

NOTA SOBRE EL EFECTO DE LA TEMPERATURA Y HUMEDAD EN LA GERMINACION *IN VITRO* DEL GRANO DE POLEN EN QUERCUS ROTUNDIFOLIA LAM. Y Q. SUBER L.*

F.M. VAZQUEZ

M.A. SUAREZ

M.P. BASELGA

Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico
Finca "La Orden". Apdo. 22. 06080 Badajoz

RESUMEN

Se ha estudiado la relación que tiene la germinación del grano de polen con la humedad y temperatura, en dos especies de la familia Fagaceae: *Quercus rotundifolia* Lam. y *Q. suber* L. Los resultados obtenidos, en la población estudiada, permiten asegurar que es preciso una humedad del 100 p.100, para alcanzar valores de germinación por encima del 80 p.100 (*Q. rotundifolia* $r^2=0,95$, $p<0,001$ y *Q. suber* $r^2=0,90$, $p<0,001$). Los datos de temperatura sugieren que la germinación de los granos de polen se producen entre 23°C a 30°C en *Q. rotundifolia* y entre 28°C a 32°C en *Q. suber*.

PALABRAS CLAVE: Germinación

Humedad

Polen

Quercus

Temperatura

INTRODUCCION

En el género *Quercus* L. existen al menos dos especies (*Q. rotundifolia* Lam. y *Q. suber* L.) de gran importancia económica en el Sur de la península Ibérica por el aprovechamiento de sus semillas.

En el caso de los representantes del género *Quercus* L., la mayor o menor

* Este trabajo está contemplado dentro de los objetivos del proyecto de investigación INIA SC95-068.

Recibido: 20-9-95

Aceptado para su publicación: 29-11-96

producción de semillas en un ejemplar, depende del número de flores femeninas disponibles y de los factores dependientes de la polinización cruzada y fecundación del óvulo (Ducouso *et al.*, 1993); las condiciones climáticas y sanitarias posteriormente incidirán en la conservación, desarrollo y maduración (Rupérez, 1960; Vázquez *et al.*, 1990).

Los sucesos que se producen en la fase reproductora de estas especies se encuentran parcialmente estudiados: se conoce la morfología de los órganos florales (Kaul, 1985; etc...), las fechas de floración (Corti, 1959a, 1959b; Laguna, Curras, 1985), se ha relacionado algún parámetro climático con la fenología y la producción (Sharp, Chisma, 1961; Wolgast, Stout, 1977; Curras, Laguna, 1987-88; Elena-Rossello *et al.*, 1993; Oliveira *et al.*, 1994; Sork, Bramble, 1993; Koenig *et al.*, 1994) y finalmente se ha estudiado la relación entre contaminación atmosférica y germinación del grano de polen (Bellani, Paoletti, 1992).

El objetivo del presente trabajo es abordar el estudio de las interacciones que tiene la humedad y la temperatura sobre el proceso de germinación de los granos de polen en las dos especies inicialmente comentadas, para una población conocida.

MATERIAL Y METODOS

El material de *Q. suber* y *Q. rotundifolia* procede en todos los casos del Valle de Matamoras (UTM-29SQC94, Badajoz). Concretamente se han recolectado amentos masculinos en un total de 35 árboles en floración; en cada árbol se han recogido una media de $244 \pm 26,2$ amentos que aún no se habían desprendido de los granos de polen. Todos los amentos se mezclaron y se procedió a tomar muestras individuales para su estudio; cada muestra contenía 20 flores con una media de $12,3 \pm 2,1$ anteras.

Test de viabilidad

Previo a los tratamientos de germinación se comprobaba el porcentaje de granos de polen fértiles (maduros), con posibilidades potenciales de germinar, a través del método de Azul de Lactofenol, modificado de Jones (1976); en el que se colocaba una muestra de cinco flores masculinas en una solución de Azul de Lactofenol al 20 p.100: los granos maduros se colorean homogéneamente de azul intenso, mientras que los inmaduros presentan un halo blanquecino más o menos contrastado, o no se colorean.

Medios utilizados en la germinación *in vitro*

Para la germinación de los granos de polen se han ensayado diferentes medios de cultivo: solución acuosa azucarada (Kearns, William, 1993); medio

Brewbaker-Majumder (Brewbaker, Majumder, 1961); medio Brewbaker-Kwack (Brewbaker, Kwack, 1963) y el medio de Holm para granos polínicos de *Betula* L. (Holm, 1994). De todos ellos el medio que mejor se ha adecuado a la germinación de los granos de polen de las dos especies seleccionadas ha sido el de Holm (1994), modificado.

El medio utilizado ha sido el siguiente: 15 p.100 de sacarosa; 250 ppm de ácido bórico (H_3BO_3); 300 ppm de nitrato cálcico tetrahidratado ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$); 150 ppm de sulfato magnésico pentahidratado ($MgSO_4 \cdot 5H_2O$) y 100 ppm de nitrato potásico (KNO_3), disueltos en 100 ml de H_2O desionizada y 7 g de gelatina.

Test de germinación

Los granos de polen en todos los casos se hidrataron durante 5 h a 24°C y posteriormente se montaron en el medio descrito anteriormente sobre portaobjetos. Los portaobjetos se colocaron en placas Petri de cristal en un Incubador Refrigerador «Hot-Cold», con un Humificador ultrasónico tipo «Trau» que permitía un ambiente controlado de humedad y temperatura durante 24 h. Posteriormente se procedió a contabilizar el número de granos de polen germinados con la técnica de contraste de fases, en microscopio óptico.

Los tratamientos de humedad realizados han sido: 10 p.100, 50 p.100, 75 p.100 y 100 p.100, a 28°C en *Q. suber* y a 25°C en *Q. rotundifolia*. Los tratamientos de temperatura efectuados en las dos especies han sido: 15°C, 17°C, 20°C, 22°C, 23°C, 25°C, 28°C, 30°C, 32°C y 35°C, en ambiente saturado de humedad (100 p.100).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las dos especies se analizaron estadísticamente: en primer lugar se calcularon las medidas de tendencia central y posteriormente se ajustaron los datos de los tratamientos de humedad a un modelo de tipo polinomial ($y = Ax^2 + Bx + C$; $p < 0,001$), tras un test de regresión con el programa Stat-View+Graphis, para Macintosh. En el mismo programa se efectuaron ANOVAs (LSD $p < 0,001$) para los datos obtenidos en tratamientos de temperatura.

RESULTADOS

Humedad

Las características que presentaban los granos de polen en cada una de las muestras utilizadas en los tratamientos de humedad han sido las siguientes:

TABLA 1

PORCENTAJES DE GRANOS VIABLES EN CADA UNA DE LAS MUESTRAS UTILIZADAS PARA LOS TRATAMIENTOS DE HUMEDAD

Percentage of the pollen grains viable, from the sample of the humidity treatments

Especie	Muestra	N.º granos	Viables	No viables	% viables
<i>Q. rotundifolia</i>	HR10	1.763	1.604	159	91,0
<i>Q. rotundifolia</i>	HR50	2.138	1.582	556	74,0
<i>Q. rotundifolia</i>	HR75	2.451	2.009	442	82,0
<i>Q. rotundifolia</i>	HR100	2.780	1.920	860	69,0
<i>Q. suber</i>	HS10	1.674	1.506	168	90,0
<i>Q. suber</i>	HS50	1.982	1.684	298	85,0
<i>Q. suber</i>	HS75	2.055	1.294	761	63,0
<i>Q. suber</i>	HS100	2.351	1.810	541	77,0

Tras la realización de los tratamientos con humedad se ha procedido al análisis de regresión, ajustando los datos a una curva de tipo polinomial, el resultado obtenido se puede observar en las Figuras 1 y 2. En las dos especies el comportamiento que tienen los granos de polen en la germinación *in vitro*, ante los distintos tratamientos de humedad es similar, se ajustan con un $r^2=0,95$ en *Q. rotundifolia* ($p<0,001$) y un $r^2=0,90$ en *Q. suber* ($p<0,001$) al modelo propuesto.

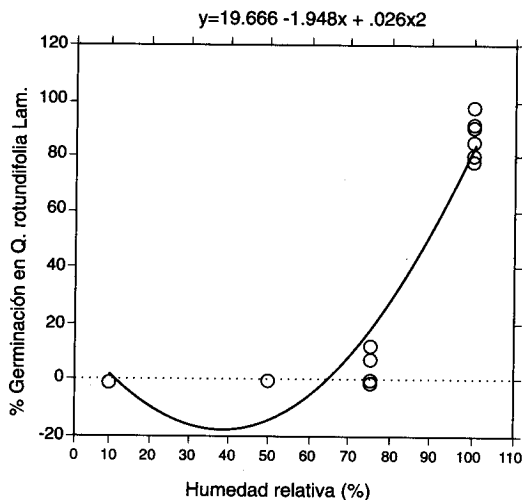


Fig. 1.- Curva de regresión para los datos de germinación "in vitro" de los granos de polen de *Q. rotundifolia* Lam. Tratamientos de humedad
*The regression curved, from data of germination "in vitro" in pollen grains of *Q. rotundifolia* Lam. Humidity treatments*

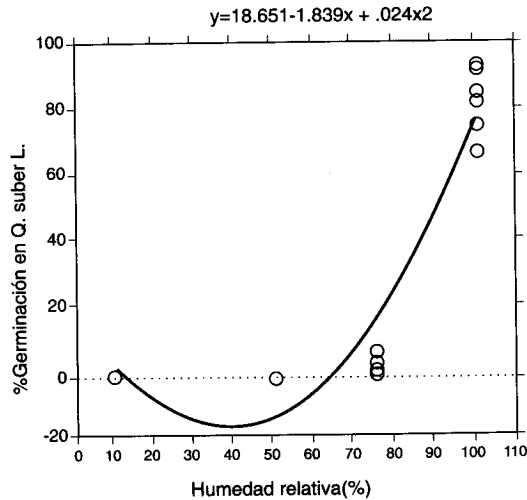


Fig. 2.- Curva de regresión para los datos de germinación "in vitro" de los granos de polen de *Q. suber* L. Tratamientos de humedad

The regression curved, from data of germination "in vitro" in pollen grains of *Q. suber* L. Humidity treatments

Temperatura

Las características que presentaban los granos de polen en cada una de las muestras utilizadas en los tratamientos de temperatura han sido las siguientes:

TABLA 2

PORCENTAJES DE GRANOS VIABLES EN CADA UNA DE LAS MUESTRAS UTILIZADAS PARA LOS TRATAMIENTOS DE TEMPERATURA

Percentage of pollen grains viable, from the sample of the temperature treatments

Especie	Muestra	N.º granos	Viabiles	No viabiles	% viabiles
<i>Q. rotundifolia</i>	HR20	1.427	813	614	57,0
<i>Q. rotundifolia</i>	HR22	1.729	1.244	485	72,0
<i>Q. rotundifolia</i>	HR23	2.179	1.481	698	68,0
<i>Q. rotundifolia</i>	HR25	1.882	1.280	602	68,0
<i>Q. rotundifolia</i>	HR28	1.850	1.425	424	77,0
<i>Q. rotundifolia</i>	HR30	2.132	1.834	298	86,0
<i>Q. rotundifolia</i>	HR32	2.230	1.806	424	81,0
<i>Q. rotundifolia</i>	HR35	2.541	2.084	457	82,0
<i>Q. suber</i>	HS20	2.043	1.164	879	57,0
<i>Q. suber</i>	HS22	1.561	967	594	62,0
<i>Q. suber</i>	HS23	2.311	1.459	852	63,0
<i>Q. suber</i>	HS25	1.876	1.182	694	63,0
<i>Q. suber</i>	HS28	1.715	1.303	412	76,0
<i>Q. suber</i>	HS30	2.218	2.018	200	91,0
<i>Q. suber</i>	HS32	2.141	1.756	385	82,0
<i>Q. suber</i>	HS35	2.713	2.306	407	85,0

Tras la realización de los tratamientos con temperatura se ha procedido al análisis estadístico de los datos que aparecen recogidos en la Tabla 3. En las dos especies el comportamiento que tienen los granos de polen en la germinación *in vitro*, ante los distintos tratamientos de temperatura es similar, existe un rango de temperaturas en el que se incrementa significativamente el porcentaje de germinación: en *Q. rotundifolia* está entre los 23°C a 30°C, mientras que en *Q. suber* entre los 28°C a 32°C. Existe un pico para las dos especies en el que se supera el 75 p.100 de germinación: en *Q. rotundifolia* se ha encontrado a los 25°C y en *Q. suber* a los 28°C.

TABLA 3

PORCENTAJES DE GERMINACION DE GRANOS DE POLEN EN *Q. SUBER* L. Y *Q. ROTUNDIFOLIA* LAM. PARA TRATAMIENTOS DE TEMPERATURA (ANOVA tipo LSD (P<0,001))

The germination percentage of pollen grains in Q. suber L. and Q. rotundifolia Lam. from the temperature treatments (ANOVA LSD type (p<0.001))

Temperatura	<i>Quercus rotundifolia</i>			<i>Quercus suber</i>		
	n	% Germinación	N.º granos	n	% Germinación	N.º granos
15°C	12	0,22±0,1 a	457±24	12	0,0±0,0 a	386±16
17°C	12	0,54±0,4 a	567±14	12	0,0±0,0 a	572±36
20°C	12	7,50±5,1 ab	621±54	12	0,0±0,0 a	492±72
22°C	12	8,03±6,5 ab	596±67	12	0,07±0,1 a	528±35
23°C	12	11,49±2,3 abc	376±32	12	0,43±0,4 a	511±23
25°C	12	81,92±15,6 d	451±38	12	1,76±1,1 a	471±18
28°C	9	24,50±8,5 bc	571±21	12	84,64±8,5 b	425±52
30°C	9	15,63±7,4 bc	384±59	9	27,85±9,3 c	317±62
32°C	9	0,08±0,1 a	326±28	9	7,20±5,7 a	375±30
35°C	9	0,04±0,0 a	317±25	9	2,52±2,7 a	347±22

n: número de muestras. N.º granos: media del número de granos en cada muestra

DISCUSION

Los resultados del tratamiento de humedad coinciden con las aportaciones de Heslop-Harrison (1978); Corbet, Plumridge (1985), Digonnet-Kerhoas, Gay (1990), que indican la necesidad de elevado contenido de humedad para la germinación de los granos de polen.

Con estos resultados en *Q. rotundifolia* y *Q. suber*, las condiciones óptimas para la germinación de los granos de polen «in vivo» se producirán probable-

mente en los días con fuerte humedad (días de lluvias, con vientos húmedos, a primeras horas de la mañana con rocío, etc.) por encima del 75 p.100.

Por otro, el estudio de la temperatura y su incidencia en la germinación de los granos de polen, está ampliamente documentada (Richards, 1986; Kearns, William, 1993). En la mayoría de los casos, para las especies de clima templado el rango de la temperatura óptima se encuentra entre 25°C y 30°C, que coincide con los resultados encontrados para *Q. rotundifolia* y *Q. suber*.

En el apartado de temperatura habría que hacer una reflexión adicional. En las dos especies existe un máximo de germinación, aunque en *Q. rotundifolia* se alcanza a menor temperatura (25°C v.gr.) que en *Q. suber* (28°C v.gr.). Este comportamiento se corresponde perfectamente con las características climáticas en las que se produce la floración de las dos especies: *Q. rotundifolia* florece entre los meses de febrero a abril, donde se encuentra con temperaturas máximas por debajo de los 30°C, y de media alrededor de los 22°C; y *Q. suber*, florece en los meses de abril a junio, con temperaturas máximas por debajo de los 37°C, y medias de alrededor de 27°C (Cabezas, Escudero, 1989).

CONCLUSIONES

Finalmente concluir que la germinación del grano de polen *in vitro* de las especies *Q. rotundifolia* y *Q. suber* y para la población estudiada, precisa de un ambiente saturado de humedad (100 p.100), para alcanzar niveles por encima del 80 p.100.

La temperatura es igualmente un factor limitante en la germinación *in vitro* de los granos de polen en las dos especies. Se puede concluir que el rango de temperatura a la que se produce germinación en la población estudiada varía de 23°C a 30°C en *Q. rotundifolia* y de 28°C a 32°C en *Q. suber*.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer a tres correctores anónimos las sugerencias y correcciones expresadas en el texto original que han enriquecido enormemente este trabajo.

SUMMARY

Relation of the germination pollen grains «in vitro» with the temperature and humidity, from two species Fagaceae (*Q. rotundifolia* Lam. and *Q. suber* L.)

This note study the relations between the germination of pollen grains and the temperature and humidity «in vitro», from two species of the family Fagaceae (*Quercus rotundifolia* Lam. and *Q. suber* L.), in a population known [Valle de Matamoras, Badajoz (Spain)]. The results suggestion from

the humidity treatments what is necessary a grade the humidity of the 100 p.100, in the two species, from percentage of germination in the pollen grains bigger of 80 p.100 (*Q. rotundifolia* $r^2=0.95$, $p<0.001$ and *Q. suber* $r^2=0.9$, $p<0.001$). In the temperatures treatments exist a range of temperatures from each species with percentages of germination in the pollen grains bigger of 1 p.100: in *Q. rotundifolia* is between 23°C and 30°C and *Q. suber* is between 28°C and 32°C. And exist a temperature optimum: in *Q. rotundifolia* 25°C (81 p.100 germination percentage) and *Q. suber* 28°C (84 p.100 germination percentage).

KEY WORDS: Germination
Humidity
Pollen grain
Quercus
Temperature

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BELLANI L.M., PAOLETTI E., 1992. New type of damage to *Quercus ilex*: pollen germination and hydration ability. *European Journal Forestry Pathology*, 22, 284-290.
- BREWBAKER J.L., KWACK B.H., 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube grown. *American Journal Botany*, 50(9), 747-858.
- BREWBAKER J.L., MAJUMDER S.K., 1961. Cultural studies of the pollen population effect and the self-incompatibility inhibition. *American Journal Botany*, 48, 457-464.
- CABEZAS J., ESCUDERO J.C., 1989. Estudio termométrico de la provincia de Badajoz. Ed. Direcc. Gral. Investigación y Extensión Agraria. Badajoz.
- CORBET S.A., PLUMRIDGE J.R., 1985. Hydrodynamics and the germination of soil-seed rape pollen. *Journal Agriculture Science (Cambridge)*, 104, 445-451.
- CORTI R., 1959a. Ricerche sul ciclo riproduttivo di species del genere *Quercus* delle flora italiana. II. Osservazioni su ciclo riproduttivo in *Quercus suber* L. *Annales Academia Italiana Sciences Forestaires*, 3, 55-143.
- CORTI R., 1959b. Ricerche sul ciclo riproduttivo di species del genere *Quercus* delle flora italiana. IV. Osservazioni su ciclo riproduttivo in *Quercus ilex* L. *Annales Academia Italiana Sciences Forestaires*, 8, 19-42.
- CURRAS R., LAGUNA E., 1987-88. Primeros resultados sobre variaciones del ambiente lumínico en el seno de varias comunidades vegetales levantinas. *Lazaroa*, 10, 127-152.
- DIGONNET-KERHOAS C., GAY G., 1990. Qualité du pollen: definition et estimation. *Bulletin Société Botanique France*, 137, 97-100.
- DUCCOUSSO A., MICHARD H., LUMARET R., 1993. Reproduction and gene flow in the genus *Quercus* L. *Annales Sciences Forestieres* 50 (Supp.), 91-106.
- ELENA-ROSSELLO J.A., DEL RIO J.M., GARCIA VALDECANTOS J.L., SANTAMARIA I.G., 1993. Ecological aspects of the floral phenology of the cork-oak (*Q. suber* L.): why do annual and biennial biotypes appear? *Annales Sciences Forestieres*, 50(Supp.), 114-121.
- HESLOP-HARRISON J., 1978. Genetics and physiology of angiosperm incompatibility systems. *Proceeding Royal Society London*, 202, 73-92.
- HOLM S.O., 1994. Pollination density-effects on pollen germination and pollen tube growth in *Betula pubescens* Ehrh. in northern Sweden. *New Phytologist*, 126, 541-547.
- JONES A.G., 1976. Environmental effects on the percentage of stainable and presumed normal pollen in *Aster* (Compositae). *American Journal Botany*, 63(5), 657-663.
- KAUL R.B., 1985. Reproductive morphology of *Quercus* (Fagaceae). *American Journal Botany*, 72(12), 1962-1977.
- KEARNS C.A., WILLIAM D., 1993. Techniques for pollination biologist. Univ. Press Colorado. Niwot, Colorado.
- KOENIG W.D., MUMME R.L., CARMEN W.J., STANBACK M.T., 1994. Acorn production by oaks in Central Coastal California: variation within and among years. *Ecology*, 75(1), 99-109.
- LAGUNA E., CURRAS R., 1985. Etude symphenologique d'une forêt thermique valencienne

- (Valencia, Espagne) á *Quercus rotundifolia* Lam. et *Fraxinus ornus* L. I. Floraison. *Stvdia Geobotanica*, 5, 111-126.
- OLIVEIRA G., CORREIA O., MARTINS-LOUÇAO M.A., CATARINO M., 1994. Phenological and growth patterns of the Mediterranean oak *Quercus suber* L. *Trees*, 9, 41-46.
- RICHARDS A.J., 1986. *Plant Breeding Systems*. ed. Unwin Hyman. London.
- RÚPEREZ A., 1060. Localización del huevo del *Balaninus elephas* Gyll. con relación al daño denominado «Melazo» de la bellota de encina (*Q. ilex* L.). *Boletín Servicio de Plagas Forestales*, 6, 133-145.
- SHARP W.M., CHISMAN H.H., 1961. Flowering and fruiting in the white oaks. I. Staminate flowering through pollen dispersal. *Ecology*, 42, 365-372.
- SORK V.L., BRAMBLE J.E., 1993. Prediction of acorn crops in three species of North American oaks: *Quercus alba*, *Q. rubra* and *Q. velutina*. *Annales Sciences Forestieres*, 50(1), 128-136.
- VAZQUEZ F.M., ESPARRAGO F., LOPEZ MARQUEZ J.A. et JARAQUEMADA F., 1990. Los ataques de *Curculio elephas* Gyll (*Balaninus elephas*) y *Carpocapsa* sp. L. sobre *Quercus rotundifolia* Lam. en Extremadura. *Boletín Sanidad Vegetal. Plagas*, 16, 755-759.
- WOLGAST L.J., STOUT B.B., 1977. The effects of relative humidity at the time of flowering on fruit set in bear oak (*Quercus ilicifolia*). *American Journal Botany*, 64(2), 159-160.