis de crecimiento involucra la cosecha destructiva de plántulas a través del tiempo. Como en cualquier análisis genético cuantitativo, la variabilidad puede evaluarse entre procedencias, familias, y/o clones. Las semillas, plántulas o propágulos vegetativos se establecen en un diseño experimental con sus repeticiones, ya sea en condiciones de invernadero, cámara de crecimiento, vivero o campo. Durante cada cosecha, las plántulas se separan cuidadosamente del sustrato de crecimiento, y después se separa la parte aérea del sistema radical de cada planta. La raíz se limpia cuidadosamente y se seca en un horno. El uso de un sustrato con una proporción alta de arena aumenta la facilidad de extracción, limpieza y recuperación de las raíces. La parte aérea de las plántulas se separa en tallos y hojas (o acículas). Los tallos y las hojas se secan también en un horno. Si se desea expresar E con base en el área del follaje, el área foliar debe estimarse usando un medidor de área u otros métodos de muestreo (Percy *et al.* 1989). Así, los pesos secos individuales de raíz, tallo y hojas (y área foliar) son los datos primarios usados para estimar R , E y LAR .

El análisis de crecimiento se puede realizar usando diseños experimentales típicos, como el de bloques completos al azar y diseños en parcelas divididas. La estimación de los parámetros del análisis de

crecimiento y su análisis estadístico dependerá de si se utiliza la metodología del análisis de crecimiento clásico o la del funcional.

El Análisis de crecimiento clásico

El análisis de crecimiento clásico involucra la estimación de parámetros de análisis de crecimiento durante períodos discretos, como una estación de crecimiento completa o parte de ella. Por ejemplo, las cosechas podrían realizarse inmediatamente después de la germinación, a la mitad, y al final de la temporada de crecimiento. Después del secado, los componentes de las plántulas se pesan. **RGR**, **E** y **LAR** se estiman entonces para el período entre el tiempo 1 y el tiempo 2 usando las ecuaciones siguientes:

$$RGR = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1);$$

$$E = ((W_2 - W_1) / (t_2 - t_1)) ((\ln L_{a2} - \ln L_{a1}) / (L_2 - L_1));$$

$$LAR = L_a / W;$$

donde: **W** es el peso seco de la planta, **t** es el tiempo, **ln** es el logaritmo natural y **L_a** es el área foliar. El peso de la hoja puede sustituirse por **L_a** para calcular **E** con base en el peso de hoja, y la relación de peso de hoja (**LWR**) en vez de **LAR**.

La estimación de **R**, **E** y **LAR** realizada con las ecuaciones anteriores representa valores medios durante un período particular de tiempo. La tasa relativa de crecimiento, **E** y **LAR** pueden analizarse estadísticamente usando análisis de varianza (ANOVA) como en el caso de cualquier otra característica métrica.

El Análisis de crecimiento funcional

En el análisis funcional de crecimiento, en lugar de muestreos grandes poco frecuentes, se realizan muestreos pequeños frecuentes para evaluar el crecimiento en forma continua a través del tiempo. Se ajustan funciones matemáticas a las curvas de crecimiento de la raíz, tallo y hojas. Un ejemplo de estas curvas se muestra en la Figura 5a. A partir de estas curvas, se estiman valores instantáneos para **R**, **E** y **LAR**. Hunt (1982) revisó los procedimientos útiles para el ajuste de curvas en los análisis de crecimiento de las plantas. Estos incluyen: funciones polinomiales, funciones asintóticas, funciones polinomiales múltiples superpuestas y “regresión en segmentos” (“splined regresión”). De éstos, la regresión en segmentos parece ser el procedimiento más útil en general. Este procedimiento es particularmente útil cuando se desconoce la forma particular de la verdadera función, pero se desea una función suave sin variaciones bruscas.

La “regresión en segmentos” involucra el uso de más de una función matemática (comúnmente polinomios cúbicos) que se unen en puntos a lo largo de los datos de progresión del crecimiento, conocidos como “nodos”. Hunt (1979) presenta una discusión detallada de esta metodología. Un programa de computo comercial (para computadoras personales) que proporciona los estimadores de los parámetros del análisis de crecimiento usando regresiones por segmentos se encuentra disponible con el Dr. Roderick Hunt, en la Unidad de Ecología Vegetal Comparativa, Departamento de Botánica (Comparative Plant Ecology, Department of Botany), en la Universidad de Sheffield, en Sheffield, S10 2TN, Inglaterra.

La curva que se muestra en la Figura 5a se ajustó con el programa anterior. Los datos pertenecen a una serie de cosechas de una familia de polinización libre de *Picea mariana*. La estimación de **R**, derivada de la curva, se muestra en la Figura 5b. Un aspecto de esta gráfica es que **R** no es constante, sino que disminuye con el tamaño de la planta. Las plántulas en este estudio crecieron bajo condiciones constantes de 18 h luz y 6 h de oscuridad, por lo que la disminución en **R** no fue debido a la reducción y la terminación del crecimiento en respuesta a una reducción del fotoperíodo. En este estudio, la

disminución en **R** al aumentar el tamaño de la planta se atribuye a: 1) una proporción decreciente de tejido fotosintético en relación con tejido no - fotosintético, 2) un incremento del autosombreo, y 3) una reducción en la concentración de N-foliar debido a la dilución ocasionada por el crecimiento. La comparación de tratamientos como una función del tamaño de la planta ayuda a evitar el efecto confundido de los factores anteriores.

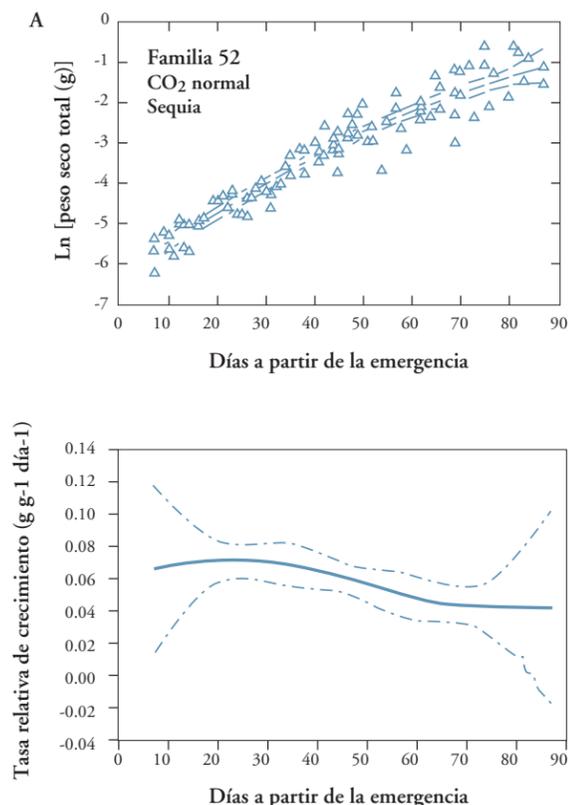


Figura 5. Ejemplos de (A) la progresión del crecimiento con curvas de regresión por segmentos y (B) tasas relativas de crecimiento estimadas para una familia de *Picea mariana* en un experimento en cámaras de crecimiento.

Dado que **R** y **E** pueden variar en el tiempo y/o con el tamaño de la planta, también lo puede hacer **LAR**. Esto es debido a que la tasa relativa de crecimiento típicamente varía entre raíces, tallos y hojas, lo cual es la base del concepto de alometría (Ledig y Perry, 1965). El crecimiento de un órgano relativo al crecimiento de otro puede expresarse como $O_1 = a(O_2)^b$ (Bongarten y Teskey, 1987). Los parámetros alométricos **a** y **b** pueden estimarse mediante regresión lineal usando el modelo: $\text{Log}(O) = c' + d \text{Log}(W)$. El análisis alométrico usa los mismos datos primarios obtenidos para los dos métodos de análisis de crecimiento, aunque los datos derivados con el método funcional generalmente proporcionan una mejor sobreposición de los datos entre tratamientos experimentales (tales como lotes de semilla). Las diferencias entre tratamientos en los parámetros alométricos se pueden probar mediante análisis de covarianza (Bongarten y Teskey, 1987, Johnsen y Bongarten, 1991). El análisis de las diferencias en la distribución de materia seca entre una fuente de semilla del Yukón (latitud 63° 34' N) y una de Ontario (45° 10' N) se muestra en la Figura 6.

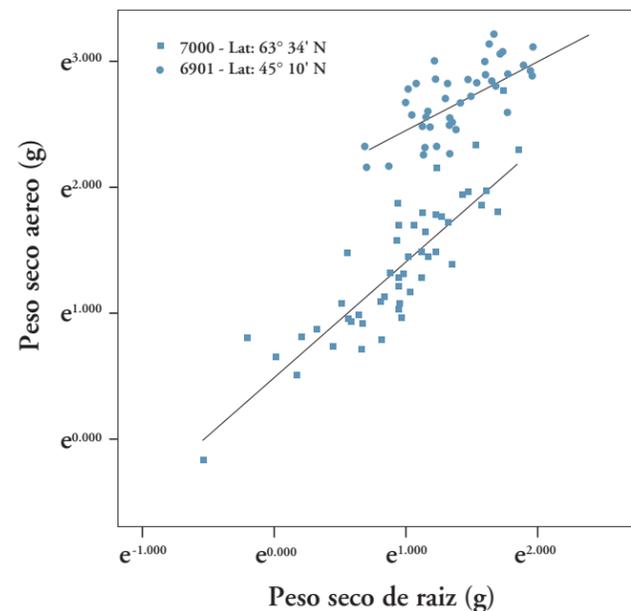


Figura 6. Ejemplo de la relación alométrica en la distribución de materia seca de dos procedencias de *Picea mariana* creciendo en condiciones de invernadero (tomado de Johnsen y Seiler, 1995).

Una ventaja del enfoque funcional en el análisis de crecimiento, así como también en el análisis alométrico de distribución de materia seca es, por lo tanto, que el crecimiento se puede examinar en forma más dinámica a través del tiempo. Una desventaja importante del enfoque funcional es, sin embargo, el análisis estadístico. Los procedimientos estadísticos clásicos, tal como el ANOVA, no son útiles. Por lo tanto, las comparaciones estadísticas entre tratamientos involucran la construcción de intervalos de confianza, frecuentemente amplios (Figura 5b), a lo largo de las curvas. Un análisis estadístico riguroso de las interacciones, usando análisis de crecimiento funcional y alometría, es aún más difícil.

Evaluación de la fenología del brote

La evaluación de la fenología del brote se parece al análisis funcional del crecimiento en el sentido de que el crecimiento se examina a través del tiempo y frecuentemente se ajustan las funciones a los datos primarios. La fenología del crecimiento del brote se ha usado en forma extensiva y exitosa por Rehfeldt (1978, 1983, 1985, 1993) para estudiar adaptación en especies de coníferas del Noroeste de E.U.A. Los brotes de plántulas o árboles se miden frecuentemente en forma no destructiva para obtener la altura o la longitud del brote a lo largo de la temporada de crecimiento. De estos datos se estiman las fechas de inicio (rompimiento de la yema) y terminación del crecimiento y la velocidad de alargamiento del brote.

En muchas especies (por ejemplo *Picea*, *Pinus*) el crecimiento del brote es, por lo menos, parcialmente predeterminado. Esto es, los primordios de hoja se producen en la yema durante la estación de crecimiento anterior a su extensión. La extensión del brote que resulta de los primordios de hoja preformados se llama “crecimiento fijo”. El crecimiento durante el primer año de la plántula y el crecimiento que resulta de la producción suplementaria de nuevos primordios y hojas durante la

misma temporada de crecimiento se llaman “crecimiento libre”. En muchas coníferas, la capacidad de crecimiento libre declina con la edad (Pollard y Logan, 1974). La fenología de la iniciación de primordios de hoja se puede examinar por muestreos destructivos de las yemas en desarrollo a través del tiempo. Las escamas de las yemas se pueden quitar con un escalpelo y los primordios se observan en un microscopio de disección (binocular). Los primordios se acomodan en columnas abajo del domo apical. El número de primordios se puede estimar contando el número de columnas y el número de primordios en una submuestra de columnas. Usando esta metodología, Pollard (1973) mostró que las procedencias de *Picea glauca* L. de rápido crecimiento continuaban la producción de primordios de hoja en el otoño, después que las procedencias de lento crecimiento.

Relacionado tanto con la fenología del alargamiento del brote y con el desarrollo de la yema está la separación cuantitativa del crecimiento del brote en el número de unidades de tallo y en la longitud de estas unidades, discutida y empleada anteriormente por Cannell *et al.* (1976), Kremer y Larson (1983), y Bongarten (1986). Magnussen y Yeatman (1989) combinaron el análisis de componentes del crecimiento del brote y la evaluación fenológica en sus investigaciones sobre diferencias en el crecimiento entre procedencias de *Pinus banksiana*.

Intercambio de gases

El análisis de intercambio gaseoso se usa para estimar fotosíntesis, respiración, transpiración y conductancia estomatal. En las últimas dos décadas, la tecnología de la medición del intercambio de gases ha mejorado tremendamente para aumentar tanto la calidad como la velocidad de las mediciones. Mayores detalles sobre las técnicas y métodos de intercambio gaseoso se encuentran en Coombs *et al.* (1985) y Pearcy *et al.* (1989).

Durante las mediciones de intercambio de gases, las hojas o porciones de éstas, se encierran en una cámara de muestreo y se pasa aire turbulento sobre la superficie de la hoja. El aire se controla en cuanto a cambios en el contenido de CO₂ y/o de agua. Durante la fotosíntesis activa, el CO₂ se introduce por los poros de la hoja, llamados estomas, por lo que el aire que pasa por la hoja reduce su contenido de CO₂. Durante la respiración activa, el CO₂ es liberado por la hoja, por lo que el aire que pasa sobre ella se enriquece en el contenido de CO₂. En la mayoría de los casos, la concentración de CO₂ se mide usando un analizador de gases al infra-rojo (IRGA). El CO₂ absorbe longitudes de onda específicas de la luz infra-roja. Un IRGA mide la concentración de CO₂ pasando una muestra de gas a través de un tubo que tiene una fuente de luz infra-roja en un lado y un detector infra-rojo en el otro. La fotosíntesis se mide colocando la plántula bajo condiciones de luz y las mediciones de respiración se realizan en la noche o cubriendo la cámara de muestreo. Nosotros rutinariamente medimos primero la fotosíntesis de una muestra y luego cubrimos la cámara para medir la respiración.

Las plantas también liberan agua de sus estomas. Este es un proceso pasivo donde el agua es “extraída” del ambiente de humedad elevada del estoma hacia el aire más seco. La velocidad de transpiración depende tanto de la sequedad del aire (déficit de presión de vapor) como de la apertura de los estomas, la cual se estima por la medida de conductancia. La transpiración se mide al evaluar el cambio en el contenido de vapor de agua del aire que pasa sobre una hoja. Esta medición se logra con el empleo de sensores de humedad relativa y, más recientemente, con un IRGA. La conductancia se estima ajustando la medición de la transpiración por el déficit de presión de vapor del aire.

Actualmente existen sistemas portátiles de intercambio gaseoso disponibles de varias compañías. Algunos sistemas como el LI-COR 6200 (LI-COR, Inc., P.O. Box 4425, Lincoln, NE, 68504, EUA) son sistemas “cerrados” donde la muestra de la planta se encierra en un circuito cerrado y la reducción

o aumento de CO_2 se mide durante un período breve. Otros sistemas como el ADC LCA-3 y LCA-4 (ADC, Pindar Road, Koddesson, Herts., EN11 0AQ, Inglaterra) son sistemas “abierto” y miden un “diferencial” - la diferencia en CO_2 entre el aire “fresco” entrando en una cámara y el aire que sale de esa cámara. Las mediciones toman más tiempo, pero se realizan bajo condiciones ambientales constantes. El Modelo LI-COR 6400 permite elegir la configuración del sistema (abierto o cerrado). Estos sistemas son portátiles e incluyen sensores ambientales y un receptor programable de datos. Los sistemas comerciales de IRGA varían en costos desde \$12,000 a \$25,000 dólares americanos.

Las medidas de intercambio de gases pueden realizarse en materiales de todos los tipos de experimentos. Las mediciones en plántulas se pueden hacer en ramas intactas, lo que permite que las medidas se puedan repetir a través del tiempo. Las mediciones en árboles más grandes pueden requerir el uso de escaleras o andamios para medir el follaje creciendo en condiciones abiertas. Afortunadamente, en la mayoría de las coníferas es posible medir follaje maduro en ramas separadas durante un período breve después de la separación y obtener una buena estimación del intercambio de gases (Meng y Arp. 1993). En nuestro trabajo con árboles de *Picea mariana*, nosotros rutinariamente establecemos una “tienda de campaña” como laboratorio de campo en el centro de la plantación y literalmente corremos con las muestras a este local para las mediciones después de cortar las ramas con una podadora de mango largo. Usando este método, hemos tomado hasta 100 mediciones en un día.

El intercambio de gases mide el flujo total de CO_2 y/o agua. Como la cantidad de follaje muestreado difiere entre medidas, las mediciones de intercambio de gases deben corregirse por la cantidad de follaje. La solución más simple a este problema consiste en guardar la muestra de follaje, secarlo y medir el peso seco. Como el intercambio de gases es una función del área de la hoja, con frecuencia es útil expresar el cambio de gases con base en el área foliar. Con especies de hoja ancha (latifoliadas) se pueden utilizar medidores comerciales de área foliar para medir simplemente el área proyectada de la hoja. Con especies de coníferas la estimación del área de las acículas es más difícil. Se pueden utilizar los medidores de área foliar y aplicar un factor de corrección para convertir el área proyectada medida en la hoja a área total superficial. El área de las acículas también se puede estimar usando medidas volumétricas o midiendo el diámetro y longitud de las acículas y suponer una geometría específica (Percy *et al.* 1993).

El intercambio de gases frecuentemente muestra patrones estacionales que están relacionados con cambios en el ciclo de crecimiento, temperatura, y/o precipitación. Con frecuencia las fuentes de semilla (procedencias) muestran cambios de orden (ranking) a través del tiempo por lo que debe evaluarse la progresión estacional para comprender la relación del intercambio de gases con la productividad y otras características. Los cambios estacionales en el ordenamiento de los materiales se observaron en un ensayo de procedencias de toda el área de distribución natural de *Picea mariana* medida en una localidad (Figura 7), en donde las fuentes del Norte iniciaron fotosíntesis neta positiva más temprano durante la primavera y presentaron también una declinación en la fotosíntesis más temprano en el otoño, en comparación con procedencias de más al Sur (Johnsen *et al.* 1996).

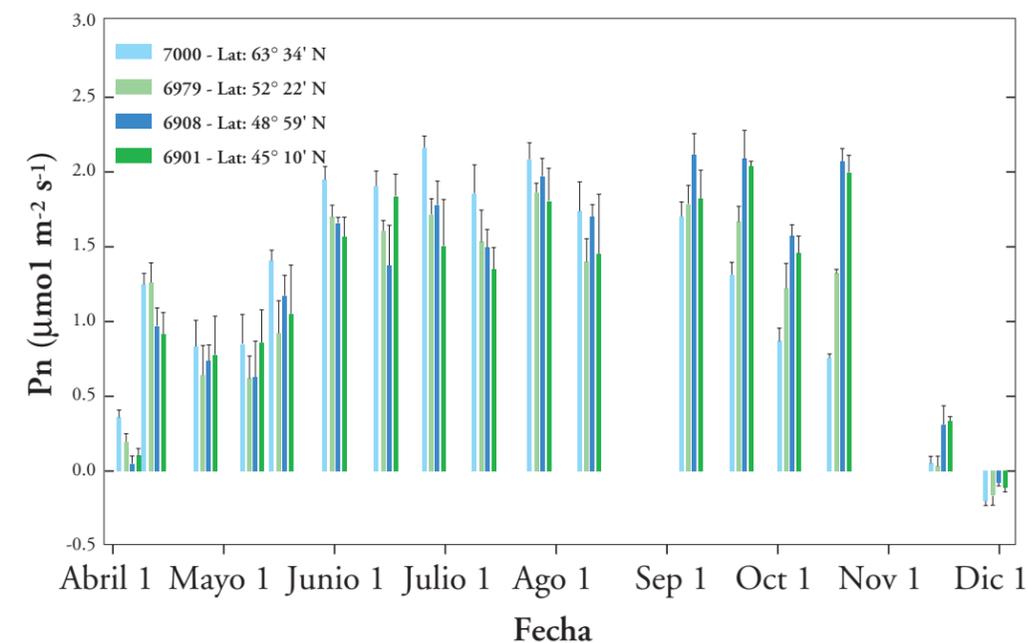


Figura 7. Patrón estacional de la tasa de fotosíntesis neta (Pn) de árboles de 21 años de edad de dos procedencias del Norte (7000 y 6970) y dos del Sur (6908 y 6901) de *Picea mariana* (Tomado de Johnsen *et al.* 1995).

El intercambio de gases también exhibe típicamente patrones diarios, por lo que el muestreo debería reflejar dichos patrones. Los individuos y/o entidades genéticas pueden medirse a lo largo de diferentes períodos en el día. Estos períodos pueden considerarse como “bloques en tiempo” y utilizarse con el ANOVA. El intercambio de gases también se modifica en respuesta a condiciones ambientales como luz, temperatura, humedad del suelo, y sequedad del aire (déficit de presión de vapor).

La variación genética en el intercambio de gases puede deberse a variación genética en respuesta a condiciones ambientales específicas. Es posible obtener datos a través de una gama de condiciones ambientales para cada genotipo estudiado y emplear las curvas de respuesta para examinar la variación genética. Este enfoque ha sido útil en nuestro trabajo con *Picea mariana* donde hemos encontrado progenies diferentes que varían en la respuesta fotosintética al déficit de presión de vapor (Figura 8, Major y Johnsen. 1995).

Las mediciones de intercambio de gases representan medidas instantáneas. Debido al efecto compuesto de otros factores, pequeñas diferencias genéticas en la tasa de fotosíntesis pueden resultar en grandes diferencias en crecimiento a través del tiempo. Debido a limitaciones de muestreo, al “ruido” ocasionado por efectos del ambiente, y a la falta de habilidad en muchos de los operadores del equipo, es difícil detectar estas pequeñas pero importantes diferencias en el intercambio de gases, aun cuando éstas existan. Los adelantos tecnológicos, nuevos esquemas de muestreo y un entrenamiento cuidadoso permitirán aumentar la utilidad de las mediciones de intercambio de gases en estudios genéticos en la próxima década.

Isótopos estables de carbón

El carbón (C) en la atmósfera se encuentra en forma predominante (98.9%) con un peso molecular de 12. Una proporción pequeña (1.1%) de C en la atmósfera tiene un peso molecular de 13. Así, tanto el ^{12}C como el ^{13}C ocurren naturalmente como isótopos estables. Se ha observado que el tejido vegetal presenta cantidades ligeramente menores de ^{13}C con respecto a la atmósfera. Esto es, las plantas discriminan en contra de la forma más pesada de C. En la década de 1980 se demostró teórica y empíricamente que la proporción $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ está relacionada con la proporción de fotosíntesis a conductancia estomatal. Esta relación se conoce como la “eficiencia inherente en el uso del agua”. Ehleringer *et al.* (1993) detallan la teoría y aplicación de los isótopos estables de C.

La relación $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ se determina usando un espectrómetro de masa después de la combustión de la muestra de tejidos y separación del C. Típicamente, el tejido foliar se cosecha, se muele y se proporciona a un laboratorio analítico, como el del Dr. James Ehleringer (Stable Isotope Ratio Facility for Environmental Research and Department of Biology, University of Utah, Salt Lake City, Utah 84112), o el del Dr. Lawrence Flanagan (Department of Biology, Carleton University, Ontario, Canadá K1S 5B6).

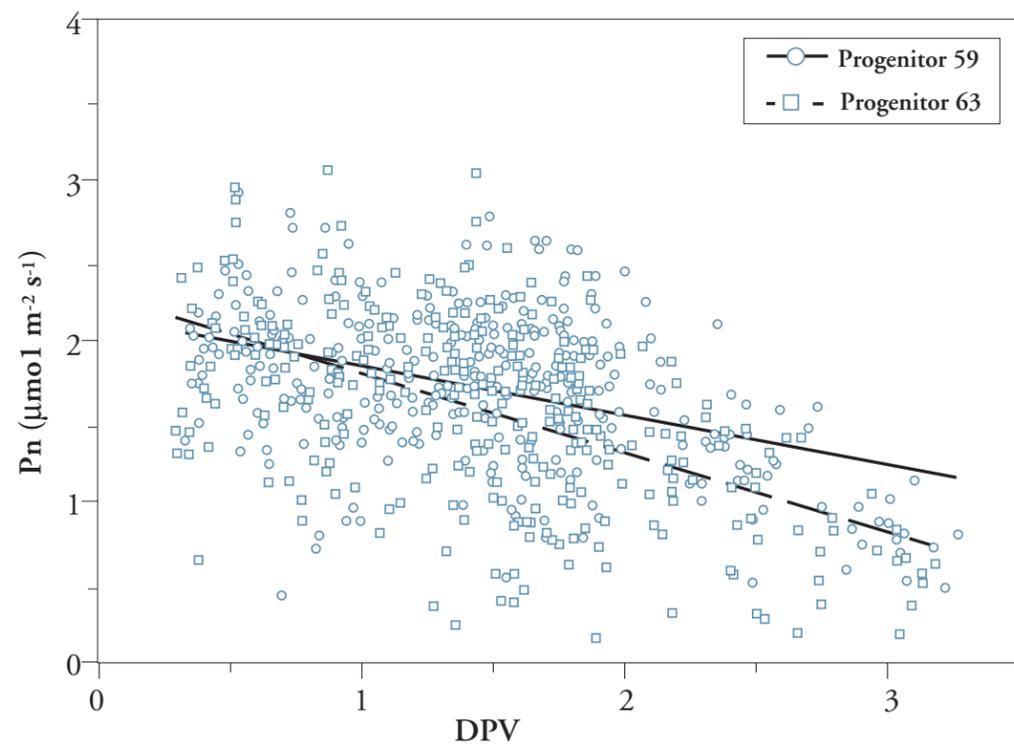


Figura 8. Fotosíntesis neta (Pn) versus déficit de presión de vapor (DPV) en la progenie de 21 años de edad de dos fuentes maternas de *Picea mariana*.

Una ventaja importante de la discriminación de isótopos de carbón es que proporciona una medida integral de una característica fisiológica que está relacionada directamente con la fotosíntesis. De esta manera es más fácil detectar la variación genética existente, que con los métodos de intercambio de gases. En diferentes especies cultivadas se ha detectado la presencia de variación genética en la discriminación de isótopos de carbono (Ehleringer *et al.* 1993). El uso de esta técnica en árboles forestales

ha aumentado en años recientes. En *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco (Zhang *et al.* 1993) y en *Larix occidentalis* Nutt. (Zhang *et al.* 1994) se ha observado variación entre procedencias en esta característica. También se ha observado variación familiar en *Picea mariana* (Flanagan y Johnsen. 1995). En este último estudio, el desempeño de familias y árboles individuales fue muy estable durante un año muy húmedo y un año muy seco (Figura 9).

Los precios por muestra varían desde \$10 a \$30 dólares americanos, lo cual puede limitar el uso en gran escala del análisis de discriminación de isótopos de carbono en estudios genéticos donde los tamaños de muestra son generalmente grandes. Además, como la proporción $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ se relaciona con el cociente de fotosíntesis a conductancia estomatal, las diferencias en $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ se pueden deber a diferencias en fotosíntesis y/o en conductancias, como lo muestra Ehleringer *et al.* (1993). Es necesario contar con datos fisiológicos preliminares, como en el caso del estudio realizado por Johnsen y Major (1995), para interpretar correctamente los resultados de discriminación de isótopos de carbono.

Relaciones hídricas

El agua es un factor predominante que determina la distribución geográfica de la vegetación y de los árboles. Así, componentes fisiológicos relacionados con la tolerancia y evasión de la sequía se consideran como características adaptativas importantes. Algunas de las características importantes de la tolerancia a la sequía incluyen la conductancia hidráulica de la raíz y del tallo, y el mantenimiento de la turgencia de la hoja por el potencial osmótico y la elasticidad de la pared celular. Algunas de las características importantes de la evasión a la sequía involucran la distribución relativa de carbono a raíces versus parte aérea de la planta, morfología de la hoja, densidad estomatal, arreglo y composición de la cutícula, y comportamiento estomatal. El área general de las relaciones hídricas fue revisada por Kramer (1983).

El potencial hídrico (Ψ_w) de una planta refleja el balance entre la captación de agua por las raíces y la pérdida de agua por las hojas. La cámara o “bomba” de presión estima en forma rápida el Ψ_w en laboratorio o en campo. Los tallos u hojas de la plántula o árbol se cortan y se introducen con el corte expuesto hacia el exterior de la cámara. La presión se aplica lentamente hasta que el agua aparece en la superficie del corte (se observa con una lupa de aumento). En este punto la presión en la cámara se considera en equilibrio con la tensión negativa dentro del xilema. Mientras más negativa sea la tensión, más negativo es el Ψ_w y más elevado el estrés hídrico de la planta.

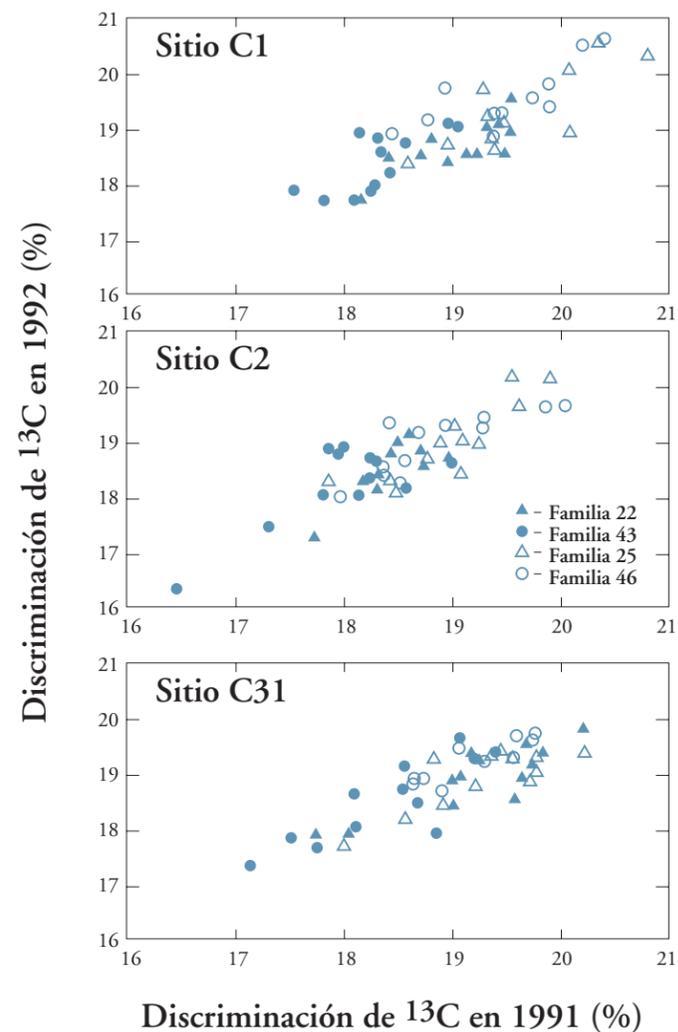


Figura 9. Relación entre los valores de discriminación de isótopos de carbono obtenidos en 1991 y 1992 en árboles individuales de *Picea mariana* en tres sitios (tomado de Flanagan y Johnsen. 1995).

Durante la noche, en la oscuridad, los estomas se cierran, la transpiración cesa y los árboles se rehidratan. Antes del amanecer, el Ψ_w de las plantas se equilibra con el del suelo. Así, las medidas de Ψ_w en este momento proporcionan una medida del estrés hídrico mínimo a que se expone el árbol. Durante el día, la transpiración aumenta y su velocidad depende de las características genéticas de la planta, la sequedad del aire y la humedad del suelo. Conforme transcurre el día, el Ψ_w de la planta disminuye. Así, las lecturas de la bomba de presión a lo largo del día proporcionan una medida del estrés hídrico acumulado durante el día. Estas medidas pueden ser útiles para interpretar las mediciones de intercambio gaseoso.

Además, el Ψ_w puede separarse en sus partes componentes (Ritchie. 1984). Los dos componentes más importantes son el potencial de turgencia (Ψ_p) y el potencial osmótico (Ψ_o) tales que: $\Psi_w = \Psi_p + \Psi_o$. El potencial de turgencia es una fuerza positiva ejercida hacia afuera en la pared celular, de la misma manera que el aire dentro de un globo ejerce presión sobre el material de éste. Virtualmente,

todos los procesos fisiológicos en un árbol dependen del mantenimiento de la turgencia en las células (Kramer.1983). El potencial osmótico es una fuerza negativa que resulta de los solutos disueltos (azúcares, sales, carbohidratos). El potencial osmótico “impulsa” el agua dentro de la célula, manteniendo así la turgencia.

La cámara de presión también es útil para construir curvas de presión-volumen, de las cuales se pueden derivar Ψ_p y Ψ_o . Brevemente, un método simple consiste en cortar ramillas de un árbol antes del amanecer y traerlas al laboratorio. Las ramillas deben recortarse bajo el agua y mantenerse con el corte terminal en el agua, la parte aérea en una bolsa de plástico para mantener una humedad elevada, y en la oscuridad durante al menos dos horas con el objeto de rehidratarlas. En ese momento se saca la ramilla del agua, se elimina el agua exterior y se mide para obtener el Ψ_w y el peso túrgido. La ramilla se pone sobre una mesa de laboratorio y se miden el Ψ_w y el peso a lo largo del día conforme se deshidrata. Es importante que tanto el aumento como la disminución de la presión sean muy lentos al medir el Ψ_w . Después de terminar las mediciones de Ψ_w , la ramilla se seca en un horno para la determinación del peso seco. El contenido relativo de agua (CRA) se calcula entonces para cada medición como:

$$CRA = (\text{peso medido} - \text{peso seco}) / (\text{peso túrgido} - \text{peso seco}) \times 100.$$

Estos datos se grafican en forma de los recíprocos del potencial de agua versus CRA, como se muestra en la Figura 10. Varios parámetros importantes de relaciones hídricas se pueden derivar de estas gráficas, como el potencial osmótico en la máxima turgencia y en el punto de pérdida de turgencia, el módulo de elasticidad, el turgor en cualquier punto determinado, y el CRA en el punto de pérdida de la turgencia. Los métodos e interpretaciones de las curvas de presión se describen en forma más completa en Kramer (1983) y Pearcy *et al.* (1993).

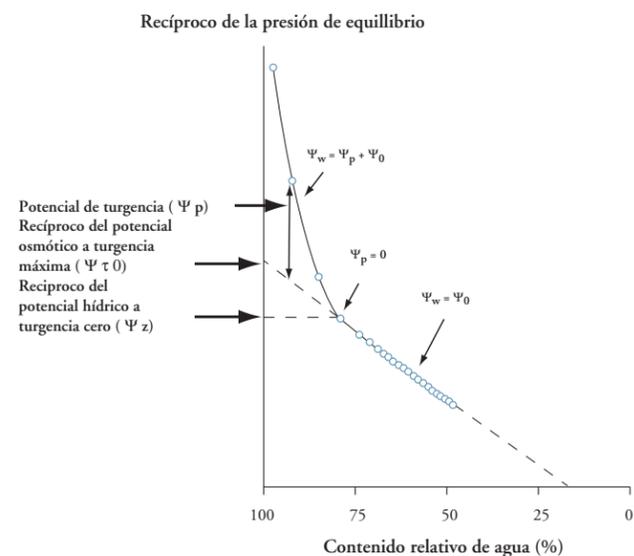


Figura 10. Curva típica de presión-volumen, mostrando la derivación de los parámetros de relaciones hídricas en los tejidos.

Tolerancia al frío y al calor

En varios estudios se ha demostrado que la capacidad para resistir bajas temperaturas se encuentra bajo un control genético fuerte tanto a nivel de procedencias (Dehayes *et al.* 1990; Lindgren y Nilsson. 1992) como de familias (Thomas y Lester. 1992; L'Hirondelle. 1994). Brevemente, la evaluación de la tolerancia al frío involucra el muestreo de plántulas o brotes y someterlas a bajas temperaturas específicas. El daño a los tejidos se puede evaluar visualmente (Rehfeldt. 1985) o por medio de la medición de la conductividad eléctrica de los extractos del follaje (Sakai y Larcher. 1987). Los métodos estadísticos para el análisis de este tipo de datos se presentan y discuten en el trabajo de Dehayes y Williams (1989).

Se pueden utilizar técnicas similares para estudiar la tolerancia al calor. Colombo *et al.* (1992) detectaron variación clonal en la tolerancia al calor entre clones de *Picea mariana*. En este caso los brotes se expusieron a 47°C y los daños se evaluaron visualmente durante las siguientes cuatro semanas.

Fluorescencia de la clorofila

La energía luminosa absorbida por las hojas se utiliza en la fotosíntesis, se disipa como calor o se emite como fluorescencia en el espectro del rojo lejano. Como estos procesos son competitivos, una medición de la fluorescencia de la clorofila (**FC**) puede proporcionar una estimación del desempeño fotosintético. Actualmente existen varios sistemas comerciales disponibles para este tipo de mediciones. Los sistemas para evaluar **FC** constituyen una herramienta de evaluación rápida, no invasiva y no destructiva.

La medición de la fluorescencia de la clorofila empieza a ser popular como una herramienta en la evaluación de la calidad fisiológica de planta en vivero. También existe un interés creciente en usar **FC** como una herramienta para evaluar variación genética. Binder *et al.* (1994) demostraron la existencia de diferencias en **FC** entre procedencias de *Picea glauca* L. relacionadas con diferencias en la tolerancia al frío a través del tiempo. La fluorescencia de la clorofila también se puede usar para evaluar la respuesta a otros tipos de estrés (Vidaver *et al.* 1991). Se pueden medir varios parámetros de **FC**, algunos de los cuales proporcionan una evaluación muy rápida. De esta manera, la medición de **FC** tiene potencial como una herramienta de selección preliminar con tamaños grandes de muestreo, por lo que ofrece una ayuda potencialmente valiosa en estudios de variación genética. La medición de la fluorescencia de la clorofila todavía se encuentra bajo la categoría de una "caja negra", considerando que la variación detectada con esta técnica todavía es difícil de interpretar por sí misma. Se sugiere que la medición de **FC** se incluya como un componente de otros estudios de genética fisiológica para aumentar su posibilidad de interpretación. La información básica sobre **FC** se encuentra disponible en un informe realizado por Vidaver *et al.* (1991) en el B.C. Ministry of Forests, Research Branch, 31 Bastion Square, Victoria, B.C., V8W 3E7, Canadá.

Incorporación de la genética fisiológica en programas tradicionales

Los ensayos de crecimiento tradicionales proporcionan los análisis más extensivos de los valores fenotípicos y sus componentes **G**, **E** y **G x E**. Conforme se hace más intensa la evaluación fisiológica es posible aprender más sobre el por qué los genotipos tienen un desempeño diferente, pero las interpretaciones genéticas pertinentes se hacen más difíciles. Por ejemplo, en nuestra evaluación de las causas de la interacción **G x E** observada en *Picea mariana*, tuvimos que concentrarnos únicamente

en cuatro familias extremas de un total de 49 familias en el dialelo. El estudio utilizó las técnicas de intercambio de gases, análisis de curvas presión-volumen y discriminación de isótopos de carbono. Este estudio parece identificar los mecanismos fisiológicos que explican las diferencias en crecimiento de las cuatro familias extremas. ¿Pero estos resultados son aplicables en general a la población entera? Eso todavía es incierto. Nosotros hemos muestreado un número más grande de familias (25) para la determinación de la discriminación de isótopos de carbono para contestar parcialmente esta pregunta.

Las características fisiológicas deben examinarse en diseños experimentales apropiados con un tamaño de muestra adecuado tanto entre como dentro de entidades genéticas. Los costos y las dificultades de estas mediciones también requieren que la interpretación de los datos sea apropiada para el protocolo de muestreo utilizado (Seiler y Johnsen. 1994).

Por lo tanto, la genética fisiológica debería emplearse para aumentar el valor de las pruebas de progenie tradicionales. Las pruebas de progenie casi siempre constituyen las pruebas más extensivas. Si las herramientas y el personal están disponibles, las mediciones de fenología y fluorescencia de la clorofila podrían realizarse sobre una submuestra grande, mientras que los análisis de intercambio de gases y curvas de presión-volumen podrían realizarse en una submuestra más pequeña, y si existen los recursos económicos, la discriminación de isótopos de carbono en una submuestra aún más pequeña. Además, las entidades genéticas élite podrían evaluarse bajo un conjunto de condiciones ambientales variadas para probar su estabilidad general. De esta manera, la información de diferentes niveles de evaluación puede integrarse con el propósito de definir las estrategias más adecuadas de establecimiento en plantaciones, mejoramiento genético y/o conservación.

Literatura citada

- Allen, J.A. and J.L. Chambers. 1994. Intraspecific variation in the response of baldcypress seedlings to salinity. *In: Proceedings of the Thirteenth North American Forest Biology Workshop*, June 14-16, 1994, Baton Rouge, Louisiana. pp: 12.
- Bongarten, B.C. 1985. Yield improvement: alternative selection criteria. *In: Proceedings Southern Forest Symposium*, Atlanta, Georgia, November 19-21, 1985. pp: 193-206.
- Bongarten, B.C. 1986. Relationships between shoot length and shoot length components in Douglas-fir and blue spruce. *Can. J. For. Res.* 16: 373-380.
- Bongarten, B.C. and R.O. Teskey. 1987. Dry weight partitioning and its relationship to productivity in loblolly pine seedlings from seven sources. *For. Sci.* 33: 255-267.
- Cannell, M.G.R., S. Thompson, and R. Lines. 1976. An analysis of inherent differences in shoot growth within some north temperate conifers. *In: M.G.R. Cannell and F.T. Last (eds.), Tree physiology and yield improvement.* Academic Press, London. pp: 173-205.
- Colombo, S.J., M.L. Colclough, V.R. Timmer, and E. Blumwald. 1992. Clonal variation in heat tolerance and heat shock protein expression in black spruce. *Silvae Genet.* 42: 234-239.
- Coombs, J., D.O. Hall, S.P. Long, and J.M.O. Scurlock. 1985. *Techniques in bioproductivity and photosynthesis.* Pergamon Press, New York. 289 p.

- DeHayes, D.H. and M.W. Williams, Jr. 1989. Critical temperature: a quantitative method of assessing cold tolerance. U.S.D.A. Forest Service General Technical Report NE-134. Northeastern Forest Experiment Station, Broomall, Pennsylvania. 6 p.
- DeHayes, D.H., C.E. Waite, M.A. Ingle, and M.W. Williams. 1990. Winter injury susceptibility and cold tolerance of current and year-old needles of red spruce trees from several provenances. *For. Sci.* 36: 982-994.
- Eamus, D. and P.G. Jarvis. 1989. The direct effects of increase in the global atmospheric CO₂ concentration on natural and commercial temperate trees and forests. *Adv. Ecol. Res.* 19: 1-55.
- Ehleringer, J.R., A.E. Hall, and G.D. Farquhar. 1993. *Stable Isotopes and Plant Carbon- Water Relations*. Academic Press, San Diego. 555 p.
- Flanagan, L. and K.H. Johnsen. 1995. Carbon isotope discrimination and its relationship to growth under field conditions in full-sib families of *Picea mariana*. *Can. J. For. Res.* 25: 39-47.
- Fryer, J.H. and F.T. Ledig. 1972. Microevolution of the photosynthetic temperature optimum in relation to the elevational complex gradient. *Can. J. Bot.* 50: 1231-1235.
- Greenwood, M.S. and H.A. Volkaert. 1992. Morphophysiological traits as markers for early selection of conifer genetic families. *Can. J. For. Res.* 22: 1001-1008.
- Hunt, R. 1979. Plant growth analysis: the rationale behind the use of the fitted mathematical function. *Ann. Bot.* 43: 245-249.
- Hunt, R. 1982. *Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis*. Edward Arnold, London. 248 p.
- Johnsen, K.H. 1993. Growth and ecophysiological responses of black spruce seedlings to elevated CO₂ under varied water and nutrient additions. *Can. J. For. Res.* 23: 1033-1042.
- Johnsen, K.H. 1994. Unstable black spruce seed source performance across varied atmospheric CO₂ environments. *In: Proceedings of the Thirteenth North American Forest Biology Workshop*, June 14-16, 1994, Baton Rouge, Louisiana. pp: 40.
- Johnsen, K.H. and B.C. Bongarten. 1991. Allometry of acetylene reduction and nodule growth of *Robinia pseudoacacia* families subjected to varied root zone nitrate concentrations. *Tree Physiol.* 9: 507-522.
- Johnsen, K.H. and J.E. Major. 1995. Gas exchange of 20-year-old black spruce families displaying a genotype x environment interaction in growth rate. *Can. J. For. Res.* 25: 430-439.
- Johnsen, K.H. and J.R. Seiler. 1996. Growth, shoot phenology and physiology of diverse seed sources of black spruce: I. Seedling responses to varied atmospheric CO₂ concentrations and photoperiod. *Tree Physiol.* 16: 367-373.
- Johnsen, K.H., J.R. Seiler, and J.E. Major. 1996. Growth, shoot phenology and physiology of diverse seed sources of black spruce: II. 23-year-old trees. *Tree Physiol.* 16: 375-380.
- Johnson, G.R. and R.D. Burdon. 1990. Family-site interaction in *Pinus radiata*: implications for progeny testing strategy and regionalised breeding in New Zealand. *Silvae Genet.* 9:55-62.
- Kramer, P.J. 1983. *Water relations of plants*. Academic Press, San Diego. 489 p.
- Kremer, A. and P.R. Larson. 1983. Genetic control of height growth components in jack pine seedlings. *For. Sci.* 29: 451-464.
- Larson, J.B. and H. Wellendorf. 1990. Early test in *Picea abies* full sibs by applying gas exchange, frost resistance and growth measurements. *Scand. J. For. Res.* 5: 369-380.
- Ledig, F.T., and T.O. Perry. 1965. Physiological genetics of the shoot-root ratio. *In: Proceedings of the Society of American Foresters*, 1965, Detroit, Michigan. pp: 29-43.
- L'Hirondelle, S.J., M.R. Carlson, and H.A. Mehl. 1994. Genetic diversity in adaptive physiological traits among lodgepole pine families differing in growth potential. *In: Proceedings of the Thirteenth North American Forest Biology Workshop*, June 14-16, 1994, Baton Rouge, Louisiana. pp: 48.
- Lindgren, K. and J.-E. Nilsson. 1992. Cold acclimation of *Pinus sylvestris* and *Pinus contorta* provenances as measured by freezing tolerance of detached needles. *Scand. J. For. Res.* 7: 309-315.
- Loehle, C. and G. Namkoong. 1987. Constraints on tree breeding: growth tradeoffs, growth strategies, and defensive investments. *For. Sci.* 33: 1089-1097.
- Long, E.M. 1980. Texas and Louisiana loblolly pine study confirms the importance of local seed sources. *Southern J. Appl. For.* 4: 127-132.
- Magnussen, S. and C.W. Yeatman. 1989. Height growth components in inter- and intra- provenance jack pine families. *Can. J. For. Res.* 19: 962-972.
- Major, J.E. and K.H. Johnsen. 1996. Family variation in photosynthesis of 22-year-old black spruce: a test of two models of physiological response to water stress. *Can. J. For. Res.* 26: 1922-1933.
- Margolis, H.A. and L.-P. Vézina. 1990. Atmospheric CO₂ enrichment and the development of frost hardiness in containerized black spruce seedlings. *Can. J. For. Res.* 20: 1392-1398.
- Matheson, A.C. and P.P. Cotterill. 1990. Utility of genotype x environment interactions. *For. Ecol. Manage.* 30: 159-174.

- Meng, F. and P.A. Arp. 1993. Net photosynthesis and stomatal conductance of red spruce twigs before and after twig detachment. *Can. J. For. Res.* 23: 716-721.
- Murray, M.B., R.I. Smith, I.D. Leith, D. Fowler, H.S. Lee, A.D. Friend, and P.G. Jarvis. 1994. Effects of elevated CO₂, nutrition and climatic warming on bud phenology in Sitka spruce (*Picea sitchensis*) and their impact on the risk of frost damage. *Tree Physiol.* 14: 691-706.
- Pearcy, R.W., J. Ehleringer, H.A. Mooney, and P.W. Rundel. 1989. *Plant physiological ecology - field methods and instrumentation.* Chapman and Hall, New York. 457 p.
- Pederick, L.A. 1990. Family x site interactions in *Pinus radiata* in Victoria, Australia, and implications for breeding strategies. *Silvae Genet.* 39: 134-140.
- Pollard, D.F.W. 1973. Provenance variation in phenology of needle initiation in white spruce. *Can. J. For. Res.* 3: 589-593.
- Pollard, D.F.W. and K.T. Logan. 1974. The role of free growth in the differentiation of provenances of black spruce *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. *Can. J. For. Res.* 4: 308-311.
- Rehfeldt, G.E. 1978. Genetic differentiation of Douglas-fir populations from the northern Rocky Mountains. *Ecology* 59: 1264-1270.
- Rehfeldt, G.E. 1983. Adaptation of *Pinus contorta* populations to heterogeneous environments in northern Idaho. *Can. J. For. Res.* 13: 405-411.
- Rehfeldt, G.E. 1984. Ecological genetics of *Pinus contorta* in the Wasatch and Uinta Mountains of Utah. *Can. J. For. Res.* 15: 524-530.
- Rehfeldt, G.E. 1993. Genetic variation in the Ponderosae of the southwest. *Am. J. Bot.* 80: 330-343.
- Ritchie, G.A. 1984. Assessing seedling quality. In: M.L. Duryea and T.L. Landis (eds.), *Forest nursery manual: production of bareroot seedlings.* Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Boston. pp: 243-259.
- Sakai, A. and W. Larcher. 1987. *Frost survival of plants - responses and adaptation to freezing stress.* Springer-Verlag, New York.
- Samuelson, L.J. and J.R. Seiler. 1994. Red spruce seedling gas exchange in response to elevated CO₂, water stress and soil fertility treatments. *Can. J. For. Res.* 24: 954-959.
- Seiler, J.R. and K.H. Johnsen. 1994. Photosynthesis, water relations, and leaf morphology of xeric versus mesic *Quercus rubra* ecotypes in central Pennsylvania in relation to moisture stresses: a discussion on sample size, sampling and statistical analyses in a physiological genetics experiment. *Can. J. For. Res.* 24: 642-643.
- Stettler, R.F. and H.D. Bradshaw, Jr. 1994. The choice of genetic material for mechanistic studies of adaptation in forest trees. *Tree Physiol.* 14: 781-796.
- Teskey, R.O., B.C. Bongarten, B.M. Cregg, P.M. Dougherty, and T.C. Hennessey. 1987. Physiology and genetics of tree growth response to moisture and temperature stress: an examination of the characteristics of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Tree Physiol.* 3: 41-61.
- Thomas, B.R. and D.T. Lester. 1992. An examination of regional, provenance, and family variation in cold hardiness of *Pinus monticola*. *Can. J. For. Res.* 22: 1917-1921.
- Vidaver, W.E., G.R. Lister, R.C. Brooke, and W.D. Binder. 1991. A manual for the use of variable chlorophyll fluorescence in the assessment of the ecophysiology of conifer seedlings. FRDA Report 163. ISSN 0835-0752. 60 p.
- Yeiser, J.L., J.P. van Buijtenen, and W. Lowe. 1981. Genotype x environment interactions and seed movements for loblolly pine in the Western Gulf region. *Silvae Genet.* 30: 196-200.
- Zhang, J., J.D. Marshall, and B.C. Jaquish. 1993. Genetic differentiation in carbon isotope discrimination and gas exchange in *Pseudotsuga menziesii*. *Oecologia* 93: 80-87.
- Zhang, J., L. Finns, and J.D. Marshall. 1994. Stable isotope discrimination, photosynthetic gas exchange and growth differences among western larch families. *Tree Physiol.* 14: 531-539.



Plantación comercial de *Pinus patula* establecida en Huayacocotla, Veracruz, con germoplasma seleccionado.



Plantación comercial de *Cedrela odorata* (cedro rojo) y otras especies forestales tropicales en el estado de Veracruz.

12

PROMOCIÓN DE PLANTACIONES DE RÁPIDO ESTABLECIMIENTO EN BOSQUES DE LADERA DE CALIFORNIA-OREGON

James L. Jenkinson

Introducción

Los valores económicos de los recursos genéticos

Conservación de recursos genéticos

Manejo y conservación forestal

PROMOCIÓN DE PLANTACIONES DE RÁPIDO ESTABLECIMIENTO EN BOSQUES DE LADERA DE CALIFORNIA-OREGON

James L. Jenkinson

Institute of Forest Genetics, Pacific Southwest Research Station, U.S.D.A. Forest Service,
P.O. Box 245, Berkeley, California 94701, E.U.A.

Acerca de la presentación

La presentación de esta ponencia se basa en la impresión de las transparencias que acompañan este documento y que se presentaron durante el desarrollo mismo del seminario. Estas muestran aspectos relevantes de mis experiencias durante 20 años acerca de los estudios de vivero y campo plantando material de alta calidad en los bosques de ladera del Norte de California y Oeste de Oregon.

Con base en todos estos estudios realizados y las experiencias obtenidas se definieron las ventanas (épocas) para siembra, para trasplante de plántulas, para fuentes de semillas (con respecto al almacenamiento en frío y plantación en primavera), y las ventanas (épocas) para plantación en campo. La extensa experiencia en campo ha demostrado que el éxito de las plantaciones está asegurado cuando estas ventanas se utilizan conjuntamente con métodos efectivos de preparación de sitio y una protección contra competencia de la vegetación arbustiva y herbácea y contra los daños por ramoneo de animales. El uso adecuado de las ventanas y de las guías de reforestación traerá como resultado el éxito en el establecimiento de la reforestación, alta supervivencia y rápido crecimiento, durante los dos años siguientes al establecimiento de la plantación.

Cinco factores confluyen en el éxito de la plantación: 1) una preparación eficiente del sitio; 2) la elección correcta de la especie y fuente de la semilla; 3) regímenes confiables de cultivo de las plántulas en vivero -regímenes que utilizan el concepto de ventanas de siembra, de trasplante y fuentes de semilla para proveer de material de plantación con alto potencial de supervivencia; 4) elección correcta de épocas de plantación -ventanas de acuerdo con el sitio de plantación en campo, con las condiciones de suelo y con los métodos de plantación; y 5) la inmediata protección del material plantado. La responsabilidad del viverista descansa en el factor 3. En cada sistema de reforestación, la misión del vivero es producir eficientemente y en las cantidades debidamente programadas en el tiempo, de plántulas que puedan sobrevivir y desarrollarse en campo.

Considerando el sitio donde estamos plantando, los programas de ensayos de evaluación de plántulas, que directamente involucran a los viveros con las regiones a las que abastecen y sirven, son la manera más segura para alcanzar la misión del vivero y los objetivos de la reforestación. En el vivero de Humboldt, muy próximo a la costa norte de California, un programa integrado y con pruebas extensivas de vivero y campo, dio buenos resultados en forma consistente y de manera eficiente para definir regímenes de cultivo, y un buen estado sanitario del material de plantación con regímenes 1-0, 1-1, y 2-0 con altos potenciales de supervivencia. El programa de ensayos desarrolló simultáneamente conocimientos prácticos sobre: 1) las interacciones de la fuente de semilla con el ambiente del vivero, 2) la capacidad de crecimiento de las plántulas después del almacenamiento en frío, 3) la relación del porcentaje de supervivencia en campo durante el primer año con la capacidad de crecimiento de la raíz al tiempo de la plantación y, 4) la capacidad de crecimiento de la raíz crítica para la supervivencia en campo. Los aún limitados programas de ensayos en el vivero de Placerville en el oeste de la Sierra Nevada del Norte de California y el vivero de J. Herbert Stone en el valle del Río Rogue del sur de Oregon, determinaron las “ventanas” para las fuentes de semillas para estos viveros y para los usuarios de las mismas regiones.

Los resultados específicos del programa de ensayos en el vivero Humboldt se aplican directamente a este vivero y a sus regiones de servicio en la costa norte del estado de California y en la costa del estado de Oregon, las montañas Klamath, la Sierra Nevada y las cordilleras Cascade. De manera similar, los resultados específicos de los programas de los viveros de Placerville y Stone se aplican a aquellos viveros y a sus respectivas regiones de servicio en California y en la zona cercana a los límites entre Oregon y California. Los ensayos cooperativos y los conceptos biológicos de ventanas para la siembra de semillas, cosecha de plántulas y almacenamiento en frío, trasplante de plántulas y trabajos de plantación, tienen implicaciones universales, aplicándose a las actividades de manejo de viveros y programas de plantaciones en cada región forestal.

Diapositivas

La presentación realizada por medio de diapositivas compila la presentación misma. También se anexan las definiciones, cuadros de datos, gráficas y las conclusiones para su estudio y referencia (ver páginas 205-216). Estas se prepararon con el propósito de ser auto-descriptivas. La revisión de los elementos clave para el éxito de una plantación ilustra el concepto de “ventana”, y prueban la importancia de desarrollar programas específicos, puntualizando los resultados como guías operativas, y los beneficios en planes de regeneración artificial.

Referencias

El vivero de Humboldt ha desarrollado regímenes de cultivo para plántulas y sus regiones fisiográficas, zonas semilleras, y fuentes probadas de semilla para la región de California-Oregon, mismas que se presentan en un documento técnico descriptivo (Jenkinson *et al.* 1993). La presentación de estas diapositivas se deriva principalmente de dicho documento. Las referencias adicionales apoyan algunos ejemplos y los documentan.

Literatura citada

- Jenkinson, J.L. 1980. Improving plantation establishment by optimizing growth capacity and planting time of western yellow pines. U.S.D.A. Forest Service Research Paper PSW-154. Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Berkeley, California. 22 p.
- Jenkinson, J.L. 1984. Seed source lifting windows improve plantation establishment of Pacific Slope Douglas-fir. *In:* M.L. Duryea and G.N. Brown (eds.), Seedling physiology and reforestation success. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, London. pp: 115-141.
- Jenkinson, J.L. 1988. 1-0 Douglas-fir planting stock: nursery production, field survival, and growth. *In:* Comunicacoes 1º Congresso Florestal Nacional; December 2-6, 1986, Fundacao Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal. Sociedade Portuguesa de Ciências Florestais. pp: 24-29.
- Jenkinson, J.L. 1989. Artificial regeneration of forests, after harvest or wildfire. *In:* I. Romagosa, C. Royo, y J. Avila, (eds.), Las Bases de la Producción Vegetal; Octubre 7-9, 1986, Barcelona, España. Asociación de Ingenieros Agrónomos de Cataluña. pp: 97-110.
- Jenkinson, J.L. and A.H. McCain. 1993. Winter sowings produce 1-0 sugar pine planting stock in the Sierra Nevada. U.S.D.A. Forest Service Research Paper PSW-RP-219. Pacific Southwest Research Station, Albany, California. 10 p.
- Jenkinson, J.L. and J.A. Nelson. 1978. Seed source lifting windows for Douglas-fir in the Humboldt Nursery. *In:* R.W. Gustafson (compiler), Proceedings Western Forest Nursery Council and Intermountain Nurserymen's Association, Combined Nurserymen's Conference and Seed Processing Workshop; August 7-11, 1978, Eureka, California. pp: 77-95.
- Jenkinson, J.L. and J.A. Nelson. 1983. 1-0 Douglas fir: a bareroot planting option. *In:* Proceedings Western Nurserymen's Conference; August 10-12, 1982, Medford, Oregon. pp: 63-76.
- Jenkinson, J.L. and J.A. Nelson. 1985. Cold storage increases resistance to dehydration stress in Pacific Douglas-fir. *In:* Proceedings Western Forest Nursery Council and Intermountain Nurserymen's Association Combined Meeting; August 14-16, 1984, Coeur d'Alene, Idaho. General Technical Report INT-185. pp: 38-44.
- Jenkinson, J.L. and J.A. Nelson. 1986. Winter sowing for production of 1-0 Douglas fir planting stock. *In:* Proceedings Combined Western Forest Nursery Council and Intermountain Nursery Association Meeting; August 12-15, 1986, Tumwater, Washington. General Technical Report RM-137. pp: 35-50.
- Jenkinson, J.L., J.A. Nelson, and M.A. Huddleston. 1993. Improving planting stock quality - the Humboldt experience. U.S.D.A. Forest Service General Technical Report PSW-GTR-143. Pacific Southwest Research Station, Albany, California. 219 p.
- Nelson, J.A. and J.L. Jenkinson. 1992. Transplanting time controls the size and balance of 1-1 Douglas-

fir. Humboldt Nursery Diverse Species Culture Unit Report to U.S.D.A. Forest Service PSW-PNW Regions and U.S.D.I. Bureau of Land Management. 17 p.

Steinfeld, D.E. and J.L. Jenkinson. 1990. Seed source lifting windows at J. Herbert Stone Nursery, 1986-87 and 1987-88. J. Herbert Stone Nursery Administrative Studies Report to U.S.D.A. Forest Service PSW Regions and U.S.D.I. Bureau of Land Management. 9 p.

Stone, E.C. and J.L. Jenkinson. 1970. Influence of soil water on root growth capacity of ponderosa pine transplants. For. Sci. 16: 230-239.

Stone, E.C. and J.L. Jenkinson. 1971. Physiological grading of ponderosa pine nursery stock. J. For. 69: 31-33.

FAO-Comisión Forestal de América del Norte, XX Reunión del Grupo de estudio sobre Recursos Genéticos Forestales; 1995 Abril 11-13; Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México, México.



Promoción de Plantaciones de Rápido Establecimiento en Bosques de Ladera de California-Oregon.

James L. Jenkinson

Fisiólogo, Institute of Forest Genetics, Pacific Southwest Research Station
Forest Service, US Department of Agriculture, Albany y Placerville, California.

Las plantaciones se establecen a los dos años de plantadas cuando:

- ☐ **Limpiamos** el sitio de plantación de la vegetación competitiva y subsoleamos para asegurar que el agua esta disponible durante la sequía de verano.
- ☐ **Equipamos** especies para los sitios de plantación y utilizamos fuentes de semillas que se sabe son genéticamente adaptadas a esos sitios
- ☐ **Usamos** regímenes de cultivo y fuentes de semilla adecuadas y secuelas de frio y almacenamiento, que en forma consistente provean planta con alto potencial de supervivencia- alta capacidad radicular- en el periodo de plantación de primavera.
- ☐ Ha finalizando el **sellado** de las raíces para el caso de cepas profundas de plantación, usando el sitio esté a capacidad de campo durante la primavera que permita asimilación de agua y nueva elongación radicular
- ☐ Se verificó el **control** del plantas agresivas y ramoneo para los dos años después de plantadas, para asegurar un libre crecimientos de lo plantado y la rápida captura por la planta de los recursos del suelo

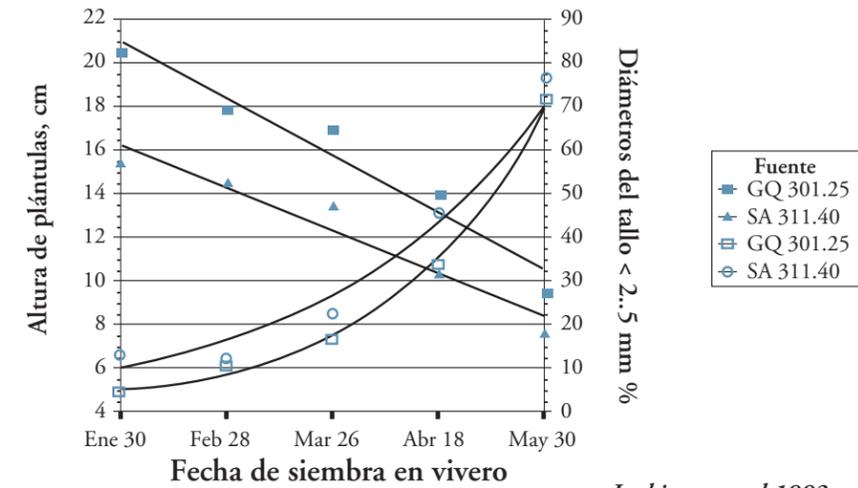
Ventanas para siembra en vivero, Ventana para le trasplante, Ventan para la extracción de la frente de semillas, y Ventana para la plantación en un campo son guías operativas probadas que, en su conjunto, promueven el rápido establecimiento de plantaciones:

- ▣ Ventanas para siempre en vivero son periodos calendarizados en la cual la siembra de semillas refrigeradas produce plántulas de buen tamaño, sanas para el primer año en regímenes de cultivo 1-0, 2-0, 1-1 ó plug. 1
- ▣ Ventana para el trasplante, son periodos calendarizados en los cuales la planta del vivero 1-0 a raíz desnuda o con algún contenedor produce 1-1 o contedor 1, planta de algún particular tamaño
- ▣ Ventana para la extracción de la fuente de semillas, son periodos calendarizados en los cuales las plántulas en los viveros estan seguras pera si almacenaje en frío (de 0-1 °C) para el periodo de plantación en primavera y en forma consistente aseguran una alta supervivencia en campo.
- ▣ Ventana para la plantación en campo, son períodos calendarizados de plantación de plántulas llevadas del vivero o almacenadas en frío y que resultan en alta supervivencia pára el primer año. La plantación se abastece de agua cuando la temperatura del suelo es mayor de 1 a 2 °C y hay elongación radicular después de una temperatura del suelo de 3°C (en asbestos) a 10°C (en pinos). Las ventanas de plantación se abren cuando el suelo a 8 c, se excede una temperatura diaria de 5°C a las 8:00 a.m.

La especie determina tanto el nivel de la temperatura del suelo para el inicio dela nueva elongación radicular y el nivel de sensibilidad para excesos en la manipulación para el Tipo 1-0, 2-0, 1-1, y Plug. -1 de la planta

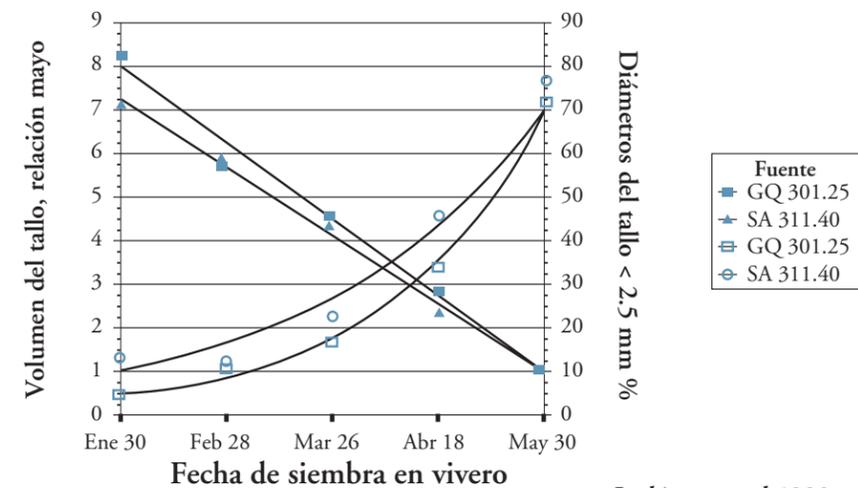
Bosques de ladera del Pacífico Coníferas	Inicio del crecimiento radicular	Sensibilidad para excesos en la manipulación
California red fir	3°	extremadamente alto
White fir	5°	muy alto
Douglas fir	8°	alto
Sugar pine	8°	alto
Ponderosa pine	8°	alto
Incense-cedar	10°	moderado a alto
Jeffrey pine	10°	moderado a alto
Lodgepole pine	10°	moderado

Ventanas de Siembra de enero 15 – marzo 20 producen plántulas de tamaño Tipo 1-0 para Douglas-fir para fuentes de Semilla de las Laderas del Pacifico en el vivero de Humboldt.



Jenkinson et al 1993

Ventanas de Siembra, de enero 15 – marzo 20 producen plántulas de tamaño, para el Tipo 1-0, para Douglas-fir para fuentes de semilla de las Laderas del Pacifico en el vivero de Humboldt.



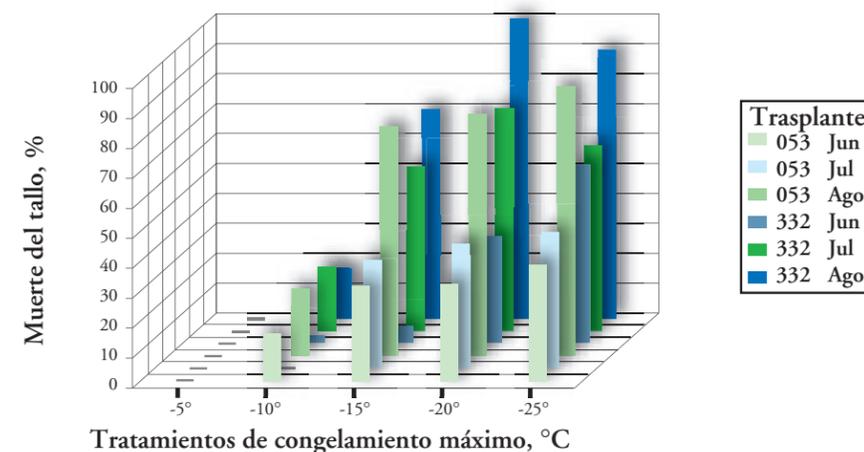
Jenkinson et al 1993

Ventanas para Trasplante, controla el tamaño, el balance y la condición de plantación de primavera Tipo 1-1 para Douglas-fir en el vivero de Humboldt.

- ▣ Seleccionando específicas fechas de trasplante en vivero para plántulas 1-0 en el periodo marzo-agosto, controla el tamaño y el balance de plantación 1-1 producida para las fuentes de semilla de laderas del pacífico en California – oregon.
- ▣ El trasplante en marzo, produce planta 1-1 que promedia 60 cm. En altura y 9mm de diámetro del tallo
- ▣ El trasplante en agosto produce planta 1-1 que promedia 28 cm en altura y 5 mm en diámetro del tallo.
- ▣ El trasplante posterior al periodo marzo-agosto reduce la proporción altura-raíz de la planta 1-1 de 2.1 a 1.4 (base peso seco)
- ▣ Los trasplantes del periodo marzo-julio producen planta 1-1 que esta conservada en frío y presenta una alta capacidad de crecimiento en altura y radicular después de su almacenamiento en frío a 0-1 °C

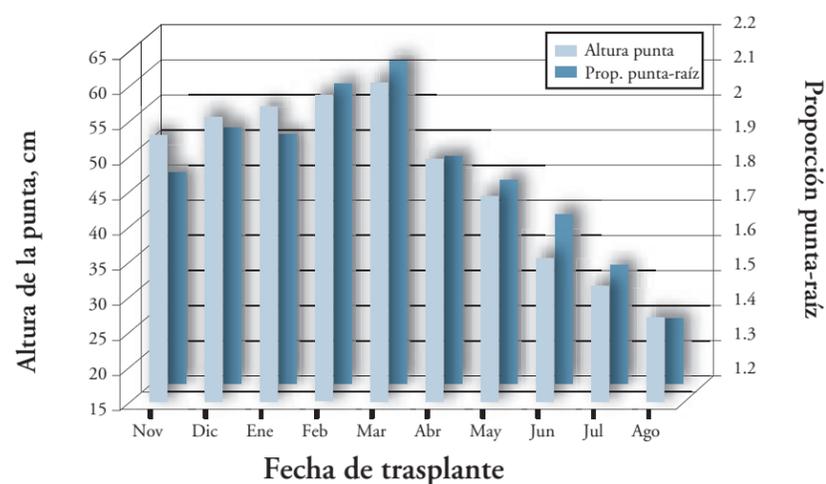
Nelson y Jenkinson 1992

Resistencia al congelamiento después de almacenamiento en frío a 1°C es a 10°C para las fuentes, de la costa de Oregon (053-Hebo) y las montañas de Kalamath (332-Weaverville). Tipo 1-1 para Douglas- fir para el vivero Humboldt



Nelson y Jenkinson 1992

Ventanas para Trasplante. Controlan el tamaño y el balance de las fuentes de semilla tipo 1-1 de las laderas del Pacífico para Douglas-fir en el vivero de Humboldt.



Nelson y Jenkinson 1992

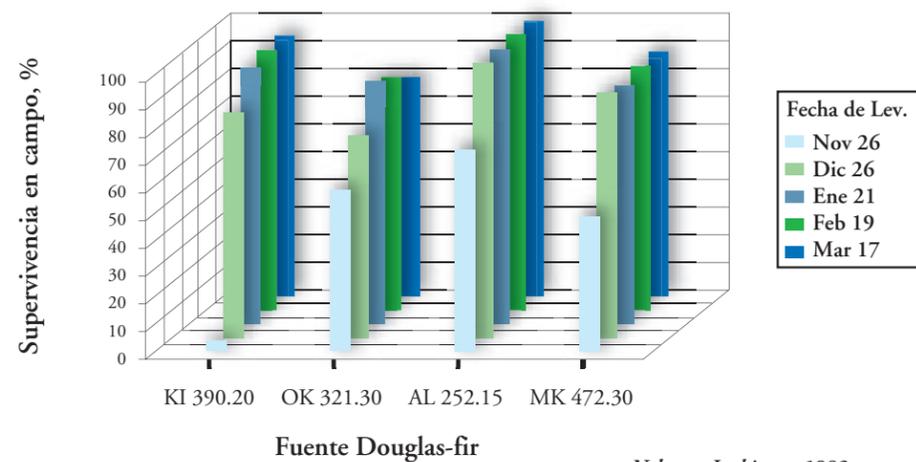
Ventanas para fuentes de semilla para levantamientos en vivero estan determinadas por pruebas de supervivencia en campo de planta que fue levantada en invierno, almacenadas a 0-1 °C y plantada en primavera en sitios limpios y para las zonas semillares de origen.

Ventanas para Fuentes de semilla de las fuentes para laevantamiento de las laderas de Pacifico Tipos 1-0, 2-0, 1-1, y plug. -1 para Douglas- fir en el vivero de Humboldt astan abiertas de poco menos de 2 meses (ventana tipo 5) a mas de 4 meses (ventana tipo 1)

Tipo de ventana	Fuente de semilla, tipo %	Abertura de ventana en días	Primera fecha segura de levantamiento	Primera fecha segura, utilizada; Marzo 5
1	28	114-127	Nov 7 - Nov 21	Nov 30
2	40	100-113	Nov 22 - Dic 21	Dic 10
3	20	< 100	Dic 7 - Dic 21	Dic 25
4	8	< 86	Dic 22 - Ene 5	Ene 10
5	4	< 72	Ene 6 - Ene 26	Feb 1

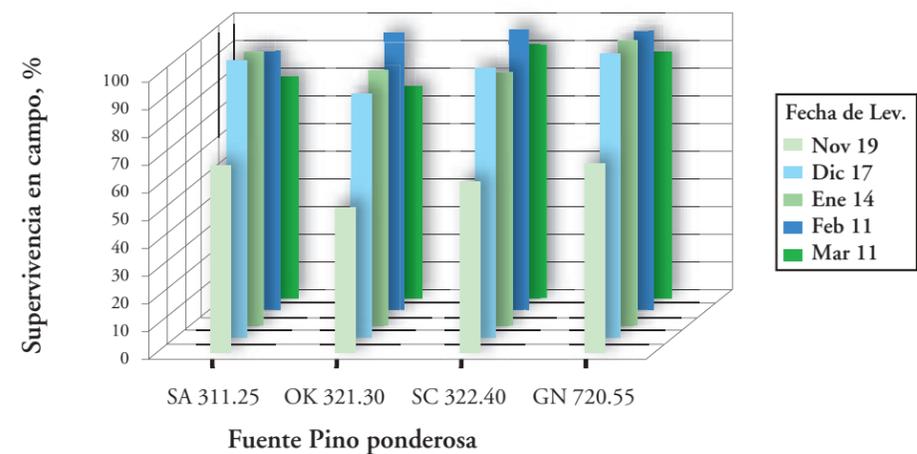
Jenkinson et al 1993

Ventanas para el levantamiento de las fuentes, para las áreas costeras y de tierras adentro de California (KI-OK) y oregon (AL-MK) para Douglas- fir del tipo 1-0 para el vivero de Humboldt, estan abiertas de 2 a 3 meses.



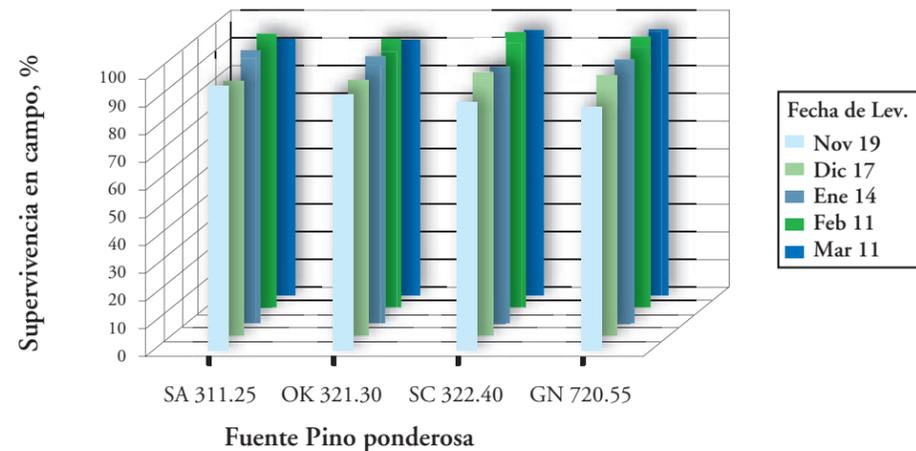
Nelson y Jenkinson 1983

Ventana para el levantamiento de las fuentes, para Klamath Mountains (SA, OK, SC) y Modoc Plateau (GN) del Tipo 1-0 para pino ponderosa en el Vivero de Placerville, están abiertas de 2 a 3 meses



Jenkinson 1986

Ventana para el levantamiento de las fuentes, para Klamath; Mountain (SA;OK;SC) y modoc Plateau (gn) del tipo 1-0 para pino ponderosa en el vivero J. Herbert Stone, estan abiertas de 3 a 4 meses.



Jenkinson 1986

Ventanas de plantación para sitios de las costas del norte de California y Oregon abiertas a finales del otoño, octubre 15 – noviembre 15, y cerradas a finales de la primavera, después de abril 20 para le tipo 2-0 en Douglas- fir para el vivero Humboldt.

Costa Norte fechas de plantación 518 m (1700 π)	Douglas-fir supervivencia, %	Costas de Oregon fechas de plantación, 686 m (2250 π)	Douglas-fir supervivencia, %
Oct 6 - 19	96	Oct 17	0
Nov 10 - 23	99	Nov 15	90
Dic 15 - 25	98	Dic 13	94
Ene 12 - 18	97	Ene 10	93
Feb 9 - 15	99	Feb 7	88
Mar 9 - 15	99	Mar 7	90
Abr 25 - May 1	98	Abr 23	92

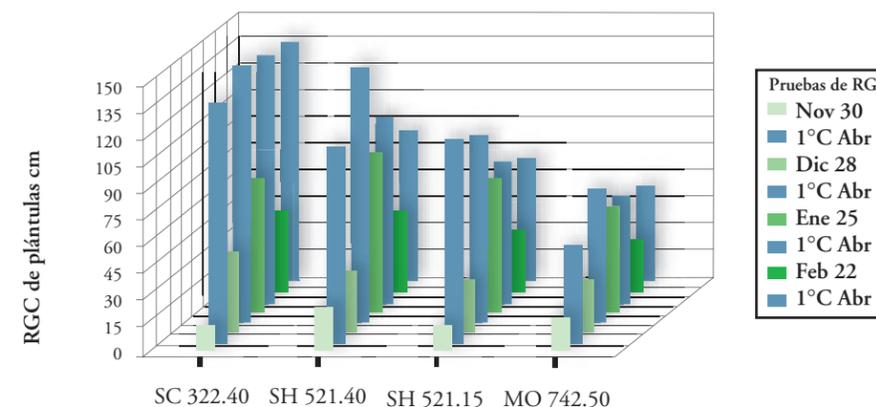
Jenkinson et al 1993

Ventana de plantación para sitios tierras adentro para la sierra Nevada, abiertas con el inicio de las condiciones de primavera y decrecen con la elevación del sitio arriba de los 900 m, para pino ponderosa y Jeffrey del tipo 1-0 del instituto de Genética Forestal y del vivero de Placerville

Sierra Nevada fechas de plantación 518 m (1700 ft)	Elevación del sitio de plantación (m, ft)		Supervivencia para pino Ponderosa, %	Supervivencia para pino Jeffrey, %
Nov 1 - 15	61	200	200	97
Mar 1 - 15	152	500	500	90
Feb 25 - Mar 30	579	1900	1900	99
Feb 20 - Mar 15	915	3000	3000	95
Mar 20 - Abr 5	1037	3400	3400	98
Abr 10 - 20	1372	4500	4500	99
May 15 - 20	2012	6600	6600	96

Jenkinson 1980

Almacenamiento en frío de 0 a -1° C para plantar en primavera (abr 18) incrementa la capacidad de Crecimiento Radicular (RGC) para las fuentes Tipo 1-0 de pino ponderosa en Klamath Mountains (SC), Cascado Range (SH), y Modoc Plateau (MO) probando el evantamiento de plántulas en el vivero de Placeville.



Fuentes de semillas de pino ponderosa

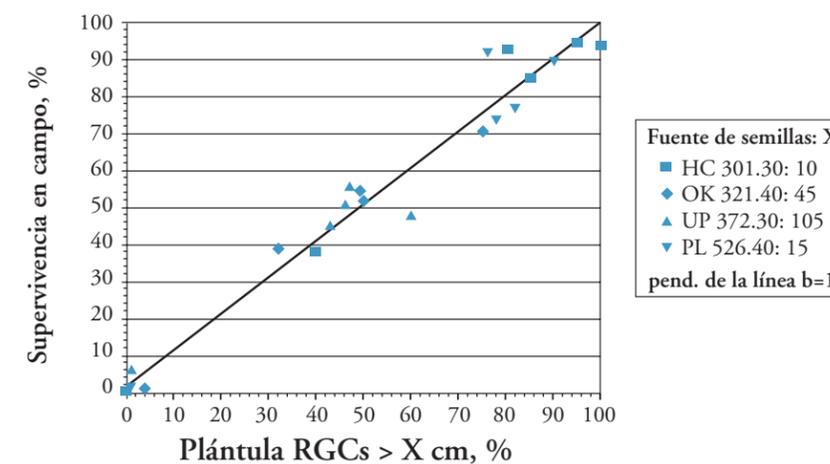
Jenkinson 1985

La capacidad de crecimiento de plántulas está estimada por medio de muestras plantadas en forma gradual a nivel de vivero, con ambiente controlado.

- ▣ Las plántulas son muestreadas en forma mensual durante la estación de invierno, levantadas en forma escalonada, con podas radiculares, y colocada para almacenamiento en frío de 0 a -1°C
- ▣ Las muestras de la planta existente es probada posterior al almacenaje es frío y se plantaran en primavera para determinar su potencial de supervivencia en campo(n=30). Las muestras son probadas justo después de levantarlas para asegurar los patrones estacionales del vivero.
- ▣ La raíz de las plántulas es mantenida en suelo húmedo a 20° C,y el crecimiento es medido a los 28 días (Douglas-fir, abetos verdaderos) ó 21 días (yellow pines)
- ▣ La capacidad de crecimiento de la punta (TGC), esta expresado como el porcentaje de plántulas que muestran brotes o crecimientos apicales con extensión> 1cm
- ▣ La capacidad de crecimiento radicular (RGC), esta expresado como longitud alcanzada o número de reices que desarrollan 1.5 cm. O más por plántula.
- ▣ La supervivencia en campo, refleja el porcentaje de planta probada después del almacenaje en frío- que presentó RGC> al crítico para el sitio de plantación

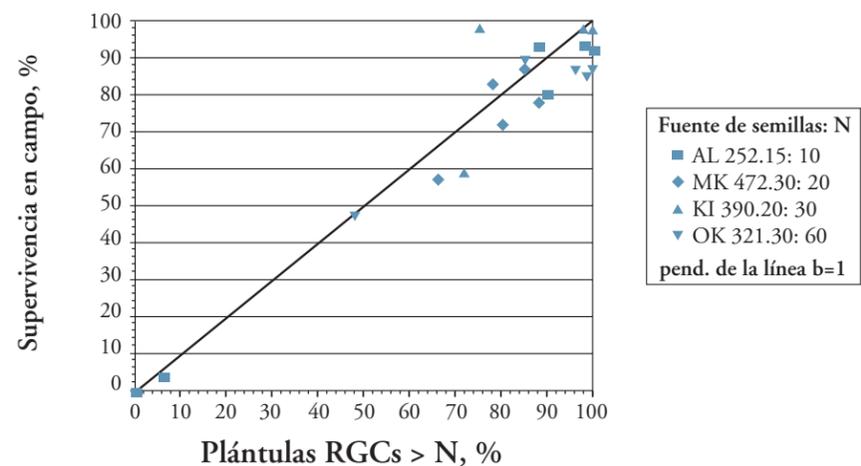
Jenkinson 1980; Jenkinson y Nelson 1978; Stone y Jenkinson 1970

Supervivencia del primer año en campo, este refleja el porcentaje del tipo 2-0 para Douglas-fir con RGC > al crítico, X (nuevo elongamiento radicular, cm) para el sitio de plantación.



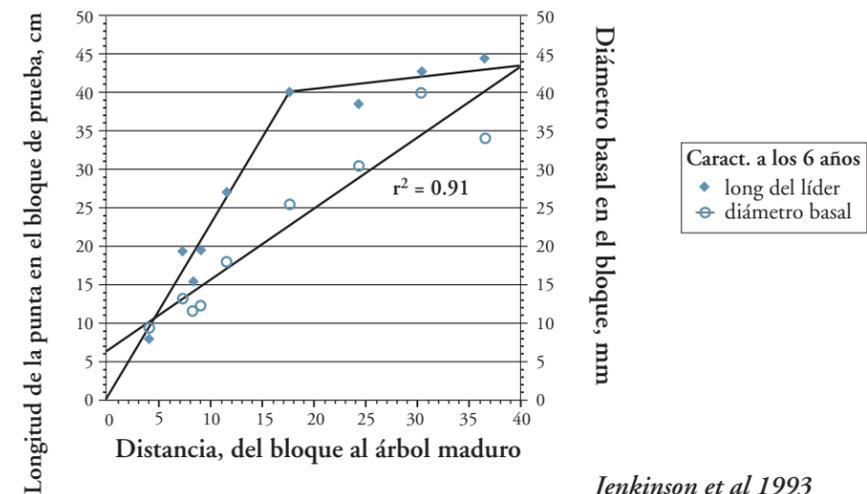
Jenkinson y Nelson 1978

Supervivencia del primer año, refleja el porcentaje de tipo 1-0 para Douglas-fir con RGC > al crítico, N (nuevas raíces > 1.5 cm), para el sitio de plantación.



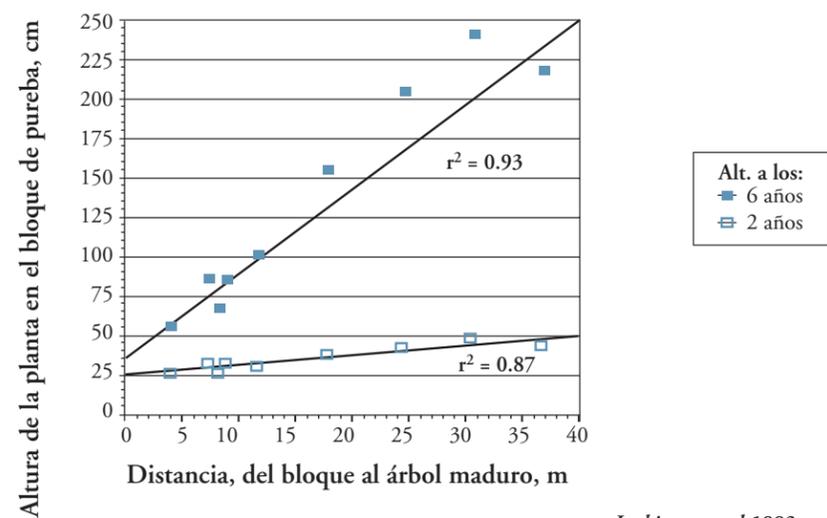
Jenkinson et al 1993

Competencia radicular: El crecimiento tipo 1.0 para Duoglas-fir (fuente KI 390.20) plantado en King Range, se incrementa con la distancia al fuste de árboles maduros



Jenkinson et al 1993

Competencia radicular: El crecimiento tipo 1-0 para Duoglas-fir (fuente KI 390.20) plantado en King Range, se incrementa con la distancia al fuste de árboles maduros.



Jenkinson et al 1993

Experiencias California-Oregon: Guías operativas y aplicaciones

- ☑ El concepto de Ventanas se aplica a la producción en viveros y al establecimiento de la planta en campo en programas de plantación en cada región forestal
- ☑ El conocimiento de la siembra, trasplante y ventanas para el levantamiento de la fuente de semilla, es aplicable a viveros con particulares ambientes, y para las conocidas ventanas para plantaciones en áreas costeras y de tierras adentro, para fías particulares regiones fisiográficas.
- ☑ Cada vivero en forma única combina el suelo, clima y fuentes de semilla y por lo tanto debe desarrollar su propio régimen de cultivo y determinar su propio periodo de calendarizado de ventanas para asegurara planta de alta calidad en su planta.
- ☑ Las pruebas en plántulas son esenciales para determinar sus ventanas como periodos calendarizados, para valorar cambios de las practicas tradicionales en los viveros y asegurar planta de alta calidad para particulares usuarios de la region.
- ☑ Donde los sistemas de reforestacion son adecuadamente manejados, la supervivencia de la plantación es a altas tasas (85-95%) con crecimiento rápido y una captura de los recursos del suelo dentro de los dos años de la plantación.

13

APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DEL CULTIVO IN VITRO EN LA PROPAGACIÓN DE ESPECIES FORESTALES

María E. Magallanes-Cedeño

Introducción

Propagación clonal

Micro-propagación: Cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos en la transformación genética de especies forestales

APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DEL CULTIVO IN VITRO EN LA PROPAGACIÓN DE ESPECIES FORESTALES

María E. Magallanes-Cedeño

Department of Forest Science, Texas A&M University,
College Station, Texas 77843-2135, E.U.A.

Introducción

La demanda mundial de productos forestales se incrementa día a día, ya sea por productos maderables, industria química y del papel, así como de necesidades de reforestación y la utilización potencial de derivados vegetales para la producción de energéticos. Ante este panorama de creciente demanda de productos comerciales, es necesario producir árboles que respondan a estas necesidades. Esto significa plantar árboles de ciclo corto, con madera de buena calidad, troncos uniformes, rápido crecimiento, etc., y por otro lado aplicar un sistema que permita la multiplicación masiva de individuos con características deseadas.

El mejoramiento genético de especies forestales no ha sido tan rápido como la genética de cultivos agrícolas. El largo período de crecimiento desde la siembra de la semilla hasta la floración es uno de los grandes obstáculos para el mejoramiento genético de manera tradicional, ya que significa un largo tiempo. Ante este panorama, los métodos de propagación vegetativa representan una posible solución a este tipo de problemas, incluso esta técnica de propagación se ha convertido en cierta forma en rutina para algunas especies de pinos tales como *P. taeda*, *P. virginiana*, *P. radiata*. (Aimers-Halliday, 1992)

Básicamente al hacer propagación vegetativa se está imitando un proceso que de manera natural ocurre en la naturaleza, con la diferencia que en el laboratorio es posible modificar y acelerar ese proceso, y nos estamos refiriendo precisamente al proceso de clonación.

La propagación vegetativa de especies forestales contribuye en gran medida a la domesticación y mejoramiento de especies. Algunos de los aspectos que apoyan esto son:

1. La propagación vegetativa tiene el potencial para incrementar el rendimiento de una generación durante un programa de mejoramiento.
2. Se pueden seleccionar y multiplicar caracteres derivados de genes con acción aditiva y no aditiva.
3. Los clones seleccionados se pueden mantener como bancos de germoplasma para posteriormente recombinarse mediante polinización controlada.
4. Los clones seleccionados se pueden emplear en plantaciones comerciales.
5. Los progenitores genéticamente uniformes se pueden multiplicar en gran escala.
6. El tiempo desde la siembra hasta el corte de los árboles se reduce con la propagación clonal. (Villalobos et al. 1983).

En producción forestal el objetivo principal es producir réplicas de individuos con características deseables.

Propagación clonal

La propagación clonal se puede realizar básicamente mediante dos técnicas: **macro-propagación** o **micro-propagación**. La propagación vegetativa mediante **macro-propagación** involucra el uso de métodos convencionales tales como injertos o enraizamiento de estacas, entre otros, mientras que la **micro-propagación** se lleva a cabo mediante el uso de técnicas del cultivo *in vitro*. Es mediante el empleo de estas técnicas que ha sido posible la producción masiva de clones en algunas especies forestales.

Los métodos tradicionales de macro-propagación son el enraizado de estacas y los injertos. En la mayoría de las especies forestales, sin embargo, el método tradicional de propagación vegetativa es el estacado. Una de las desventajas es que las estacas van perdiendo su capacidad para enraizar a medida que el árbol de origen es más viejo. Además se sabe que el comportamiento de las estacas tiene mucho que ver con la edad del árbol, su vigor, la posición en la planta y la estación del año en que se cortan.

Otra práctica usual en la propagación vegetativa consiste en seleccionar el árbol con mejores características y propagarlo mediante injertos. Los árboles sometidos a mejoramiento y pruebas de progenie han sido fuente de semilla; sin embargo, la descendencia no muestra las características favorables de los progenitores. Otra posibilidad ha sido la producción de híbridos interespecíficos, seguidos de una selección y clonación de los mejores individuos. El problema en este caso es que los métodos de hibridación son muy costosos y relativamente ineficientes.

Es importante mencionar que durante el transcurso de su desarrollo las especies arbóreas pasan por una sucesión de cambios morfológicos y fisiológicos que de alguna forma afectarán su crecimiento. Por ejemplo, generalmente los propágulos de regiones bajas y del centro del árbol poseen características más juveniles que las del resto del árbol y, por ende, esas regiones serían más susceptibles de ser propagadas vegetativamente.

Uno de los aspectos más importantes de la propagación vegetativa es que mediante el empleo de cualquiera de las técnicas se está utilizando como una herramienta muy importante en el proceso de mejoramiento genético de una especie. Es fácil comprender el interés en propagar clonalmente especies arbóreas, si se toma en cuenta lo largo que son los ciclos desde la siembra de la semilla hasta la floración. Más aún, estos largos períodos han hecho muy difícil la aplicación de la genética convencional en el mejoramiento de estas especies. Aunado a esto, en muchos casos es difícil la continuidad de proyectos a largo plazo.

Otra opción importante en la clonación de especies forestales y en otras especies perennes puede ser la floreciente biotecnología, que incluye el proceso del cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos, siendo la principal ventaja de la técnica de cultivo de tejidos en programas de mejoramiento y propagación masiva, la enorme y potencialmente ilimitada capacidad de multiplicación.

Micro-propagación: Cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos no es una técnica nueva. Desde la década del 40 se han hecho aportaciones sustanciales a los programas de mejoramiento de muchas especies hortícolas y agrícolas, pero no es así en el caso de especies forestales, aun cuando los primeros estudios sobre esta técnica se hicieron en especies de árboles. En 1960 el cultivo de tejidos de especies de coníferas se benefició con las investigaciones relacionadas con los requerimientos nutritivos de los tejidos *in vitro*. En la década del 70 ya se presentaban trabajos relacionados a la regeneración *in vitro* de diferentes gimnospermas (Villalobos et al. 1983).

A diferencia de las especies anuales y bianuales, las especies perennes han mostrado mayor grado de dificultad para su micro-propagación. Hoy en día aun cuando se han logrado algunos importantes adelantos, sobre todo en coníferas, en la mayoría de los casos se han empleado tejidos jóvenes como fuente de inóculo, ya que los tejidos y órganos maduros son poco sensibles a las condiciones *in vitro*.

Un principio básico en el cultivo *in vitro* de especies arbóreas es que mientras más joven es el tejido y se encuentre en crecimiento activo, mejores resultados se obtendrán en el proceso de diferenciación de órganos. En condiciones *in vitro* las células prácticamente son inducidas a condiciones meristemáticas.

La **micro-propagación** de especies de coníferas, especialmente el caso de pinos, se puede llevar a cabo mediante dos procesos principales que son:

1. Organogénesis.
2. Embriogénesis Somática.

Organogénesis

Mediante el proceso organogenético es posible diferenciar brotes y raíces adventicios, hasta formar una planta completa. La micro-propagación es influenciada grandemente por el genotipo, el estado fisiológico del explante, la planta donadora del explante, así como de las condiciones ambientales *in vitro* y los medios de cultivo.

Particularmente en coníferas, el método de propagación *in vitro* usado con más éxito ha sido la producción de brotes adventicios a partir de cotiledones de semillas en germinación; se reporta su uso en más de 25 especies de gimnospermas. Algunas de las especies en las que se reporta gran éxito en la propagación masiva con esta técnica son: *P. radiata* (Aitken et al. 1981), *P. taeda* (Mott y Amerson. 1981), *P. brutia* (Abdullah y Grace. 1987), *P. virginiana* (Chang et al. 1991), *P. eldarica* (Sen et al. 1993).

Selección y tratamiento del explante

Los tejidos jóvenes han mostrado mejores respuestas *in vitro* que los maduros; sin embargo los tejidos maduros tienen la ventaja de que ya han expresado su potencial genético, cosa que no ocurre en

los tejidos jóvenes. Con respecto a éstos, se han cultivado embriones, cotiledones, hipocótilos, epicótilos. En pinos los embriones o partes de ellos han sido una fuente importante de inóculo para la diferenciación de brotes adventicios. Estos tejidos son aparentemente una fuente ideal debido a que son meristemáticos por naturaleza y no requieren de una fase intermedia de callo para la producción múltiple de brotes. La frecuencia en el uso de embriones aislados no implica necesariamente que otras partes no puedan progresar *in vitro*.

La formación de plantas *in vitro* mediante organogénesis se puede dividir en cuatro etapas: 1) iniciación de yemas, 2) paso de yemas a brotes, 3) enraizamiento de los brotes y 4) trasplante al suelo (Villalobos *et al.* 1983).

Iniciación de yemas

Muchos son los avances que se han hecho en cuanto a los medios de cultivo utilizados para cada una de las etapas de la organogénesis en especies forestales. Diferentes formulaciones han sido utilizadas con éxito, tales como MS (Murashige y Skoog, 1962), (Shenk y Hildebrand, 1972), DCR (Gupta y Durzan, 1985). Generalmente, para la iniciación de yemas se utilizan medios de cultivo con alta concentración de elementos minerales, así como una elevada concentración de citocininas y un bajo nivel de auxinas. La adición de auxinas (ANA, AIB, AIA) en menor concentración ha mostrado un incremento en la respuesta de los explantes para la iniciación de brotes o yemas (Bonga, 1981; Gupta y Durzan, 1985).

Definitivamente, los reguladores del crecimiento son los factores que determinan el proceso organogenético, observándose que los brotes son inducidos en tejidos creciendo en un medio de cultivo con citocininas fundamentalmente, mientras que las raíces se desarrollarán básicamente en un medio conteniendo auxinas. Se sabe que la presencia de citocininas estimula un cambio en el programa de diferenciación, ya que cambian el plano de división celular y eso provoca la multiplicación celular en los tejidos del explante.

En cuanto al explante en coníferas, especialmente en pinos, se utilizan los cotiledones provenientes de semillas en proceso de germinación. Previo a la extracción de los embriones, las semillas se esterilizan superficialmente mediante la utilización de agentes desinfectantes como cloralex, alcohol, etc. Se cortan los cotiledones y se siembran en un medio de cultivo (iniciación) conteniendo citocininas tales como Bencil-Aminopurina (BAP) y Kinetina (Sen *et al.* 1994).

Paso de yemas a brotes y su alargamiento

La formación de brotes a partir de yemas requiere del trasplante a otro medio de cultivo con diferente equilibrio nutritivo u hormonal. En otros casos, cuando los brotes se han diferenciado, este trasplante permite su individualización, alargamiento y facilita el enraizado. Otra práctica común es la disminución en los reguladores del crecimiento y reducción en el nivel de sacarosa. También la adición de carbón activado ha demostrado tener efectos positivos en el alargamiento de los brotes, ya que se sabe que el efecto del carbón activado es el de absorber excesos de hormonas o sustancias inhibitorias (Rumery y Thorpe, 1984).

Enraizamiento de los brotes

En angiospermas arbóreas el enraizamiento de brotes cultivados *in vitro* ha demostrado ser

muy simple, mientras que en gimnospermas ha representado un gran problema. Algunas condiciones de cultivo que se han empleado para inducir la diferenciación del sistema radical *in vitro* son: reducción en la concentración de sales en el medio de cultivo, empleo de auxinas en combinación con citocininas; una vez que el primordio radical se ha diferenciado, el tejido se trasplanta a un medio sin reguladores del crecimiento para permitir el alargamiento de las raíces.

Trasplante al suelo

Con respecto al trasplante al suelo se mencionan algunos principios generales: Debe existir un equilibrio razonable entre tallo y raíz; transición gradual de humedad hasta condiciones de invernadero, se deben eliminar completamente los restos de agar del cultivo *in vitro*, ya que éste es un sustrato ideal para el crecimiento de microorganismos. Una buena medida de prevención es la utilización de fungicidas previa al trasplante al suelo.

Debido a que las plantas han sido producidas bajo un ambiente muy especial de alta humedad y baja iluminación, son bastante susceptibles a deshidratación una vez que abandonan el sistema *in vitro* en el cual han sido propagadas, por lo que es necesario períodos de ajuste gradual para aclimatar a las plantas en la transición de tubo de ensaye a invernadero.

Experimentos de campo

Hasta hace 10 años la evaluación de plantas producidas *in vitro* en el caso de coníferas era muy escasa. Aun cuando ya había muchos reportes de regeneración de plantas, los estudios de campo no se hacían o bien las plantas no se evaluaban por mucho tiempo. Por lo general se menciona que la supervivencia de las plantas cultivadas *in vitro* es bastante alta. La tasa de crecimiento tiende a ser baja al inicio, pero después de cierta etapa de establecimiento resulta comparable a las plántulas de semilla (Aimers-Halliday, 1992).

Se han observado diferencias morfológicas y fisiológicas entre plantas obtenidas *in vitro* y plantas derivadas de semilla, lo cual se sabe afecta el comportamiento de las mismas al llevarse a campo (McKeand, 1985). Las plantas obtenidas *in vitro* generalmente son susceptibles a secarse rápidamente, debido a las condiciones de alta humedad en las que crecen, por lo que es importante una etapa de aclimatación previa a la siembra en el campo.

Aplicaciones de la organogénesis

Definitivamente, la organogénesis, como método de propagación en gran escala, es el método preferido y más utilizado en muchas especies de árboles. Además, con los avances en el campo de la transferencia de genes y aspectos biotecnológicos, sin duda alguna esta forma de propagación provee un método ideal de propagación masiva de plantas transgénicas y conservación de germoplasma.

Embriogénesis somática

La micro-propagación mediante embriogénesis somática involucra el desarrollo de embriones a partir de células embriogénicamente competentes *in vitro*. En contraste con la organogénesis, la embriogénesis somática es un proceso de una sola etapa, ya que implica la formación del embrión

completo; esto es, el brote en un polo y la radícula en el otro, tal como ocurre en el embrión cigótico. Las células somáticas pueden ser inducidas *in vitro* hacia un proceso embriogénico por medio del cual se diferenciarán estructuras bipolares similares a los embriones cigóticos. El interés práctico de este método de propagación es que haciendo uso de genotipos deseables, éstos se pueden multiplicar casi ilimitadamente, con relativa facilidad y en forma sincrónica (Tautorus. 1991).

En especies arbóreas, especialmente en coníferas, las investigaciones sobre embriogénesis somática son muy escasas, en comparación con las que se han realizado sobre las especies herbáceas.

El proceso embriogénico implica el establecimiento de callos en división activa obtenidos de un inóculo deseable. El callo o el cultivo en suspensión pueden ser estimulados a formar embriones al manipular la relación auxinas-citocininas. (Tautorus. 1991). Aunque este método para lograr la diferenciación no se puede aplicar a todas las especies con igual éxito, se ha encontrado que si la concentración de auxinas es alta en fases iniciales y se elimina la auxina en la etapa de proliferación, se induce la diferenciación de embriones somáticos. Dado el creciente interés en el estudio de estos procesos en especies forestales, se ha observado un incremento en la información sobre embriogénesis somática en dichas especies, principalmente en especies de coníferas (von Arnold y Hakman. 1987).

El inóculo preferido para el proceso de iniciación en la mayoría de los casos es el embrión cigótico inmaduro, o bien el gametofito conteniendo al embrión cigótico que es colocado en un medio de cultivo (Tautorus. 1991; Newton *et al.* 1995).

Etapas en la embriogénesis somática.

Se distinguen 4 etapas que conducen a la formación de embriones somáticos que son: iniciación, proliferación, maduración, conversión (germinación), y se propone el siguiente sistema de clasificación de los embriones en las diferentes etapas de desarrollo:

Etapas: Etapa 1: embriones pequeños, transparentes, constituidos básicamente por la región de la cabeza y células suspensorias. Etapa 2: (globular) embriones prominentes, opacos. Etapa 3: (corona) embriones con cotiledones. Etapa 4: embriones con radícula (Newton *et al.* 1995).

Iniciación, proliferación y maduración

En la mayoría de los casos el proceso de iniciación de embriones somáticos no es un problema, aunque ciertos genotipos no responden al sistema *in vitro* para el proceso somático. Típicamente, la iniciación de cultivos embriogénicos se lleva a cabo mediante la utilización de un medio de cultivo con alta concentración de auxinas, particularmente 2,4-D; en contraste con el proceso de formación de brotes mediante organogénesis, la iniciación de embriogénesis es alta.

Una vez que el tejido embriogénico se ha iniciado, el cultivo requiere de la proliferación y mantenimiento de los pro-embryones, lo cual se lleva a cabo mediante el subcultivo a un medio en el cual la diferencia más significativa, en contraste con el utilizado para la iniciación, es el nivel o concentración de los reguladores del crecimiento.

Para la maduración de los embriones las condiciones son totalmente diferentes. La mayoría de los estudios indica que la presencia de ácido abscísico en el medio de cultivo juega un papel importante en la maduración de los embriones y conversión a planta (Durzan y Gupta. 1987; von Arnold y Hakman. 1988). Parece ser que uno de los efectos fisiológicos más importantes de la utilización de ABA en la

maduración de embriones somáticos es el incremento de lípidos y proteínas de reserva (Tautorus. 1991; Newton *et al.* 1995).

Aplicaciones de la embriogénesis somática

Para propósitos de propagación clonal en especies de coníferas, especialmente en pinos, el proceso de embriogénesis somática está aún en etapa de desarrollo, debido a ciertos factores tales como la dificultad en la iniciación de embriones somáticos en algunos genotipos así como los problemas en la maduración y conversión (germinación) de los embriones. Probablemente después de resolver o afinar estos problemas el proceso de embriogénesis somática podrá ser usado en propagación clonal en especies forestales (Newton *et al.* 1995).

Una de las aplicaciones más prometedoras de la embriogénesis somática, en particular en la propagación clonal de especies forestales, es el gran potencial para la producción eficiente y económica de un gran número de individuos a partir de genotipos deseables; esto debido a que el cultivo de embriones somáticos puede llevarse a cabo en medios líquidos, lo cual implica el posible desarrollo en gran escala de bio-reactores en los que se pueden producir grandes cantidades de embriones somáticos en una forma sincrónica y automatizada, los que más tarde pueden ser encapsulados para producir semillas artificiales, constituyendo éstas un sistema eficiente de producción de propágulos (Ahuja. 1993).

El cultivo de tejidos en la transformación genética de especies forestales

En las últimas dos décadas ha sido posible aislar, identificar y manipular genes específicos para modificar características de una variedad de organismos. Esta tecnología se ha aplicado ampliamente para el mejoramiento de muchas especies. Sin embargo, para el caso de especies forestales, en particular coníferas, el desarrollo en esta área es aún limitado. Lo anterior se debe a la dificultad de establecer un método eficiente para la regeneración *in vitro* de estas especies, aunado a su lento crecimiento. A pesar de ello, a partir de 1987 se observan grandes avances en esta área, lo cual anticipa el mejoramiento de especies forestales mediante ingeniería genética (Sederoff. 1993).

La capacidad para regenerar plantas *in vitro* no sólo ha sido estudiada por los investigadores en el área de la propagación vegetativa o cultivo *in vitro*, sino que ha posibilitado el desarrollo de uno de los pilares básicos de la genética molecular de plantas: la obtención de plantas transgénicas, ya que combinando las técnicas de regeneración con las de ingeniería genética es posible introducir un gen o un grupo de genes naturales o modificados artificialmente en células de muchas especies, entre ellas coníferas. Se pueden integrar de un modo estable en el genoma, confiriéndole un fenotipo y características deseables (Fenoll *et al.* 1994).

Una vez que la tecnología para la regeneración de plantas a partir de cultivo de tejidos, ya sea mediante organogénesis o embriogénesis somática, se ha establecido, surge la necesidad de integrar este proceso al mejoramiento genético de especies. Por lo que la regeneración *in vitro* de plantas mediante el empleo de cultivo de tejidos es un requisito para la ingeniería genética de las mismas, ya que en el cultivo *in vitro* cada célula se convierte en un individuo experimental que puede ser manipulado y analizado de manera semejante a un microorganismo, aunque con gran complejidad genética, funcional y estructural. Es posible mediante el empleo de técnicas modernas ocasionar mutaciones, transformar o fusionar

cualquier tipo de células, tejidos o plantas para después seleccionar aquellas que posean las características deseadas y regenerar de ellas plantas nuevas.

En ingeniería genética de plantas se ha utilizado una variedad de métodos para la transferencia de genes extraños a la planta. Hasta la fecha dos de los métodos preferidos en especies forestales son: transformación mediante *Agrobacterium* y transformación mediante el método bio-balístico o bombardeo de microproyectiles (Ahuja. 1993). Sin duda alguna que el empleo de estas técnicas en especies forestales, aunado a los métodos tradicionales de fitomejoramiento, representan un instrumento valioso para el mejoramiento genético de estas especies.

Literatura citada

- Abdullah, A.A., J. Grace and M.M. Yeoman. 1985. *In vitro* adventitious shoot formation from embryonic and cotyledonary tissues of *Pinus brutia* Ten. Plant Cell, Organ and Tissue Culture 5: 35-44.
- Ahuja, M.R. 1993. Biotechnology and clonal forestry. In: M.R. Ahuja and W.J. Libby (eds.), Clonal forestry I, Genetics and biotechnology. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. pp: 135-144.
- Aimers-Halliday, J. 1992. Clonal propagation and genetic testing of Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). Ph.D. dissertation. Texas A&M University, College Station, Texas. 124 p.
- Aitken J., K.J. Horgan, and T.A. Thorpe. 1981 The influence of explant selection on the shoot-forming capacity of juvenile tissue of *Pinus radiata*. Can. J. For. Res. 11: 112-117.
- Bonga, J.M. 1981. Organogenesis *in vitro* of tissues from mature conifers. *In Vitro* 17: 1511-1518.
- Chang, S., S. Sen, C. McKinley, J. Aimers-Halliday, and R.J. Newton. 1991. Clonal propagation of Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.) by organogenesis. Plant Cell Reports 10: 131-134.
- Fenoll, C., S. Sanz-Alferez, y F. Del-Campo. 1994. Genética molecular de plantas. In: J. Azcon-Bieto y M. Talon (eds.), Fisiología y bioquímica vegetal. Editorial Interamericana, McGraw-Hill. Madrid, España. pp: 493-519.
- Gupta, P.K. and D.J. Durzan. 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Reports 4: 177-179.
- McKeand, S.E. 1985. Expression of mature characteristics by tissue culture plantlets derived from embryos of loblolly pine. J. Am. Soc. Hort. Sci. 110: 619-623.
- Mott, R.L. and H.V. Amerson. 1981. A tissue culture process for the clonal propagation of loblolly pine plantlets. Technical Bulletin No. 271, North Carolina Agriculture Research Service, Raleigh, North Carolina. 14 p.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Newton, R.J., K.A. Marek-Swize, M.E. Magallanes-Cedeno, N. Dong, S. Sen, and S.M. Jain. 1995. Somatic embryogenesis in slash pine (*Pinus elliottii* Englem.). In: S.M. Jain, P.K. Gupta, and R.J. Newton (eds.), Somatic embryogenesis in woody plants. Volume III. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp: 183-195.
- Rumery, C. and T.A. Thorpe. 1986. Plantlet regeneration in black and white spruce. Can. J. For. Res. 16: 10-16.
- Sederoff, R.R. and A.M. Stomp. 1993. DNA Transfer in conifers. In: M.R. Ahuja and W.J. Libby (eds.), Clonal forestry I, Genetics and biotechnology. Springer-Verlag, Berlin- Heidelberg, pp: 241-254.
- Sen, S., M.E. Magallanes-Cedeno, R.H. Kamps, C.R. McKinley, and R.J. Newton. 1994. *In vitro* micropropagation of Afghan pine. Can. J. For. Res. 24: 1248-1252.
- Sen, S., J. Aimers-Halliday, C.R. McKinley, and R.J. Newton. 1993. Micropropagation of conifers by organogenesis. Plant Physiol. 12: 129-135.
- Shenk, R.V. and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50: 199-204.
- Tautorus, T.E., L.C. Fowke and D.I. Dunstan. 1991. Somatic embryogenesis in conifers. Can. J. Bot. 69: 1873-1899.
- Villalobos A., V.M., T.A. Thorpe and E.C. Yeung. 1983. El papel del cultivo de tejidos en especies forestales. Ciencia y Desarrollo 51: 43-59.
- Von Arnold S. and I. Hakman. 1988. Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA). J. Plant Physiol. 132: 164-169.

