Comunicación corta. Inducción floral mediante aplicación de GA_{4/7} y fertilización mineral en el huerto semillero de *Pinus radiata* D. Don de Sergude (Galicia)

V. Codesido* y E. Merlo

Departamento de Producción Forestal. CINAM-Lourizán. Apdo. Correos 127. E-36080 Pontevedra. Spain

Resumen

La aplicación de giberelinas GA_{4/7} resultó ser un método eficaz para regular la floración femenina en un huerto semillero clonal de tres años de edad de *Pinus radiata* en el norte de España. Se seleccionaron cuatro clones: uno de baja, uno de media y dos de alta floración, según el conteo floral realizado en el año en curso (2000). Las giberelinas se aplicaron en Julio y Agosto de 2000 mediante inyección en el tronco de una solución de GA_{4/7} disuelta en etanol. No se observaron diferencias en la efectividad de la aplicación en las dos fechas. Se obtuvo un incremento en el número medio de estróbilos femeninos, mayor en el clon de baja floración, y se produjo una significativa disminución en el porcentaje de semillas vanas de la siguiente cosecha en los clones de floración baja e intermedia.

Se dividió la superficie del huerto en tres bloques de acuerdo con la pendiente del mismo y se fertilizó con NPK 15-5-20 en tres fechas (mayo, junio y julio de 2000) para incrementar la floración masculina del huerto semillero. La aplicación del fertilizante, independientemente de la fecha de aplicación, triplicó el número medio de estróbilos masculinos, sin tener efecto alguno sobre los femeninos.

Palabras clave: inducción floral, diferenciación sexual, semillas vanas.

Abstract

Short communication. Flowering induction by GA_{4/7} application and mineral fertilization in a *Pinus radiata* D. Don seed orchard in Sergude (Galicia)

Application of gibberellins GA_{4/7} was an efficient method of promoting female strobilus production in a three year old clonal radiata pine seed orchard in northern Spain. Four clones were selected including one poor flowering clone, one intermediate flowering clone and two good flowering clones, according to this annual flower account (2000). The gibberellins were applied in July and in August (2000) by stem injection of an ethanolic solution of GA_{4/7}. There were no differences in the effectiveness of application on the different dates. Gibberellins produced an increase in the mean number of female cones, that was more effective in poor flowering clones, and a significant decrease in the percentage of empty seeds in poor and intermediate flowering clones in the next harvests.

The seed orchard was divided into three zones according to the slope, and was fertilized with NPK 15-5-20 at one of three times (May, June or July 2000) for promoting male flowering in the seed orchard. Regardless of time of application, fertilization resulted in a 3-fold increase in the mean number of male cones produced, without female production effect.

Key words: flowering induction, sex differentiation, empty seeds.

El pino radiata es una de las especies forestales introducidas más importante económicamente en Galicia. A la vista de la constante demanda de semilla mejorada por viveristas y propietarios forestales, se decidió iniciar un programa de mejora genética de la especie en dicha Comunidad Autónoma. La selección

inicial de 58 árboles superiores en masas adultas gallegas se llevó a cabo en 1992. De estos árboles se recogieron púas para instalar un huerto semillero clonal en Sergude (Galicia, 42°49'N, 8°27'W, 270 m de altitud sobre el nivel del mar) en 1997 (Codesido y Merlo, 2001). Se llevó a cabo un exhaustivo estudio de la fenología de floración en el huerto, concluyendo que éste se encontraba cerca del equilibrio pancmítico (Codesido *et al.*, 2005). Sin embargo, en huertos semille-

* Autor para la correspondencia: vcodesido.cifal@siam-cma.org
Recibido: 11-11-05; Aceptado: 27-07-07.

ros de corta edad, el alejamiento de la producción con respecto a un huerto ideal puede deberse a varios factores siendo el número de estróbilos masculinos y femeninos por clon (Eriksson *et al.*, 1973), la contaminación polínica y el número de abortos florales (Di-Giovani y Kevan, 1991) algunos de los principales causantes de dicha desviación. Una vez conocido el patrón fenológico y la participación clonal en la producción de estróbilos del huerto semillero (Codesido *et al.*, 2005), se puede modificar su producción utilizando distintos tratamientos.

Desde que Kato *et al.* (1958) demostraron que la aplicación de GA_{4/7} inducía la floración en miembros de la familia *Taxodiaceae*, ha sido ampliamente demostrado que la aplicación de giberelinas A_{4/7} durante el período de diferenciación de estróbilos femeninos (julio-agosto), aumenta su número (Bonnet-Masimbert, 1987; Siregar y Sweet, 1996) y reduce el número de abortos florales (Chalupka, 1991).

Por otra parte, la aplicación de fertilizantes nitrogenados en los meses de mayo-junio puede aumentar el número de estróbilos masculinos ya que estos son los meses de diferenciación de los mismos, favoreciendo una mayor emisión de polen que ayudará a disminuir el riesgo de contaminación polínica. Esto es debido a que se requiere una gran concentración de nutrientes para que se diferencien las yemas reproductivas (Pharis *et al.*, 1987). Los resultados referentes a la inducción floral mediante fertilización nitrogenada son muy variables aunque se concluye que con la fertilización se aumenta el número de árboles productores de flores y puede equilibrarse la estructura genética de la semilla producida, al lograrse mayores incrementos en los clones poco productores. Se ha demostrado además, que el efecto del fertilizante puede observarse incluso dos años después de la aplicación del tratamiento (Smith, 1987).

El objetivo principal de este trabajo fue comprobar la eficacia de distintas técnicas de inducción floral sobre un huerto semillero juvenil de pino radiata con el fin de incrementar la floración y llegar a obtener cosechas con participación más igualitaria de todos los clones del huerto.

Para ello se realizó un conteo del número de estróbilos femeninos y masculinos para cada clon en febrero del 2000 en el huerto semillero de Sergude con el fin de determinar su capacidad de floración. Se seleccionaron cuatro clones: un clon de baja floración (66010), un clon de floración media (66017) y dos clones de alta floración (66011 y 66039) para llevar a ca-

bo el estudio de inducción floral mediante aplicación de GA_{4/7}. Se eligieron tan sólo cuatro clones porque debido a la corta edad del huerto semillero, eran los únicos que cumplían los requisitos mínimos necesarios para la inyección de la hormona (al menos 5cm de diámetro del fuste a una altura de 40cm desde el suelo para asegurar que no se dañaría al árbol al realizar las perforaciones del fuste necesarias para la aplicación de la hormona). El experimento consistió en la comparación de dos fechas de aplicación de hormonas (julio y agosto de 2000) con controles en los que no se aplicaba GA_{4/7}. Cada clon estuvo representado por 9 ramets (3 por cada fecha de aplicación y 3 ramets control). Para la aplicación de giberelinas se utilizó GA_{4/7} disuelta en etanol puro en relación de 100mg/ml, inyectando una cantidad que variaba en función de la altura del árbol en relación 0,1 ml de la disolución por cada metro de altura del árbol. La aplicación de esta hormona se realizó por inyección mediante una aguja inserta en una jeringa de insulina de 1ml en el cambium a través de orificios realizados con taladro sobre el tronco a 20-30 cm de la base. Dependiendo de la dosis necesaria se realizaron 1, 2 o más orificios cruzados, con una inclinación de aproximadamente 45° hacia la base del tronco que fueron sellados con silicona tras la inyección de la hormona. A los árboles control, se le realizaron los orificios sobre el tronco y se les inyectó etanol sin giberelinas en razón de 0,1 ml por metro de altura del árbol. En febrero de 2001 se contabilizó el número de estróbilos femeninos por ramet y se calcularon sus medias, errores estándar y coeficientes de variación. Se analizó mediante ANOVA conjunto el efecto de la aplicación de giberelinas sobre los clones estudiados y el efecto de la interacción de dichos clones con los tratamientos aplicados. Se recolectaron piñas de cada ramet (10 piñas de cada uno de los clones inyectados con giberelinas y 10 piñas de cada clon control) que se secaron en estufa a 40°C durante 72 h para extraer las semillas. Se determinó el número de semillas por clon y tratamiento y se calculó el porcentaje de semillas vanas tras separar éstas previamente mediante dos métodos: la inexistencia de coloración en las semillas vanas y su flotabilidad (Silen, 1964). Se utilizó el test de la *t*-student para evaluar los efectos de la aplicación de GA_{4/7} en el porcentaje de semillas vanas.

Simultáneamente se puso en marcha un ensayo para inducir la floración mediante la aplicación de un fertilizante rico en N y K. Se dividió el huerto semillero en 3 grandes bloques de acuerdo con la pendiente. Ca-

da bloque se dividió a su vez en 4 sub-bloques contiguos cada uno de los cuales estaba formado por un número de árboles que variaba entre 12 y 18. Cada sub-bloque recibió uno de los cuatro tratamientos: T0, testigo; T1, fertilización en mayo de 2000; T2, fertilización en junio de 2000, y T3, fertilización en julio de 2000. El fertilizante elegido fue NPK 15-5-20 granulado de absorción rápida. La aplicación del fertilizante se realizó de manera individualizada mediante un aporcado alrededor de cada árbol, añadiendo 200 g de fertilizante por árbol y enterrándolo ligeramente, sin tener en cuenta el factor clon y excluyendo aquellos ramets que habían sido inyectados con giberelinas. En 2001 y 2002 se contabilizó el número de estróbilos masculinos por ramet. Se calcularon sus medias, errores estándar y coeficientes de variación y se aplicó un test de *t*-student para evaluar los efectos de la fertilización.

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de inducción floral mediante aplicación de giberelinas. El ANOVA mostró diferencias inter-clonales significativas antes y después de la aplicación del tratamiento (Tabla 2A). La diferencia clonal anterior al tratamiento (2000) nos indica que la diferenciación entre clones poco floríferos, intermedios y muy floríferos resultó adecuada. Además se obtuvieron diferencias significativas entre la aplicación (2001) y la

no aplicación (2000) de giberelinas, si bien se observó un mayor efecto en los clones menos floríferos (Tabla 1). Un caso extremo fueron los ramets del clon 66010 tratados en agosto de 2000 que no presentaba estróbilos femeninos en el conteo de ese año y que en el 2001, presentaron una media de 9,7 estróbilos. La aplicación de GA_{4/7} provocó un incremento en el número de estróbilos femeninos del 93,3% para el clon 66010, 50,73% para el clon 66017, 55,2% para el clon 66039 y un 51% para el clon 66011. La intensidad de respuesta al tratamiento fue inversamente proporcional al número de flores del clon, es decir, los clones poco floríferos tuvieron una respuesta mayor a la aplicación hormonal que los muy floríferos en concordancia con los resultados obtenidos previamente por otros autores (Luukkanen y Johansson, 1980; Harrison y Slee, 1991). Las diferencias clonales desaparecieron al segundo año posterior al tratamiento a pesar de que ya no se apreciaban efectos significativos de la aplicación de giberelinas, lo que induce a pensar que en el 2002, todos los clones aportaron un número similar de estróbilos femeninos. No aparecieron interacciones significativas, de manera que el momento de aplicación de la hormona aumentó la capacidad de floración en todos los clones tratados.

En la Tabla 2B se observa que la aplicación de giberelinas disminuyó respecto al control, la cantidad de

Tabla 1. Valores descriptivos del número de estróbilos femeninos contabilizados antes (2000) y después (2001) de la aplicación GA_{4/7} en julio y agosto de 2000. También se muestran los datos obtenidos para los controles

	Conteo 2000		Conteo 2001	
	$\bar{X} \pm e$	CV	$\bar{X} \pm e$	CV
<i>Aplicación GA_{4/7} julio</i>				
66010	0,67 ± 0,67	173,20	8,67 ± 3,18	63,50
66017	7,25 ± 0,95	26,11	18,00 ± 1,68	18,70
66011	9,67 ± 0,88	15,80	19,67 ± 5,84	51,40
66039	13,00 ± 1,35	20,83	29,00 ± 4,30	29,66
<i>Aplicación GA_{4/7} agosto</i>				
66010	0	0	9,67 ± 2,03	36,33
66017	6,00 ± 2,00	57,73	9,33 ± 2,18	40,56
66011	9,33 ± 1,33	24,74	22,00 ± 2,52	19,81
66039	8,67 ± 1,45	53,93	22,67 ± 1,85	14,18
<i>Plantas control</i>				
66010	1,75 ± 0,63	71,90	5,00 ± 0,82	32,66
66017	7,00 ± 2,00	40,41	9,00 ± 1,00	15,71
66011	13,33 ± 3,33	43,30	10,67 ± 0,88	14,32
66039	11,00 ± 1,53	24,05	12,67 ± 1,45	19,87

Tabla 2. Efecto de la aplicación de giberelinas sobre el número de estróbilos femeninos formados (A) y la disminución del porcentaje de semillas vanas (B)

A) Suma de cuadrados y su nivel de significancia obtenidos mediante ANOVA conjunto para el número de estróbilos femeninos contabilizados en distintas fechas

	Clon ¹	T ²	Clon × T ³	Error
2000	189,80***	35,97 ns	2,01 ns	6,95
2001	346,80***	287,13***	43,18 ns	25,41
2002	110,15 ns	142,53 ns	79,60 ns	87,65

*** Significativo al 1%. ** Significativo al 1%. * Significativo al 0,1%. ns: no significativo. T: tratamiento. ¹ Grados de libertad: 3. ² Grados de libertad: 2. ³ Grados de libertad: 6.

B) Porcentaje de semillas vanas en 2001, tras la aplicación de GA en 2000. Se muestran además los datos del control y el nivel de significancia de la aplicación de GA mediante t-student

% de semillas vanas	Control	GA _{4/7}
Clones	$\bar{X} \pm e$	$\bar{X} \pm e$
66010	14,2 ± 1,01	5,2 ± 0,47***
66017	13,3 ± 1,20	3,7 ± 0,26***
66011	4,5 ± 0,12	6,4 ± 0,27**
66039	3,6 ± 0,15	7,7 ± 0,25**

*** Significativo al 1%. ** Significativo al 1%.

semillas vanas obtenidas en la cosecha de 2001 para los clones de baja floración, mientras aumentó ligeramente el porcentaje de semillas vanas en los dos clones muy floríferos. Estos resultados fueron estadísticamente significativos y resultaron similares a los obtenidos por Koski (1971) en *Pinus sylvestris*.

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en respuesta a la fertilización durante los dos años siguientes a la aplicación. La fertilización provocó la diferenciación de mayor número de estróbilos masculinos, con diferencias significativas entre individuos fertilizados y no fertilizados, aunque no se obtuvieron

diferencias significativas entre fechas de aplicación del fertilizante (mayo, junio, julio) pero sí se observa una tendencia de disminución al retrasarse dicha fecha. No se obtuvo ningún efecto del fertilizante sobre la floración femenina, debido a las fechas de aplicación del mismo, ya que la diferenciación de los estróbilos femeninos es más tardía.

Los resultados del presente estudio sugieren el uso de GA_{4/7} en clones de pino radiata poco floríferos para aumentar su participación en la producción de semilla al inducir mayor número de estróbilos femeninos y disminuir la cantidad de semillas vanas. Se su-

Tabla 3. Valores descriptivos del número de estróbilos masculinos contabilizados antes (2000) y después (2001 y 2002) de la aplicación de NPK en mayo, junio y julio de 2000. También se muestran los datos obtenidos para los controles y el nivel de significancia de la aplicación de NPK mediante t-student

N.º de estróbilos masculinos	2000		2001		2002	
	$\bar{X} \pm e$	CV	$\bar{X} \pm e$	CV	$\bar{X} \pm e$	CV
T0	2,62 ± 0,12	142,46	7,00 ± 2,95 ns	219,35	27,99 ± 3,02 ns	174,24
T1	2,97 ± 0,63	123,89	20,39 ± 6,21***	194,95	19,21 ± 6,14 ns	172,18
T2	3,31 ± 0,48	91,00	19,35 ± 6,16***	208,95	26,19 ± 7,05**	149,91
T3	3,13 ± 0,50	108,09	16,03 ± 3,54***	118,88	30,92 ± 7,25**	148,35

*** Significativo al 1%. ** Significativo al 1%. * Significativo al 0,1%. ns: no significativo.

giere además el uso de una fertilización mineral al inicio del periodo vegetativo para incrementar la producción de polen en el huerto, ya que la disponibilidad de polen en la época de floración ha sido siempre considerada uno de los factores limitantes en huertos semilleros de corta edad.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado mediante el proyecto: INIA SC99-028. Queremos agradecer a los referees sus consejos y correcciones a este trabajo. Queremos agradecer especialmente a nuestros colegas Mariano Díaz Arnedo, Ricardo Ferradás Crespo, Enrique Diz Dios, María Soledad Barcala Iglesias, María Isabel Juncal Pintos, María Luisa Blanco Moledo y Pilar Soto Peleteiro por su trabajo y dedicación.

Referencias bibliográficas

- BONNET-MASIMBERT M., 1987. Floral induction in conifers: a review of available techniques. *For Ecol Man* 19, 135-146.
- CHALUPKA W., 1991. Usefulness of hormonal stimulation in the production of genetically improved seeds. *Silva Fenn* 25(4), 235-240.
- CODESIDO V., MERLO E., 2001. Caracterización fenológica del huerto semillero de *Pinus radiata* de Sergude. III Congreso Forestal Nacional. Granada, 25-28 septiembre 2001
- CODESIDO V., MERLO E., FERNÁNDEZ-LÓPEZ J., 2005. Clonal variation in the phenology of flowering in a *Pinus radiata* D. Don seed orchard in Northern Spain. *Silvae Gen* 54(4-5), 246-256.
- DI-GIOVANI F., KEVAN P.G., 1991. Factors affecting pollen dynamics and its importance to pollen contamination: a review. *Can J For Res* 21, 1150-1170.
- ERIKSSON G., JONSSON A., LINDGREN D., 1973. Flowering in a clone trial of *Picea abies* Karst. *Estudia Forest Suec* 110, 1-45.
- HARRISON D.L., SLEE M.U., 1991. Gibberellin A_{4/7} enhanced flowering in *Pinus caribea* var. *hondurensis*. *Can J For Res* (21), 788-793.
- KATO Y., FUKUHARA N., KOBAYASHI R., 1958. Stimulation of flower bud differentiation of conifers by gibberellin. *Trans 2nd Meeting of the Society for the Study of Gibberellins*, Tokyo, Kiowa HakkoKogyo, Tokyo. pp. 67-68.
- KOSKI V., 1971. Embryonic lethals of *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. *Commun Inst For Fenn* 75, 1-30.
- LUUKANNEN O., JOHANSSON S., 1980. Flower induction by exogenous plant hormones in Scots pine and Norway spruce grafts. *Silva Fenn* 14(1), 95-105.
- PHARIS R.P., WEBBER J.E., ROSS S.D., 1987. The promotion of flowering in forest trees by gibberellin A_{4/7} and cultural treatments: a review of the possible mechanisms. *For Ecol Man* 19, 65-84.
- SILEN R.R., 1964. A laboratory seed separator. *For Sci* 10, 222-223.
- SIREGAR I.Z., SWEET G.B., 1996. Optimal timing of gibberellin A_{4/7} application to increase female strobilus numbers in a *Pinus radiata* seed orchard. *N Z J For Sci* 26(3), 339-347.
- SMITH R.F., 1987. The effects of fertilization on flowering of various-sized Black spruce (*Picea mariana*) trees. *For Ecol Man* 19, 189.