



Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
URUGUAY



**MANUAL DE RECOLECCIÓN,
MANEJO Y CONSERVACIÓN
DE POLEN DE ESPECIES
ARBÓREAS FORESTALES**

INTEGRACIÓN DE LA JUNTA DIRECTIVA

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA

Ing. Agr. José Bonica - Presidente

Ing. Agr. Walter Baethgen - Vicepresidente



Ministerio
**de Ganadería,
Agricultura y Pesca**

Ing. Agr. Rafael Secco

Ing. Agr. Martín Gortari



Ing. Agr. Alberto Bozzo

Ing. Agr. Alejandro Henry





Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
U R U G U A Y

Título: Manual de Recolección, Manejo y Conservación de Polen de Especies Arbóreas Forestales

e-ISBN: 978-9974-38-451-4

ISSN: 1510-7396

Impreso en Prontografía

MANUAL DE RECOLECCIÓN, MANEJO Y CONSERVACIÓN DE POLEN DE ESPECIES ARBÓREAS FORESTALES

Zohra Bennadji¹

Stefani Mello¹

Marcelo Alfonso¹

Pablo Nuñez¹

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. Introducción | 5 |
| 2. Conceptos generales sobre fenología, órganos de reproducción y polen de especies arbóreas forestales | 7 |
| 2.1. Fenología | 7 |
| 2.2. Floración | 7 |
| 2.2.1. Órganos de reproducción | 9 |
| 2.2.1.1. Órganos de reproducción masculinos | 9 |
| 2.2.1.2. Órganos de reproducción femeninos | 12 |
| 2.2.2. Fenofases | 13 |
| 2.2.3. Producción, liberación y dispersión de polen | 16 |
| 2.3. Principales características del polen | 16 |
| 2.3.1. Palinología | 16 |
| 2.3.2. Morfología y técnicas de observación | 16 |
| 2.3.3. Germinación | 22 |
| 3. Recolección y manejo de polen de especies arbóreas forestales | 23 |
| 3.1. Recolección de polen | 23 |
| 3.1.1. Logística | 23 |
| 3.1.2. Criterios para la recolección | 23 |
| 3.1.2.1. Fuentes | 23 |
| 3.1.2.2. Fechas | 24 |
| 3.1.2.3. Equipos y materiales | 24 |
| 4. Manejo y conservación de polen de especies arbóreas forestales | 27 |
| 4.1. Técnicas de manejo | 27 |
| 4.1.1. Importancia de la etapa de procesamiento | 27 |
| 4.1.2. Principales etapas del procesamiento | 27 |
| 4.1.2.1. Extracción y limpieza | 27 |
| 4.1.2.2. Secado | 29 |
| 4.1.2.3. Acondicionamiento e almacenamiento | 29 |
| 4.2. Técnicas de conservación | 30 |
| 4.2.1. Conservación en frío | 30 |
| 4.2.2. Ensayos de viabilidad de polen | 31 |
| 4.2.2.1. Protocolos de tinción | 32 |
| 4.2.2.2. Protocolos de germinación a escala de laboratorio | 32 |
| 4.3. Calidad de polen | 33 |
| 4.4. Bancos de germoplasma | 34 |
| 4.4.1. Tamaño y mantenimiento | 35 |
| 4.4.2. Documentación | 35 |
| 5. Bibliografía consultada | 36 |
| 6. Anexos | 37 |

1. Introducción

La recolección, el manejo y la conservación de polen de especies arbóreas forestales forman parte tradicionalmente de las actividades de los programas de mejoramiento genético de generaciones avanzadas. Configuran etapas estratégicas en el establecimiento y manejo de sus huertos semilleros y en la obtención de germoplasma mejorado, específicamente de híbridos. En Uruguay, la demanda de información sobre estas operaciones de manipulación de polen se incrementó a raíz de los avances registrados en los programas de mejoramiento genéticos de especies forestales exóticas, iniciados en la década de los noventas en instituciones públicas y privadas y del significativo incremento actual de plantaciones forestales clonales con híbridos en el país.

En términos biológicos, las repercusiones de buenas prácticas de recolección, manejo y conservación de polen son decisivas para: (i) su calidad como germoplasma, (ii) el éxito de las hibridaciones realizadas en huertos semilleros, (iii) la obtención de germoplasma mejorado, (iv) el diseño de las etapas posteriores de los programas de mejoramiento genético y, (v) el establecimiento de bancos de germoplasma de respaldo.

En términos de dinámica de poblaciones arbóreas forestales, estas temáticas han adquirido en los últimos años un mayor relieve debido a la problemática del cambio climático. Las amenazas de extinción de especies forestales, las restricciones en el abastecimiento en recursos genéticos y la consecuente reafirmación de la importancia de los bancos de germoplasma como medida de conservación representan algunos de los desafíos a enfrentar. En Uruguay, este interés se acrecentó también por la creación de la red nacional de áreas protegidas y por el surgimiento de temáticas relacionadas a la conservación de la biodiversidad y a eventuales especies arbóreas amenazadas en el país. A pesar de no integrar explícitamente el contenido de este manual, los aspectos relativos a la apicultura merecen también ser mencionados por su relación con la polinización de las especies arbóreas forestales.

En términos económicos, en comparación con las semillas forestales, el costo de las manipulaciones de polen es relativamente más alto por insumir más tiempo y exigir mano de obra especializada. Sin embargo, extrapolado al conjunto de la cadena de la madera, ese costo pierde relevancia y resulta poco significativo por su incidencia directa y por su considerable impacto en todos los eslabones.

De manera general, la información sobre recolección, manejo y conservación de polen de especies arbóreas forestales es escasa y dispersa. El objetivo de este manual apunta a una síntesis de la información disponible y a su centralización en un solo documento de fácil acceso y consulta para la adquisición de una visión general y actualizada sobre la temática. Esta información se compiló a partir de búsquedas bibliográficas y de observaciones y

experiencias propias generadas por más de dos décadas de domesticación y mejoramiento genético de especies arbórea exóticas y nativas en el área forestal del Instituto Nacional Investigación Agropecuaria (INIA).

Se pretende acercar respuestas a varios usuarios (productores, viveristas, empresas forestales, instituciones de investigación, instituciones educativas, y organizaciones no gubernamentales). Con relación a las instituciones educativas, la reciente creación de campus interinstitucionales y más concretamente de los centros universitarios asociados, ha generado demandas de material didáctico de fácil acceso y uso para docentes y estudiantes en diferentes temáticas forestales en general y en mejoramiento genético en particular.

Si bien el uso de polen en programas avanzados de mejoramiento genético de especies arbóreas forestales constituye el eje central de este manual, la mayoría de la información presentada es extrapolable a otros usos y campos de actividades, entre otras la apicultura y la salud pública. En apicultura, la melisopalinología se dedica al estudio y caracterización del polen presente en la miel. Es un importante instrumento de control para detectar mezclas y posibles fraudes y para la certificación. En salud pública, la aeropalinología consiste en analizar la presencia en el aire de diferentes tipos de polen para su aplicación en medicina (patologías relacionadas a alergias) y en mejoramiento genético de especies vegetales para la obtención de variedades ornamentales estériles. A su vez, la paleopalinología estudia el polen fósil y permite la generación de información sobre el clima (paleoclimatología), la vegetación y el paisaje de eras geológicas (paleobotánica y paleoecología).

El manual se divide en cinco partes dedicadas a: (i) conceptos generales sobre fenología, órganos de reproducción y características de polen de especies arbóreas forestales, (ii) recolección de polen, (iii) manejo y conservación de polen, (iv) bibliografía consultada y, (v) anexos. Se exponen ejemplos de Gimnospermas y Angiospermas, tanto de especies exóticas introducidas en Uruguay como de especies autóctonas.

2. Conceptos generales sobre fenología, órganos de reproducción y polen de especies arbóreas forestales

2.1. Fenología

La fenología estudia los fenómenos biológicos vegetales, caracterizados por ritmos periódicos (fenofases), como la brotación, la florescencia, la maduración de los frutos y la senescencia de las hojas. Abarca generalmente el ciclo biológico completo de una especie vegetal, desde su fase juvenil de crecimiento vegetativo hasta su fase adulta de reproducción, estudiando los cambios que suceden en los órganos vegetativos y reproductores. La fase adulta requiere específicamente la observación y el estudio de la biología de la reproducción, o sea, el estudio del conjunto de los procesos involucrados en la reproducción sexual.

La fenología de una especie depende de sus propias características biológicas y del dinamismo del efecto de los factores ambientales, en particular del clima (macro y microclima) y de su variabilidad. Estas consideraciones son extrapolables a escala de formación vegetal y obedecen a la naturaleza de sus componentes, a sus influencias recíprocas y al dinamismo de los factores ambientales.

En Uruguay, existe información sobre la fenología de algunas especies arbóreas nativas y exóticas. La mayoría corresponde a las especies exóticas de los géneros *Eucalyptus* (eucalipto) y *Pinus* (pino), más plantadas a nivel comercial y dotadas de los programas de mejoramiento genético más avanzados en el país. En casi la totalidad de las especies arbóreas nativas, la generación de conocimiento sobre su fenología y su biología de la reproducción es un requisito previo para estudios más acabados en recolección, manejo y conservación de polen y para posteriores aplicaciones prácticas para su conservación y domesticación.

2.2. Floración

La ocurrencia del primer año de floración es un dato fenológico importante. En las especies arbóreas forestales, el período juvenil se extiende sobre 3 a 40 años y es particularmente largo en comparación con las demás especies vegetales. Adicionalmente, la fecha anual de floración, la variación del intervalo que transcurre entre la floración, la maduración de los órganos de reproducción y la liberación de polen son otros datos fenológicos determinantes para las operaciones de su recolección, manejo y conservación. En esta etapa, el conocimiento de los agentes de dispersión del polen (viento, insectos, agua y gravedad) es definitivo. En la Tabla 1 se presenta una síntesis de las fechas de floración de algunas especies consideradas de mayor interés para la forestación a pequeña y gran escala en Uruguay, basada en observaciones propias.

Tabla 1: Fechas de floración de algunas especies arbóreas forestales en Uruguay

| Espece | Fecha de floración | Observación |
|--|---------------------|---|
| <i>Castanea sativa</i> (castaño) | Octubre - Diciembre | Extensión de hasta un mes por efecto del CC* |
| <i>Carya illinoensis</i> (pecan) | Octubre - Diciembre | Ídem |
| <i>Cupressus macrocra</i> (ciprés) | Abril-Agosto | Pico en agosto |
| <i>Eucalyptus grandis</i> (eucalipto grandis) | Enero - Mayo | Pico en marzo – abril Observación de floración todo el año |
| <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto globulus) | Julio - Setiembre | Floración todo el año |
| <i>Eucalyptus tereticornis</i> (eucalipto colorado) | Octubre - Febrero | Efecto del CC |
| <i>Quercus robur</i> (roble) | Octubre -Diciembre | Efecto del CC |
| <i>Quillaja brasiliensis</i> (palo de jabón) | Diciembre-febrero | Efecto de CC más variación propia interanual en abundancia |
| <i>Peltophorum dubium</i> (ibirapita) | Febrero - Marzo | Extensión a mayo por efecto de CC |
| <i>Pinus elliottii</i> (pino elliottii) | Mayo- Agosto | Pico en agosto |
| <i>Pinus taeda</i> (pino taeda) | Mayo - Agosto | Ídem |
| <i>Prosopis affinis</i> (algarrobo, ñandubay) | Octubre - Enero | Efecto del CC más variación propia interanual en abundancia |

CC*: cambio climático; cambios observados en las fechas de floración (precoz o tardía) y en su duración, asociados a perturbaciones climáticas (Fuente: elaboración en base a observaciones propias).

2.2.1. Órganos de reproducción

La correcta observación de los órganos de reproducción y el adecuado conocimiento de su biología son fundamentales por sus implicancias sobre la producción de polen, las formas de polinización y las aplicaciones prácticas para su recolección. De ellas derivan, por ejemplo, la clasificación de las especies en monoicas (con distribución de los órganos de reproducción masculinos y femeninos sobre un mismo pie) o dioicas (con distribución de los órganos de reproducción en flores distintas y en distintos pies). A los efectos de ilustrar algunos conceptos relacionados a la biología de la reproducción, se presentan, a continuación, observaciones morfológicas y fenológicas de las especies arbóreas forestales de los proyectos de domesticación y de mejoramiento genético desarrollados por el área forestal de INIA-Tacuarembó en su Laboratorio de Semillas Forestales (LSF).

2.2.1.1. Órganos de reproducción masculinos

En los siguientes registros fotográficos obtenidos en el LSF de INIA-Tacuarembó, se presentan las principales características morfológicas de los órganos de reproducción masculinos de una Gimnosperma (Fig.1: *Cupressus macrocarpa*, ciprés), y de tres Angiospermas (Fig.2 *Eucalyptus grandis*, eucalipto grandis; Fig.3 *Eucalyptus globulus*, eucalipto globulus y, Fig.4 *Peltophorum dubium*, ibirapita).

Gimnospermas:

Cupressus macrocarpa (ciprés)

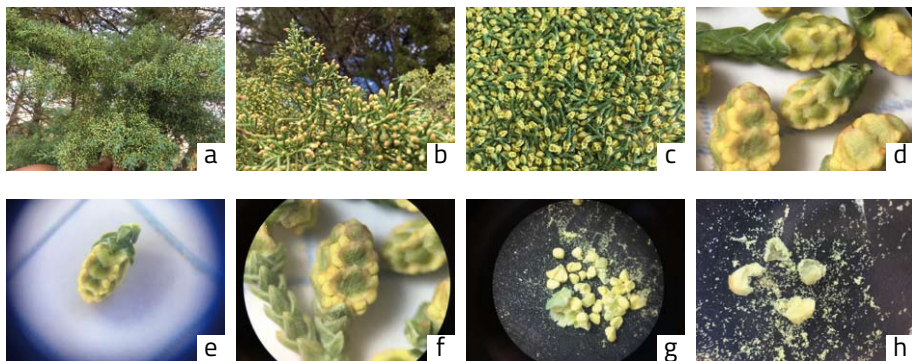


Fig. 1. a) Rama de árbol adulto con inflorescencias masculinas. b) Órganos de reproducción masculinos a escala real. c) Recolección de órganos de reproducción masculinos. d), e), f) Observación de sacos polínicos con diferentes aumentos de lupa binocular. g), h) Liberación manual y observación de polen con lupa binocular.

Angiospermas:

Eucalyptus grandis (eucalipto grandis)



Fig. 2. a) Capsulas inmaduras observadas con lupa binocular. b) Floración con estambres en pleno desarrollo. c) Estambres aumentados en lupa binocular.

Eucalyptus globulus (eucalipto globulus)

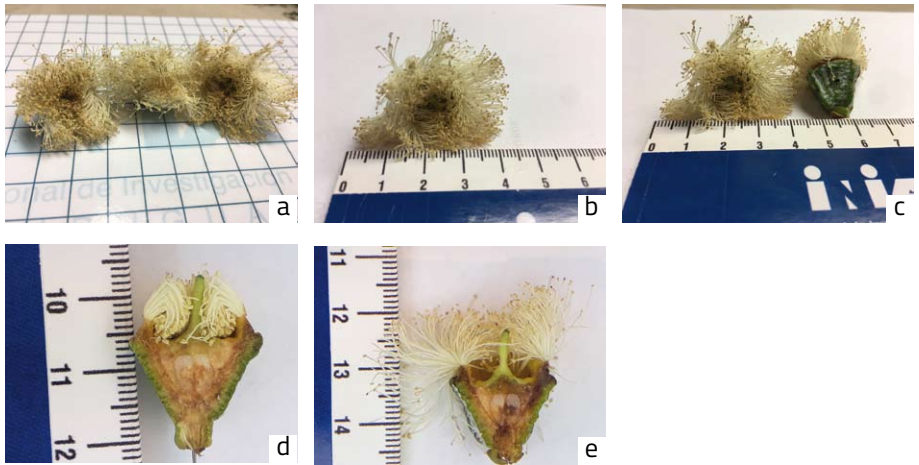


Fig.3. a), b) y c) Capsulas maduras y estambres en plena floración. d), e) Cortes longitudinales de capsulas con dos etapas de maduración de los estambres.

Peltophorum dubium (ibirapita)



Fig.4. a) Flor entera con estambres y estigma. b) Anteras abiertas con granos de polen en contacto con el estigma.

2.2.1.2. Órganos de reproducción femeninos

En las siguientes secuencias de fotos, se presentan las principales características morfológicas de los órganos de reproducción femeninos de una Gimnosperma (Fig.5 *Cupressus macrocarpa*, ciprés), y de dos Angiospermas (Fig.6 *Eucalyptus grandis*, eucalipto grandis y Fig.7 *Peltophorum dubium*, ibirapita)

Gimnospermas:

Cupressus macrocarpa (ciprés)

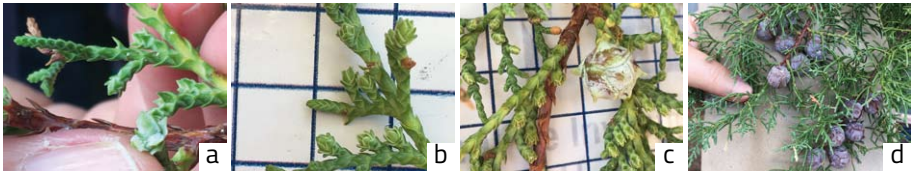


Fig.5. a), b), c) Etapas de maduración de la gámbula. d) Gámbulas maduras.

Angiospermas:

Eucalyptus grandis (eucalipto grandis)

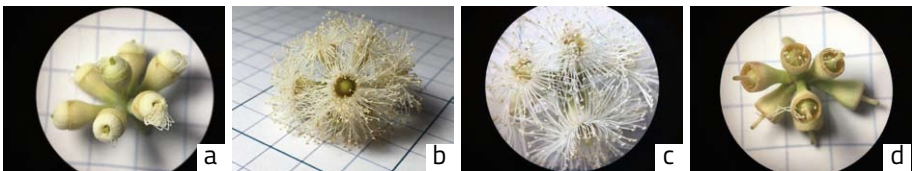


Fig.6. a), b), c) Etapas de maduración y apertura de capsulas. d) Ablación de estambres para la observación del pistilo con lupa binocular.

Peltophorum dubium (ibirapita)

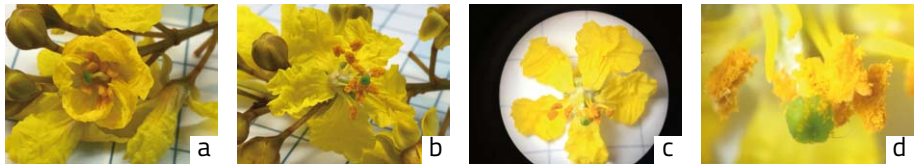


Fig.7. a), b) Etapas de maduración y eclosión de la flor. c), d) Pistilo, estambres, anteras y granos de polen en contacto con el estigma aumentados con lupa binocular.

2.2.2. Fenofases

En los siguientes montajes fotográficas, se presentan registros de fenofases obtenidos en LSF de INIA-Tacuarembó, durante un periodo anual de floración de una Gimnosperma (Fig.8 *Cupressus macrocarpa*, ciprés) y de dos angiospermas (Fig.9 *Eucalyptus grandis*, eucalipto grandis y Fig.10 *Peltophorum dubium*, ibirapita).

Gimnospermas:

Fenofases de Cupressus macrocarpa (ciprés)



Fig.8. a), b), c), d), e), f), g), h), i), j), k), l), m), n), o), p), q) Etapas de maduración de los órganos de reproducción masculinos y femeninos con persistencia de gábulas de 3 años consecutivos en un árbol adulto. r), s), t) Cortes transversal y longitudinal de una gábulas de una estación.

Angiospermas:

Eucalyptus grandis (eucalipto grandis)

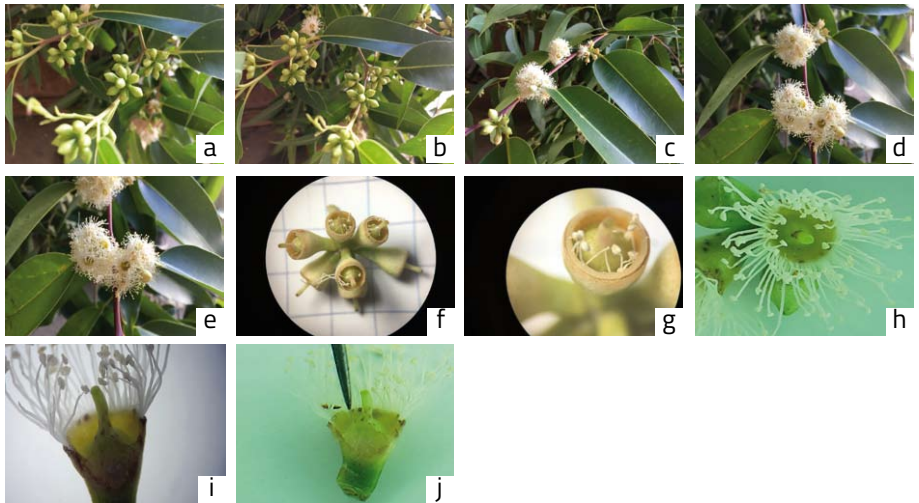


Fig.9. a), b), c), d), e) Etapas de maduración, apertura y floración de capsulas de un árbol adulto. f), g), h) Órganos de reproducción maduros observados con lupa binocular. i), j) Cortes longitudinales de una capsula madura.

Peltophorum dubium (ibirapita)

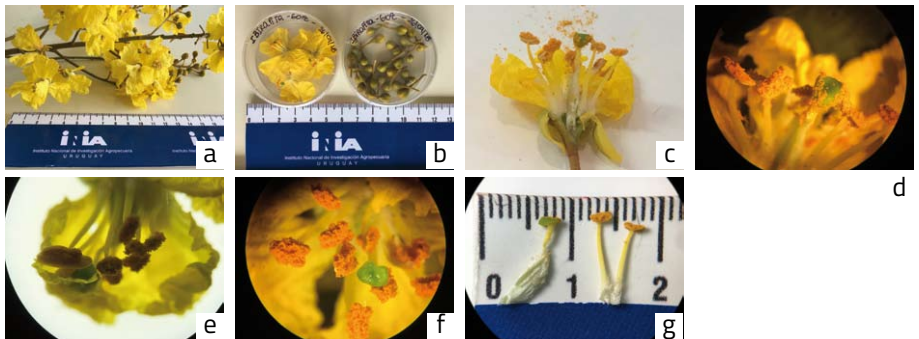


Fig.10. a), b) Etapas de maduración de la flor. c) Corte longitudinal de la flor a escala real. d), e), f) Órganos de reproducción en lupa binocular. g) Extracción y observación de órganos de reproducción masculinos y femeninos en tamaño real.

2.2.3. Producción, liberación y dispersión de polen

La producción del polen y su liberación son moduladas por la acción de factores abióticos (lluvias, heladas, sequías, vientos) y de factores bióticos (enfermedades, plagas, pájaros, mamíferos). A estas dos categorías, cabe agregar algunos factores fisiológicos propios de las especies vegetales cuyas acciones conducen generalmente a abortos de anteras y a su abscisión con caída prematura.

La distancia de dispersión del polen es función de su vector de transporte (viento, agua o insectos). Esta distancia se estima por observaciones y mediciones directas o, indirectamente, por tasas de hibridación, técnicas de isótopos, isoenzimas y marcadores moleculares (en huertos semilleros básicamente). Las distancias reportadas en bibliografía oscilan entre metros y decenas de kilómetros.

2.3. Principales características del polen

2.3.1. Palinología

La palinología es la parte de botánica dedicada al estudio del polen. El polen es asimilado comúnmente al polvo fino (granos de polen) producido en los órganos de reproducción masculinos y liberado durante los procesos de floración y polinización. Los granos de polen se forman en los sacos polínicos (Gimnospermas) y en las anteras de los estambres (Angiospermas).

2.3.2. Morfología y técnicas de observación

Los granos de polen presentan una gran variedad de tamaños, formas (en general esféricas) y patrones de superficie que permite la clasificación taxonómica de las especies. Su tamaño es generalmente reducido (2,5 a 250 micrones), requiriendo aumentos para su observación. La estructura anatómica de un grano de polen consiste en un conjunto de células vegetativas reproductivas y no reproductivas, delimitado por dos membranas protectoras (intina y exina). La membrana externa más resistente (exina) asegura la protección contra la desecación; está prevista de poros que permitan la imbibición y rehidratación del grano de polen y es cubierta de proteínas y ceras que aseguran su adherencia a los órganos de reproducción femeninos y a los insectos polinizadores. En la Fig.11 se presenta el esquema de un corte de polen adaptado de Internet.

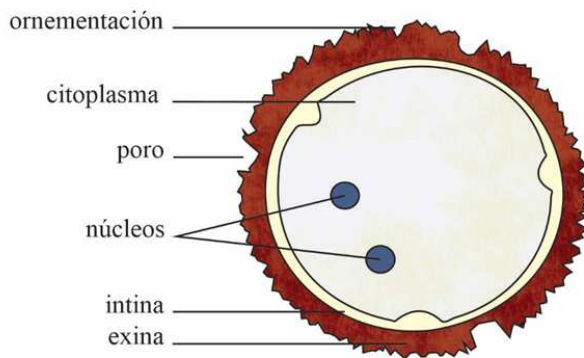


Fig.11. Esquema de un corte de polen (adaptado de Internet)

Las técnicas de observación consisten en el ajuste de métodos de tinción, la preparación de medios y el uso de instrumentos de aumento adecuados. Las técnicas de tinción son las usadas habitualmente en anatomías vegetal con lugol, azul de metilo, etc. Los medios de observación consisten por lo general en agua destilada, glicerina y agar. Los instrumentos utilizados para la observación dependen del objetivo del trabajo e incluyen lupas comunes, lupas binoculares, microscopios de laboratorio y microscopios electrónicos.

Existen diferentes tipos de colecciones de polen (palinotecas) con sus respectivas claves de determinación y bases de datos. Las más comunes, de dominio público, corresponden a la apicultura y al control ambiental de la salud pública en las ciudades (enfermedades respiratorias). En las siguientes figuras, se presentan preparaciones y observaciones de polen con equipos de diferentes aumentos, realizadas en el LSF de INIA-Tacuarembó (Fig. 12, Fig. 13, Fig. 14, Fig. 15, Fig. 16, Fig. 17, Fig. 18, Fig. 19, Fig. 20, Fig. 21, Fig. 22, Fig. 23, Fig. 24, Fig. 25 y Fig. 26). Las preparaciones y observaciones con microscopio electrónico de barrido se realizaron por el personal del LSF en la Facultad de Ciencias de la UdelaR.

Cupressus macrocarpa (ciprés)

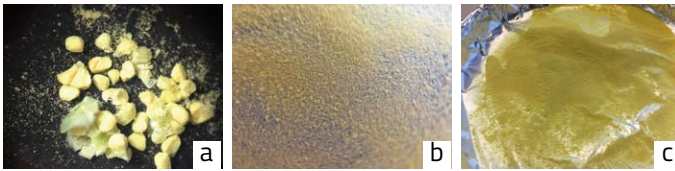


Fig. 12. a), b), c) Observación de sacos polínicos y granos de polen a escala real.



Fig. 13. Observación de granos de polen con lupa binocular.

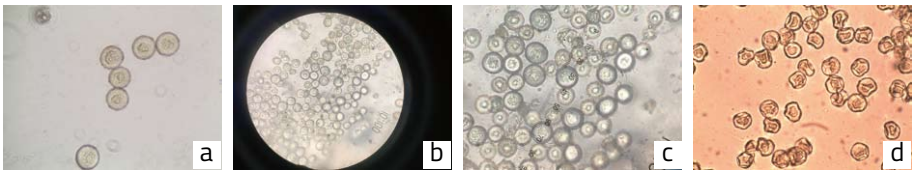


Fig. 14. Observación de granos de polen en microscopio óptico, resolución 40x. a) Montaje en agua. b), c) Montaje en agar. d) Montaje en glicerina.

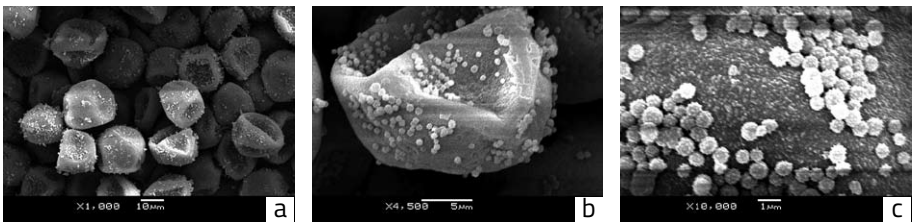


Fig. 15. a), b), c) Observación de polen en microscopio electrónico de barrido, marca JOEL, modelo JSM 5900 LV con filamento de tungsteno y varias resoluciones.

Pinus taeda (pino taeda)

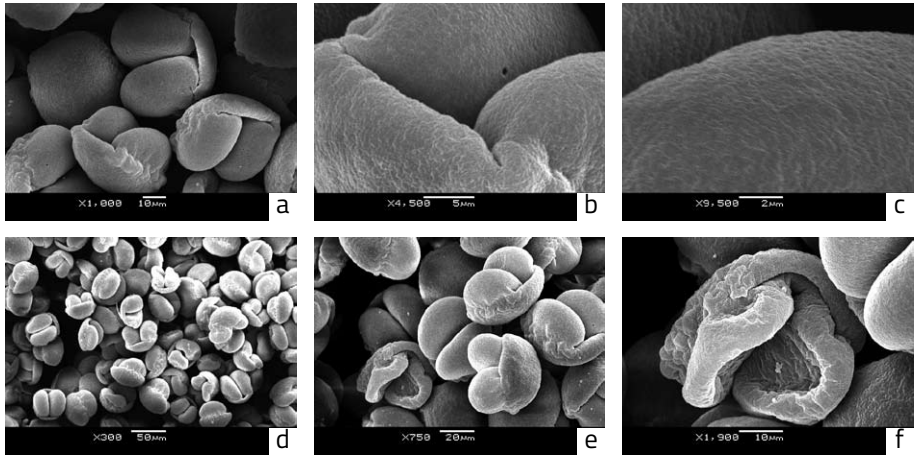


Fig.16. a, b), c), d), e), f) Observación de granos de polen en microscopio electrónico de barrido, marca JOEL, modelo JSM 5900 LV con filamento de tungsteno y varias resoluciones.

Eucalyptus grandis (eucalipto grandis)

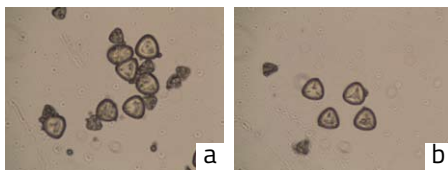


Fig.17. a), b) Observación de granos de polen con lupa binocular.



Fig.18. Observación de granos de polen en microscopio óptico, resolución 40x. a) Montaje en agua. b) Montaje en agar. c) Montaje en glicerina.

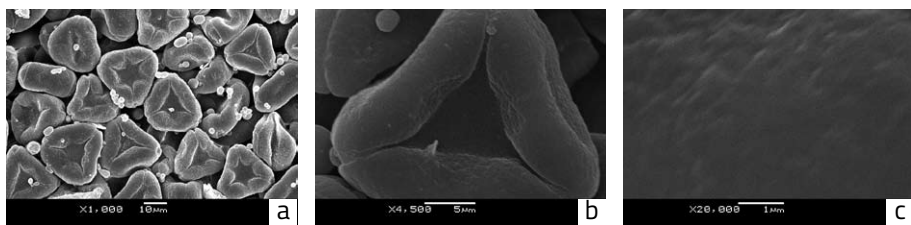


Fig.19. a), b) y c) Observación de granos de polen en microscopio electrónico de barrido, marca JOEL, modelo JSM 5900 LV con filamento de tungsteno y varias resoluciones.

Peltophorum dubium (ibirapita)

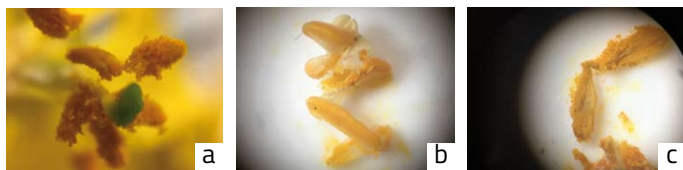


Fig.20. a), b), c) Observación de granos de polen con lupa binocular.

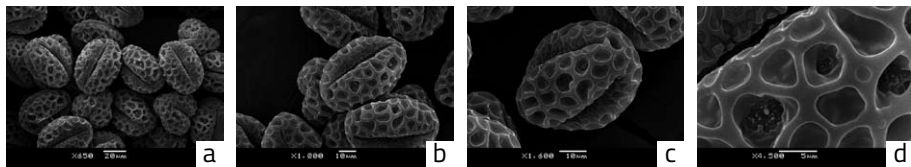


Fig.21. a), b), c), d) Observación de granos de polen en microscopio electrónico de barrido, marca JOEL, modelo JSM 5900 LV con filamento de tungsteno y varias resoluciones.

Quillaja brasiliensis (palo de jabón)

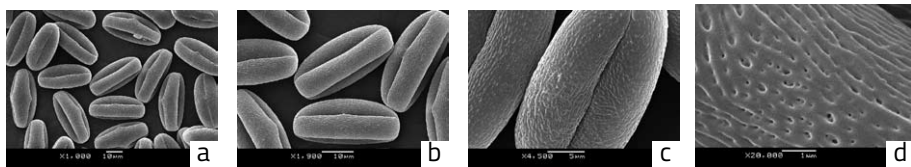


Fig.22. a), b), c), d) Observación de granos de polen en microscopio electrónico de barrido, marca JOEL, modelo JSM 5900 LV con filamento de tungsteno, resoluciones variadas.

Fraxinus excelsior (fresno europeo)

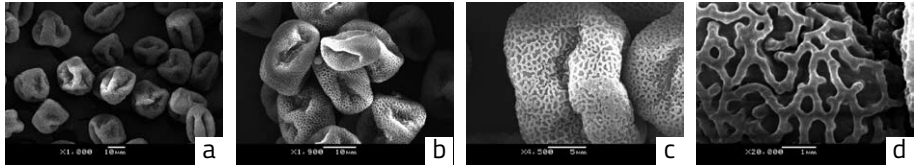


Fig.23. a), b), c), d) Observación de granos de polen en microscopio electrónico de barrido, marca JOEL, modelo JSM 5900 LV con filamento de tungsteno y varias resoluciones.

Eucalyptus camaldulensis (eucalipto colorado)

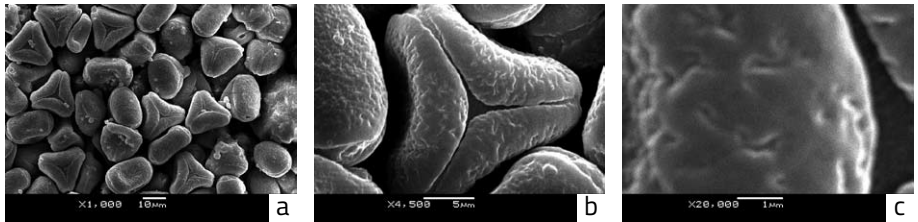


Fig. 24. a), b), c) Observación de granos de polen en microscopio electrónico de barrido, marca JOEL, modelo JSM 5900 LV con filamento de tungsteno y varias resoluciones.

Castanea sativa (castaño)

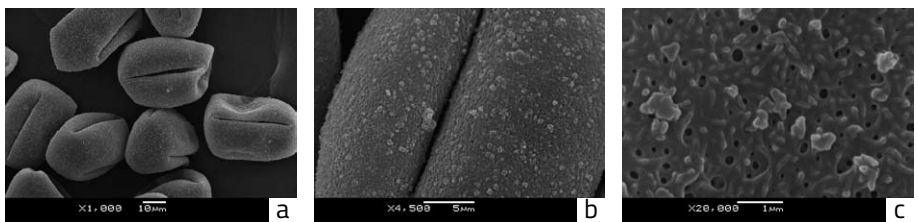


Fig.25. a), b), c) Observación de granos de polen en microscopio electrónico de barrido, marca JOEL, modelo JSM 5900 LV con filamento de tungsteno y varias resoluciones.

Acacia caven (espinillo)

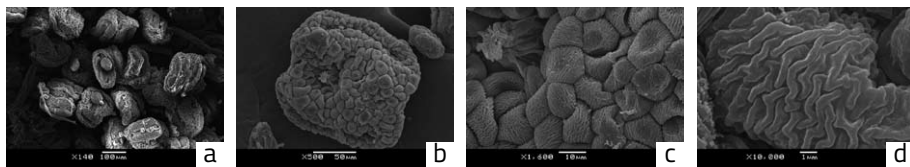


Fig.26. a), b), c), d) Observación de granos de polen en microscopio electrónico de barrido, marca JOEL, modelo JSM 5900 LV con filamento de tungsteno y varias resoluciones.

2.3.3. Germinación

La germinación de polen es parecida a la germinación de semillas y muchos de sus fenómenos morfológicos y fisiológicos son comparables. Los granos de polen germinan después de la polinización y la hidratación en contacto con el estigma (Angiospermas) o con el primordio seminal (Gimnospermas), emitiendo tubos polínicos que aseguran el transporte de los gametos masculinos hacia los gametos femeninos para su fecundación. La germinación, la emisión y el crecimiento del tubo polínico se rigen por señales moleculares entre el propio grano de polen y el estigma o el primordio seminal.

La tasa de crecimiento del tubo polínico es variable según las especies y el vigor del grano. La germinación puede inducirse in vitro En la Fig. 27 se observan granos de polen germinados de *Eucalyptus grandis* (eucalipto grandis) en solución de sacarosa a 20%. Estos aspectos se desarrollarán con más detalles en el punto 4.2.2 dedicado a los ensayos de viabilidad del polen.



Fig.27. Granos de polen germinados de *Eucalyptus grandis* (eucalipto grandis) en microscopio óptico, resolución 40x.

3. Recolección de polen de especies arbóreas forestales

3.1. Recolección.

3.1.1. Logística.

El objetivo de la recolección de polen condiciona su planificación y la logística a desplegar, según se trata de tareas de cruzamientos en programa de mejoramiento genético, de establecimiento de un banco de germoplasma o de otros ensayos de investigación. Esta planificación incluye actividades y procedimientos como la estimación y cuantificación de los lotes de polen a recolectar, la elección del lugar y fecha de recolección y, la definición de los métodos de recolección, procesamiento y conservación del polen.

3.1.2. Criterios para la recolección

Existen diversos métodos de recolección. Su elección depende de diversos factores: el objetivo de la recolección, la cantidad de polen requerida, el tamaño relativo de los órganos de reproducción, su abundancia y su distribución, las características de las flores y su grado de madurez, las características del árbol seleccionado, la formación que integra, el sitio y los recursos financieros y humanos disponibles

3.1.2.1. Fuentes

La recolección de polen permite capturar y preservar el genotipo de un individuo o el pool genético de una población considerados de interés; lo cual implica la elección de las mejores fuentes en términos de superioridad de los árboles y la inclusión de un número adecuado de individuos para garantizar una amplia base genética.

En el caso de los programas de mejoramiento genético, se usa el concepto de procedencia y las pautas para su elección son muy asociadas a los grados de mejoramiento genético alcanzados y a los avances en las generaciones de mejora. La cantidad de individuos a recolectar es variable y depende de la estrategia aplicada, respetando estrictamente la regla de asegurar bases con variabilidad genética la más amplia posible.

En los cruzamientos, se manejan criterios específicos de idoneidad genética para asegurar tareas correctas de hibridación. La fuente de polen debe encontrarse en la zona ecológica correcta o en la ubicación adecuada en el huerto semillero, con el número y el aislamiento efectivos de árboles donantes. En Anexo 1, se adjunta un modelo de planilla de campo para la correcta recopilación de la información relativa a los árboles seleccionados como fuentes de polen.

En el caso de poblaciones forestales naturales, el número exacto de individuos representativo de su variabilidad genética depende de su composición y dinámica. Debido a las dificultades bastante corrientes de la recolección del polen, se recomienda prever siempre cantidades suficientes para asegurar abastecimientos de largo plazo.

3.1.2.2. Fechas

La fecha de recolección de polen es estrechamente asociada a la época de floración y a la maduración de los órganos de reproducción masculinos. La recolección debe preferiblemente realizarse cuando más del 60 % de la floración es alcanzado. El registro y control de este pico de floración son asegurados a través de observaciones periódicas de la copa de los árboles y de la maduración de los órganos de reproducción masculinos. El inicio de la liberación del polen se monitorea a través de la observación de la emisión de nubes de polen y de la concentración de insectos polinizadores.

La realización de la recolección en horas tempranas de la mañana es recomendable por el escape al calor y la prevención de los daños por insolación del polen. Se debe evitar la cosecha de polen de anteras inmaduras, envejecidas o dañadas por factores climáticos o sanitarios. Para asegurar la máxima longevidad del polen, es habitualmente más práctico cosechar flores enteras o anteras en el campo para su posterior procesamiento en el laboratorio, inmediatamente a la llegada.

3.1.2.3. Equipos y materiales

Los equipos y materiales utilizados habitualmente son: tijeras de podar, tijeras telescópicas, machetes, escaleras, ganchos, sogas, lonas, láminas de polietileno y de malla, bolsas de algodón, bolsas de lona, etiquetas, ropa protectora, binoculares, libros de identificación de plantas, prensas para plantas, periódicos, cajas para guardar muestras, cuadernos de campo, bolígrafos, lápices y un equipo de primeros auxilios. En la Fig.28 se muestran algunos de estos equipos utilizados en el LSF de INIA-Tacuarembó.

En el caso de programas de mejoramiento genéticos avanzados, se requiere la adquisición de algunos equipos costosos y su uso en forma compartida para diferentes tareas (recolección de polen, polinización controlada y cosecha de semillas). En la Fig. 29 se muestra el elevador utilizado en los programas de mejoramiento genético del área forestal de INIA. El uso de rifles con miras de precisión es reportado en caso de árboles de difícil acceso (Fig.30).

Últimamente, el uso de drones abre muy buenas perspectivas para la optimización de las tareas de recolección (Fig.31 y Fig. 32). Se adjuntan en Anexo 2 cuatro videos para ilustrar las posibilidades de uso de drones para la planificación de las actividades de recolección de polen. Las tomas se realizaron en árboles individuales de INIA- Tacuarembó, en un huerto semillero de su Unidad Experimental La Magnolia y en una población natural de monte nativo cercano a la sede de la estación.



Fig. 28. Equipos y materiales básicos para recolección de polen. LSF INIA-Tacuarembó.



Fig. 29. a), b), c). Elevador para cosecha de polen y polinización de *Eucalyptus* y *Pinus*. LSF INIA – Tacuarembó



Fig. 30. a), b), c) Rifle con mira para la recolección de polen y semillas. LSF INIA – Tacuarembó.

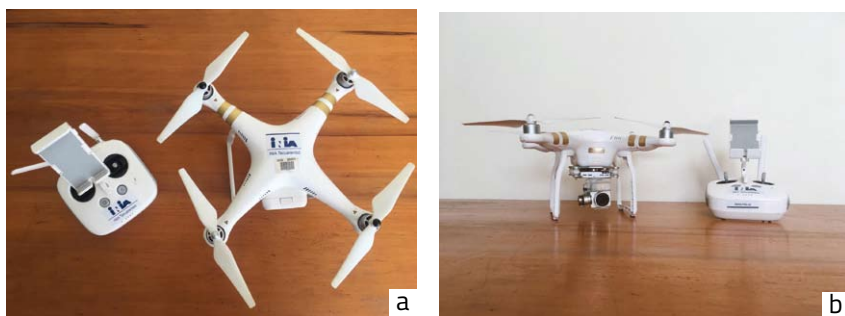


Fig. 31. a), b) Vistas aérea y lateral de dron. INIA – Tacuarembó.

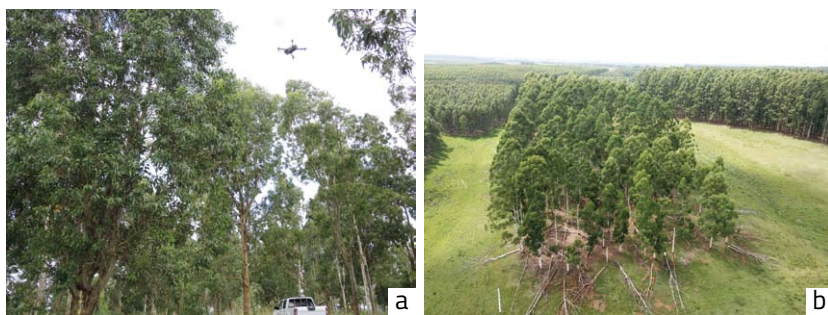


Fig.32. a), b) Inspección y vista de floración y fructificación de *Eucalyptus tereticornis* (eucalipto colorado) con dron. Unidad Experimental La Magnolia. INIA-Tacuarembó.

4. Manejo y conservación de polen de especies arbóreas forestales

4.1. Técnicas de manejo

4.1.1. Importancia de la etapa de procesamiento

Esta etapa incluye el conjunto de actividades relativas a la manipulación postcosecha del polen y a su procesamiento. El procesamiento del polen tiene como fin salvaguardar sus cualidades físicas, fisiológicas y sanitarias por periodos dados de tiempo e implica la observación de rigurosas reglas de protección para su almacenamiento y conservación a corto, mediano y largo plazo

Como mencionado anteriormente en las fechas de recolección, se procede generalmente a la cosecha de la flor entera en el campo, con sus órganos de reproducción masculinos, para facilitar el transporte y el posterior procesamiento del polen; se necesita, por lo tanto, algún tipo de procedimiento para extraerlo y para prepararlo para el uso directo o el almacenamiento. En caso contrario, existe la amenaza de una rápida pérdida de su viabilidad, básicamente por desecación. Es imperativo entonces mantener su alto contenido de humedad, con una extracción rápida y un almacenamiento inmediato en un lugar fresco, en medios húmedos o en recipientes bien sellados.

El procesamiento del polen reduce adicionalmente el volumen de biomasa recolectada y permite un ahorro de espacio. A mediano y largo plazos, esta etapa facilita también la planificación adecuada de las fechas de sus usos posteriores y contrarresta la variabilidad de producción interanual del polen.

4.1.2. Principales etapas del procesamiento

Las principales etapas del procesamiento incluyen la extracción, la limpieza, el secado, el acondicionamiento y el almacenamiento. En el caso de recolección de flores enteras, se requiere su clasificación previa, la extracción de los estambres, su secado y la apertura de las anteras para la liberación del polen.

4.1.2.1. Extracción y limpieza

Los métodos de extracción son mecánicos y se clasifican en función de su escala (pequeña escala o escala comercial). Consisten básicamente en tamizaje y centrifugación. Existe una amplia gama de tipos y modelos de equipos de extracción, de tamaños variables según el objetivo perseguido. Una simple y rápida búsqueda en Internet permite una adecuada elección en función de los recursos financieros disponibles en la empresa o en la institución.

Existen también varios tipos y modelos de tamices según el objetivo de la recolección de polen. En la Fig. 33. se muestran modelos usados en el LSF de INIA-Tacuarembó.



Fig.33. Modelos de tamices: a) unidades simples, b) conjunto para tamizaje vertical. LSF. INIA – Tacuarembó.

A modo de resumen de las etapas de extracción y limpieza del polen a escala de laboratorio de investigación, se muestra en la Fig. 34 una secuencia de trabajo del LSF de INIA- Tacuarembó, aplicada al ciprés (*Cupressus macrocarpa*).

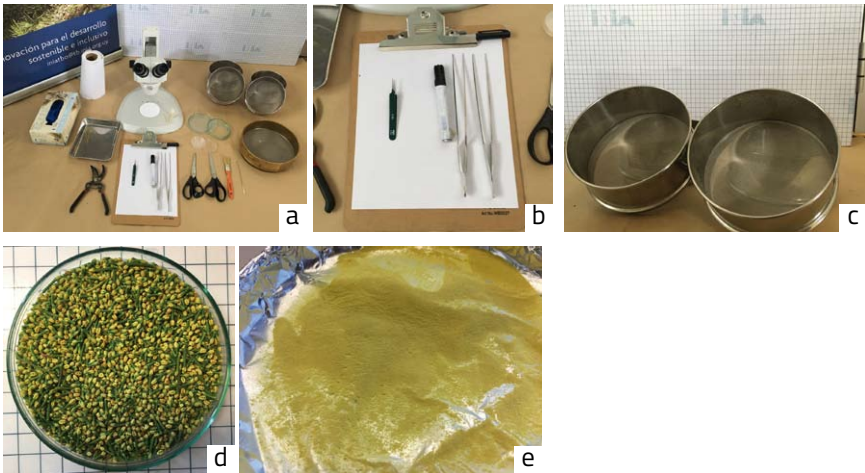


Fig. 34. Etapas de extracción y limpieza de polen a escala de laboratorio de investigación a), b), c), d) Etapas de extracción y limpieza. e) Lote de polen limpio. LSF. INIA-Tacuarembó.

4.1.2.2. Secado

La operación de secado busca la reducción del contenido de humedad del polen hasta un nivel recomendado para asegurar su viabilidad en el transcurso del almacenamiento. Para varias especies, el polen puede desecarse hasta un contenido de agua de 5% por gramo de materia seca, sin perder su viabilidad. La medición del contenido de humedad puede realizarse adaptando equipos utilizados para semillas. Los métodos de secado utilizados son variables: aire libre, silicagel a temperatura ambiente y estufas a 20 C° hasta peso constante. En la Fig. 35, se presentan los equipos con silicagel en uso en el LSF de INIA-Tacuarembó.

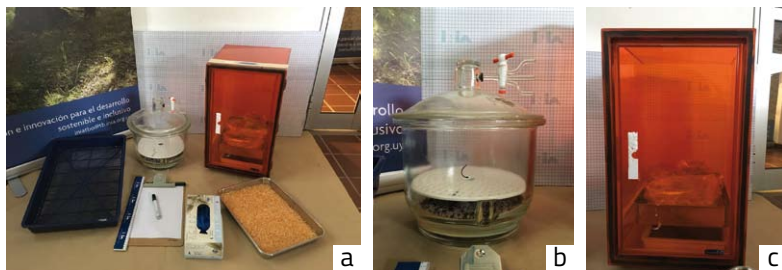


Fig. 35. a) Secado de polen con silicagel. b) En campana de vidrio (desecador). c) En armario de plexiglás. LSF. INIA-Tacuarembó.

4.1.2.3. Acondicionamiento y almacenamiento

En estas etapas, se busca prevenir la reabsorción de humedad atmosférica después del secado, mantener las accesiones en lotes separados y prevenir contaminaciones por hongos y ataques de insectos. Los equipos y envases utilizados son variables. Para almacenamiento de corto plazo, el polen se guarda en envases limpios, secos y herméticos. Los tarros metálicos y las bolsas de polietileno grueso son envases aceptables para un período intermedio de menos de un año. Para un período de almacenamiento prolongado, se recomienda el uso de bolsas de polietileno grueso, selladas herméticamente y colocadas dentro de recipientes herméticos y resistentes, como tambores, cilindros, barriles o recipientes de plástico. Los envases deben almacenarse en un lugar fresco, oscuro, seco y bien ventilado. En la Fig. 36 se muestran los envases utilizados en el LSF de INIA-Tacuarembó para acondicionar polen para fines de investigación.

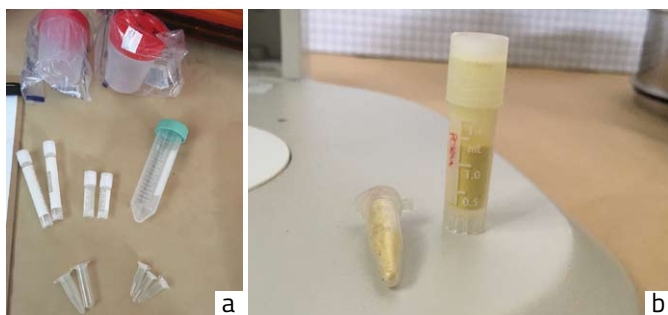


Fig. 36. Envases para almacenamiento de polen LSF. INIA-Tacuarembó.

4.2. Técnicas de conservación.

4.2.1. Conservación en frío:

Para plazos cortos y medianos, la conservación de polen de muchas especies forestales se realiza con éxito en un rango de temperatura de 4 °C hasta -20 °C. El polen desecado y almacenado entre 4 °C y -20 °C conserva su viabilidad hasta por un año, habilitando su uso en programas de mejoramiento genético. En la Fig. 37, se muestran los equipos utilizados para la conservación de polen a mediano y largo plazos en el LSF de INIA-Tacuarembó.



Fig.37. Equipos de frío para conservación de polen. LSF. INIA-Tacuarembó.

Para una conservación de mayor tiempo, como en el caso de bancos de germoplasma de largo plazo, se requieren estudios específicos para desarrollar métodos estandarizados para cada tipo de polen. Se ha observado, por ejemplo, que la viabilidad del polen de algunas especies es susceptible de preservarse de -80°C hasta -196°C en nitrógeno líquido. Una vez desecado, el polen se dispone en crioviales en nitrógeno líquido o en nitrógeno vapor. En este proceso, el correcto etiquetado de las muestras es muy importante al igual que la infraestructura prevista para el almacenamiento. Los viales pueden colocarse en cajas o sumergirse directamente en el nitrógeno líquido o gaseoso. En la Fig.38 se muestra el equipamiento en tanques de nitrógeno líquido del Centro Nacional de Recursos Genéticos de Tepatlitlán de Morelos (Jalisco, México).

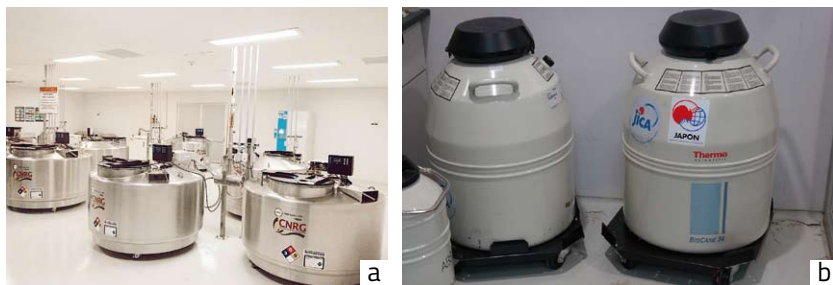


Fig. 38. Crioconservación en tanques de nitrógeno líquido. Centro Nacional de Recursos Genéticos, Tepatlitlán de Morelos, Jalisco, México.

4.2.2. Ensayos de viabilidad de polen.

La viabilidad del polen se mide a través de la evaluación de su potencial germinativo y consiste en la estimación de la proporción de granos de muestras, capaces de germinar en condiciones controladas, en un medio de cultivo dado, a una temperatura establecida y por un tiempo determinado. Los ensayos de viabilidad del polen se realizan por tinción, por germinación de granos de polen en condiciones controladas o por comprobación de una fertilización exitosa *ex situ*. La fertilización *ex situ* es trabajosa y costosa por lo cual su uso es restringido y se reduce a aplicaciones en huertos semilleros de generaciones avanzadas.

La longevidad se mide por el tiempo durante el cual un lote o una muestra de polen mantiene su viabilidad. Esta longevidad depende de diferentes factores propios de la especie y de las técnicas de recolección, de procesamiento, de almacenamiento y de conservación del polen. Las técnicas de secado y de conservación son definitorias para la longevidad. El

envejecimiento acelerado del polen deshidratado se debe probablemente a reacciones de oxidación, por lo cual el almacenamiento en atmósferas confinadas es recomendable. Se reportan muchos ejemplos de especies con longevidad de polen de hasta 10 años.

4.2.2.1. Protocolos de tinción

El ensayo de viabilidad por tinción más utilizado es el del tetrazolio (TTZ). El producto químico que se utiliza tiñe de rojo los tejidos vivos; es decir que la coloración con TTZ es absorbida por los granos de polen viables, contrariamente a los vanos. Los granos viables presentan en general un mayor tamaño con respecto a los vanos y la probabilidad de su viabilidad depende de la cantidad de solución colorante absorbida. Es factible proceder también a la coloración de anteras enteras. El ensayo de viabilidad por tinción con TTZ es destructivo. Las Normas ISTA (International Seed Testing Association) aplicadas a las pruebas de viabilidad con TTZ de semillas son extrapolables al polen.

4.2.2.2. Protocolos de germinación a escala de laboratorio

La germinación consiste en el desarrollo, a partir del grano de polen, de un tubo polínico capaz de facilitar el tránsito de los gametos masculinos hacia los gametos femeninos para su fecundación. Los ensayos de germinación de polen miden su capacidad germinativa potencial y proporcionan información sobre su viabilidad. La germinación de una muestra representativa permite también la estimación de la cantidad de polen necesaria para las operaciones de cruzamientos en los huertos semilleros.

Los granos de polen necesitan niveles adecuados de humedad, oxígeno y temperatura para poder germinar. Se observa el inicio de actividades fisiológicas (absorción de agua principalmente por imbibición, actividad enzimática e incremento de las tasas de respiración y asimilación) que desembocan en la conformación, elongación y emisión del tubo polínico. Los ensayos de germinación en condiciones controladas de laboratorios son los más eficientes y seguros para estudios de viabilidad. Los protocolos deben ser bien documentados con la descripción de medios, periodos de incubación y procedimientos de conteo. Se presentan a continuación ejemplos de medios:

- Medios sólidos:
 - o 2% de agar, 5 a 10% de sacarosa; incubación 48 a 72 horas a 24°C (laboratorios australianos).
 - o 5% agar; 20% sacarosa; incubación 6 horas a 30°C (laboratorios estadounidenses).
- Medios líquidos
 - o 20% de sacarosa en agua destilada; 150 ppm de ácido bórico = 150 mg/litro de agua destilada (varios laboratorios).
 - o 20% de sacarosa (varios laboratorios).

La temperatura óptima para la germinación es variable según las especies. Se reporta en bibliografía que 25°C es una temperatura adecuada para el polen de muchas especies. Se observa también una variabilidad interespecífica en la velocidad de germinación. Los tubos polínicos con un tamaño por lo menos igual al diámetro de los granos de polen son considerado viables. En la Fig. 39 se muestran granos de polen germinados con tubos polínicos de diferentes tamaños de *Eucalyptus grandis* (eucalipto grandis). Es importante implementar métodos estandarizados y reproducibles en los laboratorios para los conteos y la medición de los tubos polínicos. Existen procedimientos automatizados con software morfométrico que permiten la sistematización del conteo de los granos y la medición del largo de los tubos, facilitando la velocidad de las tareas. En Anexo 1, se adjunta un modelo de planilla para la documentación de ensayos de germinación en laboratorio.



Fig. 39. Tubos polínicos de polen de *Eucalyptus grandis* (eucalipto grandis). LSF. INIA-Tacuarembó.

4.3. Calidad de polen

Los criterios de control de calidad de polen son similares a los manejadas para semillas y se establecen a través del estudio de las características de sus calidades física, fisiológica, sanitaria y genética. Estas características se evalúan por observaciones directas y por pruebas en laboratorio. La calidad física depende del tamaño, del color, de la fecha de recolección y de la ausencia de daños causados por factores bióticos (plagas o enfermedades) y factores abióticos (heladas, sequías, olas de calor). La calidad fisiológica depende de la madurez de

los granos de polen, de su contenido de humedad y de su capacidad de germinación. La calidad sanitaria depende de la presencia/ausencia de agentes fitopatógenos y de plagas y de su incidencia en la viabilidad y la germinación de los granos de polen. Finalmente, la calidad genética es determinada por el genotipo del germoplasma estudiado.

Las calidades físicas y fisiológica se miden básicamente a través de la capacidad germinativa y de la viabilidad del polen. Esas cualidades son importantes para los programas de mejoramiento genético y para los programas de conservación de germoplasma.

La sanidad del polen refiere, principalmente, a la ausencia de microorganismos causantes de enfermedades, como hongos, bacterias o virus y también a la ausencia de plagas como nematodos o insectos. Las condiciones fisiológicas nutricionales, como la deficiencia de algún elemento, son también parte de la sanidad del polen.

La calidad genética del polen es más difícil de evaluar y requiere de mayores esfuerzos, asociados a las acciones y a los resultados de los programas de mejoramiento genético, básicamente para la obtención de híbridos de generaciones avanzadas. De manera resumida, depende de la calidad de su fuente (procedencia), del número de árboles muestreados (base genética) y de su ranking genético (árboles candidatos, plus, elite).

Las manipulaciones posteriores del polen (procesamiento, almacenamiento, conservación y distribución) influye en sus cualidades fisiológicas y físicas. La calidad del polen se mide directamente por la tasa de germinación de sus granos o indirectamente por el porcentaje de semillas viables obtenidas. Cuando el polen se somete a ensayos de capacidad de germinación, se miden sus calidades física, fisiológica, sanitaria pero no su calidad genética.

4.4. Bancos de germoplasma

Los criterios de clasificación de los bancos de germoplasma se basan en su objetivo, su tamaño, su método de manejo y seguimiento (mantenimiento) y, el grado genético de sus accesiones. Los bancos se clasifican en bancos de germoplasma activos (corto y mediano plazo), bancos de germoplasma de base (largo plazo), bancos de germoplasma *in situ* y bancos de germoplasma *ex situ*. Los principios resumidos en este punto son aplicables en términos generales a los recursos genéticos forestales sexuales (semillas, óvulos y polen). Su contenido se adaptó a las particularidades del polen en su carácter de recurso genético forestal almacenado en bancos de germoplasma.

El objetivo general de los bancos de germoplasma consiste en la conservación eficaz a corto, mediano y largo plazos y a un costo razonable de recursos fitogenéticos (forestales en este caso) de interés (polen en este caso), manteniendo su calidad, viabilidad e integridad genética al más alto nivel. Los objetivos específicos son variables: (i) respaldo de programas de mejoramiento genético para captura y archivo de genotipos selectos y con usos potenciales, (ii) estrategia general de conservación de una especie vegetal (caso específico de especies amenazadas), (iii) respaldo para el canje e intercambio de germoplasma interinstitucional, (iv) fuentes de materiales genéticos para estudios de adaptación a factores abióticos y bióticos y, (v) respaldo de programas de investigación básica (taxonomía, fisiología, ecofisiología, química y bioquímica).

4.4.1. Tamaño y mantenimiento

El tamaño de un banco de germoplasma se mide por la cantidad de accesiones que alberga. Cada accesión consiste en una muestra de germoplasma (polen en este caso) distinta, identificable de manera única para representar un individuo y/o una población y almacenada para su conservación y posterior utilización. Ese tamaño resulta del objetivo del banco, de los avances tecnológicos registrados en el procesamiento del polen y de los recursos humanos y financieros disponibles. Los procedimientos generales de mantenimiento consisten en el ingreso de las accesiones, su registro, su limpieza, la determinación de su porcentaje de humedad y en el control periódico de su viabilidad y calidad sanitaria.

4.4.2. Documentación y manejo de datos.

El sistema de documentación consiste en la elaboración de bases de datos computarizadas con información relativa a todos los aspectos de las accesiones de polen conservadas y en su actualización periódica. Los principales datos recopilados consisten en los pasaportes de las accesiones almacenadas y en su caracterización genética. La indexación de enfermedades, los equipos y suministros en uso, los intercambios nacionales e internacionales y los aspectos logísticos de la operación de conservación conforman bases de datos complementarias de sumo interés. Estas bases de datos son las principales fuentes de información para la elaboración de catálogos de polen.

5. Bibliografía Consultada

BENNADJI, Z.; MELLO, S.; ALFONSO, M.; NUÑEZ, P.; GONZALEZ, C.; RODRIGUEZ, F. 2018. Recolección, manejo y conservación de polen de especies arbóreas forestales. Curso. INIA Tacuarembó (Uruguay). Serie Actividades de Difusión; SAD 782). 12 p
<http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/9781/1/SAD-782.pdf>

BODEN, R.W. 1958. Handling and storage of pollen in eucalyptus breeding, Australian Forestry, 22:2, 73-81

BRUSSA, C.A.; GRELA, I.A. 2007. Flora arbórea del Uruguay: con énfasis en las especies de Rivera y Tacuarembó. Rivera (Uruguay): COFUSA, Rivera (Uruguay). 544 p.

FONT QUER, P. 1985. Diccionario de Botánica. Edi. Labor, Barcelona.1244 p.

GONÇALVES, A.B.; SOUZA, J.S.; SILVA, G.GD.; CEREDA, M.P.; POTT, A.; NAKA, M.H.; et al. 2016. Feature Extraction and Machine Learning for the Classification of Brazilian Savannah Pollen Grains. PLoS ONE 11(6): e0157044. doi:10.1371/journal.pone.0157044

ISTA. 2007. International Rules for Seed Testing. ISBN-10 3-906549-38-5.

ISTA. 2013. International Rules for Seed Testing, Edition 2013. The International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland.

ISTA. 2015. International Rules for Seed Testing. https://www.seedtest.org/en/international-rules-_content---1--1083.html.

TUSSET, R. 1981. Forestación para productores agropecuarios. Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur. Montevideo (Uruguay) 366p.

ZOBEL, B.; TALBERT, J. 1984. Applied forest tree improvement. New York: John Wiley & Sons. 505 pp.

Anexo 1



INIA TACUAREMBÓ
PROGRAMA NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN
PRODUCCIÓN FORESTAL
LABORATORIO DE SEMILLAS FORESTALES

RECOLECCIÓN DE POLEN EN CAMPO

**PLANILLA DE GEOREFERENCIACIÓN DE INDIVIDUOS
DE ESPECIES ARBÓREAS FORESTALES**

Especie:

Lugar de recolección:

Fecha:

Recolector:

Contacto:

| Código | Latitud (S) | Longitud (W) | Altitud (m) | Número de flores | Observaciones (abundancia de floración, otras...) |
|--------|-------------|--------------|-------------|------------------|---|
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |



INIA TACUAREMBÓ
PROGRAMA NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN
PRODUCCIÓN FORESTAL
LABORATORIO DE SEMILLAS FORESTALES – BANCON
DE GERMOPLASMA

PLANILLA DE ANÁLISIS DE GERMINACIÓN DE POLEN

Nombre común:

Nombre científico:

N.º de registro:

Fecha de colecta:

Lugar de colecta:

Fecha de inicio del ensayo de germinación:

Medio:

Temperatura (°C):

Fotoperíodo:

Analista:

| FECHA DE CONTEO | Replica 1 | R2 | R3 | R4 | Observaciones |
|-----------------|-----------|----|----|----|---------------|
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

Anexo 2

QR videos de observaciones fenológicas con dron:

1. *Corymbia ficifolia* (eucalipto ficifolia)
2. *Eucalyptus tereticornis* (eucalipto colorado)
3. *Peltophorum dubium* (ibirapita)
4. *Quillaja brasiliensis* (palo de jabón)



Corymbia ficifolia
(eucalipto ficifolia)



Eucalyptus tereticornis
(eucalipto colorado)



Peltophorum dubium
(ibirapita)



Quillaja brasiliensis
(palo de jabón)



Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
URUGUAY