A microscopic view of several pine pollen grains, showing their characteristic circular shape and intricate surface patterns. The grains are arranged in a somewhat diagonal line across the frame.

**Manual de Recolección y Manejo de Polen de
Pinos Tropicales y Subtropicales Procedentes
de Rodales Naturales**

Por:
Michael E. Tighe,
Investigador Forestal
CAMCORE
Julio 2004

NC STATE UNIVERSITY

Bruce and Barbara Zobel Endowment
for International Forestry Studies

 **camcore**
Global partners for the future of our forests

Prefacio

La información presentada en las siguientes páginas es el resultado de una gira técnica a Guatemala financiado a través de una beca de la Donación Zobel (Zobel Endowment), experiencia profesional con CAMCORE, experimentos realizados conforme con estudios de postgraduado en la Universidad Estatal de Carolina del Norte en Raleigh, NC, USA, y revisión de material publicada.

Mientras existe mucha literatura que detalla los protocolos específicos para el análisis de polen y prácticas de polinización, muy poca literatura existe en Latinoamérica en español que de una perspectiva amplia de los protocolos básicos para el manejo del polen de pino. Este manual fue escrito específicamente para brindarle a los profesionales forestales hispanohablantes en Latinoamérica y otros lugares una guía de referencia, detallando métodos actuales para la recolección, secado, y almacenamiento de polen procedente de pinos tropicales y subtropicales en rodales naturales. Aunque existen muchos programas sofisticados de mejoramiento genético en esta región geográfica, éste manual intenta ofrecer recomendaciones y una orientación simplificada para los profesionales forestales interesados en programas de hibridación o mejoramiento genético forestal. Una referencia excelente para cruces controlados con *Pinus radiata* D. Don fue realizada en español por una unión cooperativa universidad/gobierno/industria forestal en Chile por Vergara, et al. (1995), cuya citación aparece en la bibliografía. Este manual trata específicamente con *Pinus radiata*, pero provee descripciones detalladas de actividades de mejoramiento genético forestal comunes para muchas especies de pino. Si desea información adicional, puede ser obtenida por medio de las referencias incluidas, o contactando al autor en la dirección dada al final del manual.

Contenido

Prefacio	ii
Contenido	ii
1. Introducción.	1
2. Recolección del Polen.....	2
3. Cosecha del Polen.....	7
4. Extracción y Secado del Polen.	8
5. Almacenamiento del Polen.	11
5.1. Selección de frascos para el Almacenamiento.	11
5.2. Duración del Almacenamiento Deseado.....	12
5.2.1. Almacenamiento a Corto Plazo.....	12
5.2.2. Almacenamiento a Mediano Plazo.....	13
5.2.3. Almacenamiento a Largo Plazo.....	13
6. Recomendaciones.	14
7. Agradecimientos.....	15
8. Literatura Citada.....	16
Apéndice 1. Proveedores y Equipo Básico Usado en el Mejoramiento Genético Forestal.....	19

Recolección y Manejo de Polen de Pinos Tropicales y Subtropicales **Procedentes de Rodales Naturales**

1. Introducción.

Con el aumento de la competencia global en la industria forestal, muchos líderes industriales regionales e internacionales están haciendo inversiones significativas en proyectos de plantaciones forestales en el hemisferio Sur debido a las altas tasas de crecimiento y bajos costos de producción. La rentabilidad y avance de estos proyectos en las zonas tropicales, subtropicales y templadas depende en gran parte del éxito de los programas de mejoramiento genético y las técnicas silviculturales. Muchos de los proyectos de plantaciones más exitosos han sido establecidos en Latinoamérica. Por ejemplo los éxitos en Chile, Brasil, Argentina, Colombia, y Venezuela, han definido estas compañías como fuertes competidores y frecuentemente líderes en la industria de productos forestales al nivel mundial.

Debido a sus ubicaciones y topografía, estos países ofrecen ambientes y potenciales económicos diferentes. Consecuentemente, las organizaciones en estos países cultivan especies desde latifoliadas de corta-rotación para pulpa y papel hasta pinos de mayor rotación para postes y madera. Muchas empresas también están diversificando sus portafolios de especies en estas plantaciones para balancear el riesgo y aumentar los rendimientos. Esto ocurre muchas veces por medio del establecimiento y evaluación de plantaciones pilotos de especies exóticas o la creación de híbridos para rendimientos mejorados y resistencia a plagas y enfermedades.

El desarrollo de híbridos dentro de un género se logra operacionalmente por medio de polinización controlada. El polen debe ser recolectado y en algunos casos almacenado para poder realizar los cruces deseados en la época de receptividad máxima. Mientras los protocolos están bien identificados para el manejo de polen relacionado con mejoramiento genético en eucaliptos y otras especies de latifoliadas, existe poca información relacionada con el manejo de polen de pinos tropicales y subtropicales. Las características deseadas de estas especies (resistencia a plagas, resistencia a sequías, etc.), combinadas con su adaptabilidad y propiedades de la madera favorables, han aumentado su popularidad como especies para la diversificación de plantaciones y mejoramiento en Latinoamérica.

La recolección y manejo de polen se desarrolla como una estrategia importante para el mejoramiento genético forestal y manejo intensivo de plantaciones forestales. A través de polinización controlada y técnicas de polinización masiva suplementaria, profesionales forestales pueden seleccionar individuos que expresen características deseables y para así controlar los árboles padres y realizar el cruce deseado. La contribución masculina al cruce se realiza por la recolección del polen del individuo deseado, para luego aplicarlo sobre un estróbilo femenino escogido para la fecundación y la producción de semilla. Cruces seleccionados de individuos deseables pueden producir progenie con las mismas características, y luego formar la base de selección para generaciones avanzadas.

La recolección de polen para usos agrícolas y alimenticios ha sido bien documentada a través de la historia, originados en antiguos documentos del Egipto, China, Grecia, Rusia, y Persia,

entre otros (Binding, 1980). Sin embargo, en la mayoría de los casos estas citas se refieren a la recolección de polen con respecto a miel de abeja, prevención de enfermedades, y sobre todo a la protección de la salud humana. Esto contrasta mucho con la ciencia de recolección y manejo de polen para especies forestales relativamente nueva. El interés en estos temas está aumentando diariamente, al ritmo de los avances en la tecnología y el desarrollo de nuevas prácticas.

Este manual se dirige específicamente a los profesionales forestales hispanohablantes en Latinoamérica y otros lugares para proveer una guía referencial detallando métodos actuales para la recolección, secado, y almacenamiento de polen procedente de pinos tropicales y subtropicales en rodales naturales. Aunque muchos programas sofisticados de mejoramiento genético existen en esta región geográfica, éste manual intenta ofrecer recomendaciones y una orientación simplificada para profesionales forestales interesados en mejoramiento genético forestal. Si desea, información adicional puede ser obtenida a través de las referencias incluidas o contactando al autor en la dirección dada al final de este manual.

2. Recolección del Polen.

La primera etapa en la recolección de polen es el entendimiento de la fisiología y fenología de la especie forestal. Adaptaciones naturales, diferencias climáticas, y evolución se han combinado para crear un sistema complejo de sincronización entre la producción de polen y la receptividad de las flores. La investigación científica muestra que generalmente la época de mayor dispersión del polen y también de mayor receptividad de las flores ocurre simultáneamente en pinos naturales (Boyer, 1981)(Bramlett, 1973). Sin embargo, la variación entre la producción de polen y receptividad, hasta entre individuos dentro del mismo huerto, puede limitar el cruzamiento o fecundación en la polinización abierta.

Normalmente las yemas reproductivas se inician un año antes de la aparición de los estróbilos microesporangios (masculinos) y megaesporangios (femeninos) en pinos. En todo el género, el polen se caracteriza por un cuerpo central de forma ovoide flanqueado por dos sacos aeríferos, y está producido en los sacos polínicos en la base de las hojas catafilares fértiles. Los nombres comunes para estas estructuras reproductivas son “catkins”, “flores masculinas” o “estróbilos masculinos”. Los estróbilos masculinos se producen normalmente en las ramas de lento crecimiento en la copa inferior del árbol, una evolución natural para evitar auto-polinización. Se produce los estróbilos femeninos en la copa superior del árbol y aunque las coníferas no producen flores verdaderas (Nel, 2002), se utiliza este término popularmente entre profesionales forestales para referir a los estróbilos megaesporangios. Para evitar errores y expresiones regionales, los términos “estróbilo masculino” y “estróbilo femenino” se usarán para lograr las metas de este reporte.

Las yemas se desarrollan para formar estróbilos megaesporangios femeninos o microesporangios masculinos durante su primer año (Figura 1). La temperatura del aire ambiental, la elevación sobre nivel del mar, y la precipitación son los factores más importantes en el desarrollo y la dispersión del polen. Lluvias tempranas que ocurren antes del comienzo de la época lluviosa (similares a las lluvias veraniegas tardías en zonas templadas) pueden favorecer el desarrollo de estróbilos masculinos sobre el desarrollo de los estróbilos femeninos en muchas especies de pinos (Bengston, 1969). El ritmo del desarrollo de los

estróbilos masculinos (y femeninos) aumenta durante la siguiente época lluviosa, después del estado latente, y la dispersión del polen comienza durante la época seca siguiente (dependiendo de la temperatura y la humedad ambiental). Estos ciclos cambian mucho en ambientes tropicales, donde las especies pueden producir estróbilos masculinos y femeninos todo el año (Isaza, comunicación personal 2003), aunque existe una época de producción y receptividad máxima debido a las influencias climáticas (sequías, lluvias temporales).

Como se mencionó previamente, la sincronización de la máxima dispersión de polen y la receptividad del estróbilo femenino es generalmente simultánea, aunque la fecha de ocurrencia de estos picos pueda variar apreciablemente cada año. Las temperaturas inferiores al promedio retardan el desarrollo del

Ciclo de Vida del Pino

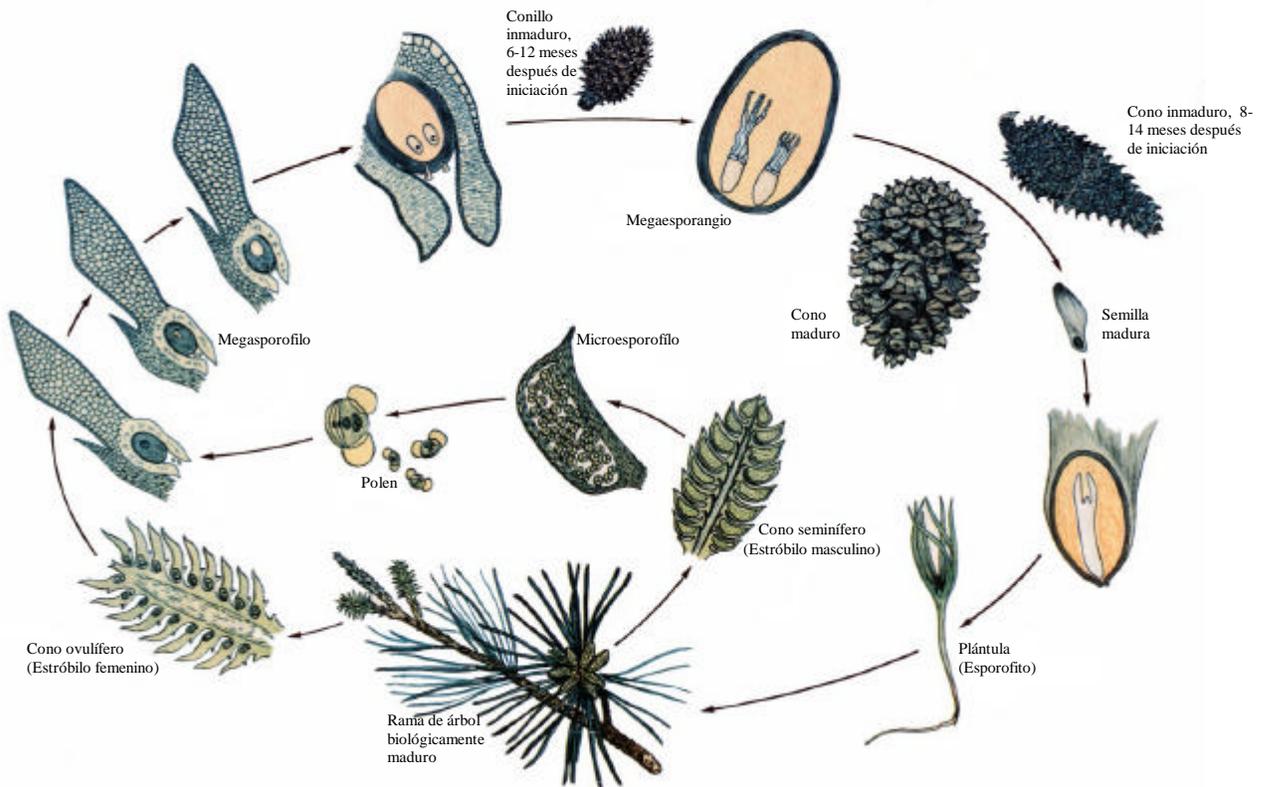


Figura 1. Ciclo de vida del pino. Reprinted with permission from Carolina Biological Supply Company. Translated from the original English into Spanish by Michael E. Tighe

polen considerablemente, mientras las temperaturas por encima del promedio avanzan el desarrollo anticipado para la mayoría de las especies. Los estróbilos masculinos se desarrollan y maduran durante el verano o en épocas secas hasta que el nivel de humedad disminuye a un valor predeterminado por la naturaleza y los estróbilos masculinos comienzan a abrir. Las escamas de polen abren y liberan el polen, el cual en pinos es dispersado por el viento (polinización anemófila). Se han utilizado varios métodos para calcular el tiempo de la dispersión máxima del polen, incluyendo el método de días-grados utilizado extensamente en agricultura. Un método bien investigado para determinar el desarrollo del polen y la época para su recolección fue desarrollada por Bramlett y Bridgwater (1989), el cual describe las etapas del desarrollo de los estróbilos masculinos que puede ser comparadas al sistema del desarrollo del estróbilo femenino. Las épocas del año preferibles para la recolección del polen se basan en las etapas del desarrollo de los estróbilos masculinos por medio del sistema de clasificación y desarrollo del polen (SCDP) en Tabla 1.

Tabla 1. SCDP-Sistema de Clasificación y Desarrollo de Polen (*Pinus taeda*—autor)*

Etapa 1.0 Se puede distinguir los estróbilos masculinos en el otoño como yemas individuales por el brote vegetativo, pero están encerradas por las escamas foliáceas.

Etapa 2.0 Los estróbilos individuales emergen de sus escamas foliáceas protectoras, y se alargan lentamente desde noviembre a febrero.

Etapa 3.0 Las microsporofilas individuales se desarrollan mientras los estróbilos aumentan en longitud sobre un período extendido. Estróbilos masculinos de polen emiten un fluido transparente cuando son apretados entre los dedos.



Figura 2. Estróbilos masculinos *Pinus maximinoi* en aproximadamente Etapa 3.3 en Guatemala (Foto cortesía de Elmer Gutiérrez).

Subetapa 3.3 Los estróbilos masculinos de polen exudan un fluido amarillo cuando son apretados entre los dedos. Esta etapa ocurre 7-10 días antes de la dispersión del polen.

Subetapa 3.6 Los estróbilos masculinos aumentan aún más en longitud y emiten un fluido transparente cuando son apretados entre los dedos. Esta etapa ocurre 3-5 días antes de la dispersión del polen.

Subetapa 3.9 Muy poco (o ningún) fluido puede ser forzado del amento. Las microsporofilas ya están dividiéndose. Los estróbilos masculinos pueden ser doblados fácilmente y es posible notar espacios entre las esporofilas. Los estróbilos masculinos son livianos y al doblarse dan una sensación de goma. Esta etapa ocurre aproximadamente 1-2 días antes de la dispersión del polen.

Etapa 4.0 Las microsporofilas comienzan a dispersar el polen. La dispersión del polen comienza en la base y se desarrolla hacia la cumbre del estróbilo. El polen dispersado del racimo es menos del 10 por ciento del total.

Etapa 5.0 Máxima dispersión de polen del racimo de estróbilos masculinos. La mayoría de los estróbilos individuales dentro del racimo están dispersando polen. La dispersión puede ser dividida en subetapas basado en una estimación visual del por ciento del polen dispersado del racimo de estróbilos masculinos.



Figura 3. La dispersión de polen *Pinus oocarpa* en Colombia en aproximadamente Etapa 5.6 (Foto cortesía de Norha Isaza, Smurfit Cartón de Colombia).

Subetapa 5.2 Veinte por ciento del polen está dispersado del racimo de estróbilos.

Subetapa 5.4 Cuarenta por ciento del polen está dispersado del racimo de estróbilos.

Subetapa 5.6 Sesenta por ciento del polen está dispersado del racimo de estróbilos.

Subetapa 5.8 Ochenta por ciento del polen está dispersado del racimo de estróbilos.

Etapa 6.0 La dispersión de polen esta completa. Todas las microsporofilas han abierto y dispersado su polen. Los estróbilos masculinos están de color castaño claro a castaño oscuro y están secos.

* Excerpto de: Bramlett, D.L., and Bridgwater, F.E. Pollen Development Classification System for Loblolly Pine. Proceedings from the 20th Southern Forest Tree Improvement Conference. 1989 as cited in NCSU-TIP, 2000. --Traducido por Michael Tighe, 2004.

Después de haber dispersado de los estróbilos masculinos por el viento, el grano de polen se adhiere a la gota micropilar en el estilo del estróbilo femenino. Esto indica que la polinización ha ocurrido. Cuando el grano de polen se adhiere al estróbilo femenino y encuentra condiciones favorables para la germinación, se germina y comienza el desarrollo de la escama polínica. Posteriormente, el grano de polen comienza un período de desarrollo lento, hasta que pasa aproximadamente un año (en la mayoría de las especies) desde que aparecen los estróbilos. Luego, el ritmo de desarrollo aumenta y la escama polínica comienza a alargarse rápidamente. Se logra la fecundación, y el óvulo comienza el proceso de embriogénesis. La semilla se forma en los conos, completando el ciclo reproductivo.

La duración del ciclo reproductivo en pinos varía de acuerdo a la especie y su ubicación, y puede durar desde 9 meses hasta 4 años. La especie asiática *Pinus merkusii*, por ejemplo, tiene un ciclo reproductivo corto de 9 meses en Indonesia (Dvorak, com. pers., 2004), mientras la misma especie tiene un ciclo de 12 meses en el noroeste de Tailandia (DFSC, 2000). En el caso contrario, en los rodales naturales de *Pinus maximartinezii* en México se ha comprobado que se demoran hasta 4 años para completar el ciclo (Donahue y Mar-López, 1995) (Dvorak *et al.*, 2000). Estas adaptaciones naturales pueden ser debidas a una variedad de factores, entre ellos: las diferencias climáticas en la época de mayor crecimiento debido a la ubicación geográfica (*P. merkusii* es el único pino que se encuentra al sur del ecuador), a la competencia establecida por la presencia de malezas, incendios, o la predación de semillas (animal). Estas diferencias en la duración del ciclo reproductivo refuerzan la necesidad de entender la fenología de la especie antes de empezar las actividades de mejoramiento genético forestal.

El ritmo de la recolección de polen es muy importante, ya que la colección de estróbilos masculinos inmaduros puede resultar en la reducción de viabilidad de los granos y bajos rendimientos de semilla (Snyder y Clausen, 1974). La etapa ideal para la recolección de polen queda entre Etapas 3.6-3.9, cuando el polen está maduro, pero todavía firmemente sujetado a los estróbilos masculinos (Bramlett, como citado en NCSU TIP, 2000). El polen se comienza a dispersarse desde las escamas seminíferas hacia la base de los estróbilos más avanzados, mientras la mayoría del polen se mantiene todavía en los estróbilos normales del huerto (Brees, *et al.*, 1981). Sin embargo, cuando se llega a esta etapa puede ser demasiado tarde para lograr máximos rendimientos de polen, y la recolección temprana puede ser adelantada artificialmente utilizando las técnicas disponibles en Dorman (1976) o en Snyder (1957). Los tiempos adecuados para la recolección de polen en rodales naturales varían por especie, elevación, clima, y geografía. A medida que el rodal se encuentra más cercano al ecuador, las épocas de recolección son mucho más irregulares y hasta pueden presentarse todo el año (Mirov, 1967). Tabla 2 muestra ejemplos de las fechas distintas de recolección en rodales naturales de pino en varios países.

Tabla 2. Épocas de recolección de polen en rodales naturales.

<i>Especie</i>	<i>País</i>	<i>Meses Aproximadas de la Recolección de Polen**</i>
<i>Pinus tecunumanii</i>	Guatemala	febrero-abril
<i>Pinus taeda</i>	Estados Unidos (Zona Sureña)	abril-junio
<i>Pinus greggii</i>	México	abril-mayo
<i>Pinus oocarpa</i>	Guatemala	noviembre-diciembre
<i>Pinus maximinoi</i>	Guatemala	febrero-abril
<i>Pinus oocarpa</i>	México (zona sureña)	noviembre-enero
<i>Pinus patula</i>	México	enero-abril

**Las fechas de la recolección de polen fueron obtenidas por medio de documentación y contacto directo con miembros de CAMCORE en los respectivos países.

Los pinos tropicales y subtropicales muestran variación significativa en relación con la época de dispersión de polen en rodales naturales, como se ve en la Tabla 2. Abajo, la Tabla 3 muestra los distintos meses de recolección de polen para una sola especie, *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (PCH) plantada por fuera de su región natural de ocurrencia. Esta especie es autóctona de la zona de Centroamérica y Quintana Roo, México, y muestra patrones de desarrollo muy distintos cuando es sembrada como exótica en otras regiones. Se encontró que el desarrollo del polen de PCH tiene pobre sincronización con la presencia de flores cuando plantado es en los llanos cálidos de la zona oriental de Venezuela, pero mejor sincronizado (producía más semilla con polinización abierta) cuando es plantado en altas elevaciones o en zonas más alejadas del Ecuador (Dvorak, *et al.*, 2000). Se encontraron problemas similares con la producción de semilla cuando PCH fue plantado en Monte Dourado, Pará, Brasil (Brune, 1990).

Tabla 3. Fechas de recolección de polen de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* cuando es plantado como exótico en distintos países.

País	Meses Aproximados de la Recolección de Polen**
Brasil	mayo-julio
Venezuela	noviembre-enero
Sudáfrica	febrero-abril
Argentina	mayo-junio
Belize	noviembre-diciembre

**Las fechas de la recolección de polen fueron obtenidas por medio de documentación y contacto directo con miembros de CAMCORE en los respectivos países.

La humedad del polen varía entre los estróbilos masculinos debido a su exposición y maduración. Bramlett (como citado en NCSU-TIP, 2000) sugiere que “Recolecciones de polen no deben incluir los racimos que están en las primeras etapas del desarrollo aunque unos de los racimos del mismo árbol se están dispersando.” En un estudio no publicado en Guatemala por el autor, la humedad de los estróbilos masculinos fue analizada y relacionada a la tasa de germinación in vitro del polen de *Pinus tecunumanii*. En rodales naturales, la recolección de polen se lleva a cabo a través de la escalada de árboles seleccionados y la cosecha de los estróbilos masculinos de la copa inferior. En este caso, el escalador cosechó

todos los estróbilos cerca del fuste y los puso directamente en la bolsa de colección, mientras que los que estaban más cerca de los extremos de las ramas fueron cosechados con una podadora de mango largo (*pole pruner*) y procesados abajo manualmente. Debido a la germinación variable del polen cosechado en años anteriores, el polen fue dividido en bolsas separadas e identificado por su método de recolección para el análisis. El polen recolectado en la copa (cerca del fuste) fue inspeccionado y se encontró obviamente en una etapa más desarrollada de maduración (SCDP, Tabla 1.) que la mayoría del polen recolectado en las puntas para procesamiento abajo. Para evaluar la diferencia entre las dos etapas de polen, se realizaron dos estudios pequeños basados en el polen de estos árboles.

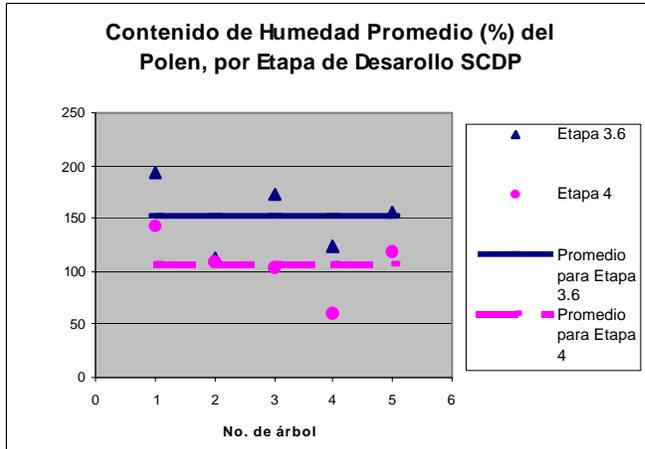


Figura 4. Contenido de humedad promedio encontrado en los estróbilos masculinos recolectados en Etapa 3.6 y 4 según el sistema SCDP en Bramlett y Bridgwater, (1989).

El primer estudio se dedicó a la evaluación de la diferencia entre el contenido de humedad de los estróbilos masculinos en las dos etapas (Etapas 3.6 y 4 en Tabla 1). Por esta razón, los estróbilos fueron cosechados asignándoles el número de su etapa de desarrollo, y puestos en bolsas plásticas bien selladas. El polen cosechado en la copa (cerca del fuste) fue casi siempre de Etapa 4, más maduro que el polen de la punta de las ramas. La Figura 2 muestra el contenido de humedad promedio de las muestras en ambas etapas. Estos datos fueron recolectados para ayudar en el

asesoramiento de la conexión entre el contenido de humedad (%CH) y la germinación, cuando se compararon con los datos de germinación del polen *P. tecunumanii* recolectado en las mismas etapas SCDP. Esta información servirá consecuentemente para enfocar las actividades de recolección. El polen de etapa 3.6 (recolectado de las puntas de las ramas con la podadora de mango largo) fue mucho más húmedo que el polen de Etapa 4 recolectado en la copa del árbol cerca del fuste.

3. Cosecha del Polen.

El segundo experimento se concentró en una comparación entre la humedad del polen y su germinación para usos operacionales en programas de mejoramiento genético forestal. Por lo cual, el polen fue tratado de igual forma, y se sometió al aire ambiental solamente lo suficiente para inducir la apertura de los estróbilos para liberar su polen (48 horas). Luego, el polen fue embotellado individualmente y evaluado por su contenido de humedad individual y promedio, tanto

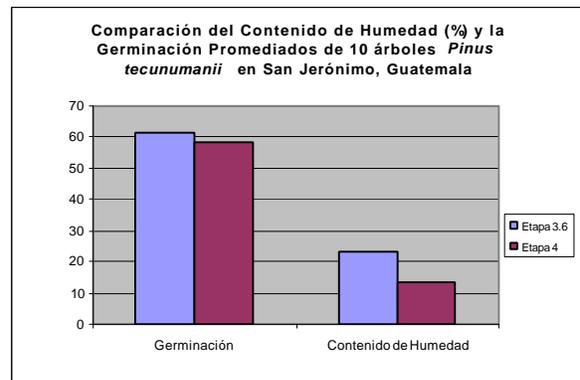


Figura 5. Comparación de la germinación y contenido de humedad para polen cosechado en Etapas 3.6 y 4 como identificado en Bramlett y Bridgwater (1989)

como su porcentaje de germinación in vitro. Figura 5 muestra los promedios de estos cálculos. El polen de la Etapa 3.6 (recolectado de las puntas de las ramas con una podadora) retuvo mayor humedad que el polen de Etapa 4 recolectado cerca del fuste, aún después de haber sido expuesto de forma igual a la humedad ambiental en el proceso del secado al aire libre. Sin embargo, las muestras húmedas de la Etapa 3.6 tenían esencialmente el mismo porcentaje de *germinación* que el polen más seco y maduro de la Etapa 4. Entonces, los resultados de este estudio sugieren que las veces que sea necesario recolectar polen a gran escala, parece ser aceptable cosechar todos los estróbilos posibles de ambas zonas del árbol, y mezclarlos para el secado. Esto resulta en una mezcla aceptablemente homogénea, y permite al escalador cosechar una cantidad de polen suficiente para un programa de mejoramiento escalando el árbol de una sola vez (mayor eficiencia).

El polen para mezclas en bulto debe ser recolectado de (como mínimo) 20 árboles para mantener la mayor proporción de la variación genética. Este número es procedente de estudios de investigación sobre la variación alélica en estudios de semilla (Dvorak, *et al.*, 1999) y se considera suficiente para analizar todos los alelos que ocurren en frecuencias de 5% o más dentro de poblaciones grandes y pequeñas. Se debe recolectar el polen de árboles esparcidos naturalmente por el sitio para capturar las diferencias genéticas y representar las diferencias climáticas entre micrositos que puedan influir la calidad del polen.

Los estróbilos masculinos deben ser recolectados en racimos, y puestos en bolsas construidas de un material permeable que permita la salida y extracción natural de la humedad (como una bolsa de papel Kraft). Se deben poner los racimos en la bolsa con no más de 2.5 cm de estróbilos de espesor para mejorar el secado y disminuir la probabilidad de pudrición debido a la presencia de hongos (NCSU-TIP, 2000). Es imperativo que cada bolsa esté bien rotulada, con una identificación única, y que ésta información esté guardada en los archivos. De esta manera, los árboles que producen polen consistentemente bueno o de baja calidad pueden ser cosechados de manera preferencial en los años posteriores. Esto también provee información adicional para programas de mejoramiento genético sofisticados que se pueden beneficiar del conocimiento estricto de la genealogía, tal como el manejo de consanguinación o autofecundación (Griffin, 1990). Estas etiquetas únicas de identificación deben seguir el material hasta el fin de la producción de semillas y cruzamiento para asegurar la información de linaje y la historia genética adecuada. La atención a los detalles y la representación suficiente de la población son las claves en la investigación genética forestal.

4. Extracción y Secado del Polen.

En zonas remotas de difícil acceso, la extracción de polen de los estróbilos masculinos se puede lograr de varias maneras. Un método económico comienza con las bolsas Kraft (*Kraft paper bags*) cargadas de racimos de estróbilos de no más de 2.5 cm de espesor como se mencionó previamente en la Sección 2

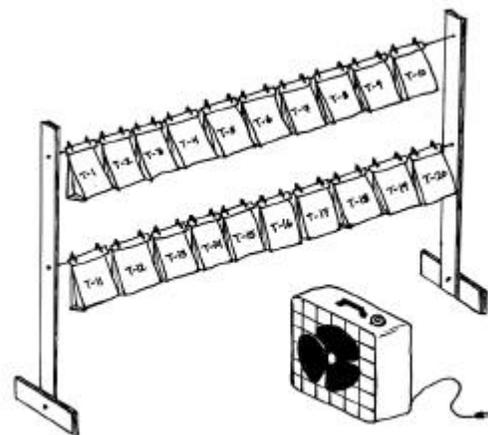


Figura 6. Un método rústico para la extracción de polen utilizando bolsas de papel Kraft, aire cálido y ventilación suficiente.

(véase Figura 6.). Se deben cerrar bien las juntas o uniones de las bolsas Kraft con cinta adhesiva para evitar el escape de polen mientras los estróbilos liberan su polen. Posteriormente, se cuelgan las bolsas en un salón cálido (32-38°C) con la humedad relativa baja (menor del 40%) y con un ventilador eléctrico (*standard oscillating fan*) para propiciar el movimiento del aire (NCSU-TIP, 2000) (Beers, *et al.*, 1981) (Sprague y Snyder, 1981). Dependiendo de las condiciones ambientales, las escamas seminíferas se deberían abrir y



Figura 7. Un método simple para la limpieza de polen. Después de la extracción primaria, se pasa el polen por tejidos sucesivamente más finos para sacar restos y larva de insectos. (La foto muestra polen *Pinus tecunumanii* en Guatemala.)

comenzar a liberar el polen después de 2 días. En este momento, el contenido de las bolsas debe ser descargado en el colador de suelo—conocido técnicamente como “tamiz de suelo” (*soil sieve*)—cuidadosamente; cortando la esquina de la bolsa Kraft y vertiéndola sobre el colador. Luego se vierte el contenido sobre un colador No. 35 (.0197” malla) para separar el polen de los restos del estróbilo. Se pueden agitar los estróbilos suavemente con un pincel blando hecho de fibras naturales (*natural hair brushes*), para alcanzar rendimientos altos (Figura 7.). Después, el polen previamente pasado por el colador No. 35 debe ser pasado por el más fino No.60 (.0098” malla) y luego el colador No. 120 (.0049” malla) colador (Gutiérrez, 2004, com. personal). Estas etapas extraen aún más de los restos y escombros del estróbilo, pero

también sacan la mayoría de las larvas de la peligrosa mosca de sierra (“sawfly”, *Neodiprion*, spp.) y otros insectos. Estas etapas son importantes tanto para mantener la viabilidad como para evitar la distribución de plagas dañinas. El polen debe ser almacenado en un contenedor temporal y hermético después de la limpieza. Los proveedores y los costos aproximados para realizar estas actividades de extracción se encuentran en este manual en el Apéndice 1.

Sistemas adicionales para la extracción de polen también son efectivos, aunque pueden requerir de infraestructura e inversión adicional. Varios mecanismos como bolsas de aislamiento (se pueden usar “sausage casings”), cámaras secadoras, etc. están descritos en Sprague y Snyder (1981) y NCSU-TIP (2000). Estos sistemas pueden ser más aptos para programas sofisticados y resultan en un producto más limpio y seco con menor inversión en la mano de obra requerida.

Cuando el polen ha sido separado de todos los desechos externos, el contenido de humedad debe ser calculado antes de su almacenamiento. Esta es una etapa muy importante, la cual determina si el polen requiere secado adicional o no. El mantenimiento de niveles de humedad bajos es clave para el almacenamiento exitoso del polen (Jett y Frampton, 1990). Existen métodos sofisticados y baratos de evaluación del contenido de humedad, pero un método simple requiere sólo una bandeja de aluminio para pesar (resistente al calor), una balanza estándar Mettler® (que lea hasta 4 lugares decimales) y un horno secador de laboratorio (*convection oven*).

Primero, el horno secador debe ser prendido a una temperatura de 100°C (usando un termómetro de laboratorio—*laboratory thermometer*). Segundo, la bandeja de pesar

(*aluminum weigh boats*) se pesa en la balanza Mettler y se tara su peso. Se debe apuntar el peso, luego cargar la bandeja de pesar con aproximadamente 0.5-1 gramos de polen, esparcido uniformemente, y anotar el peso total. Esto medirá el peso total “verde” (el polen natural más el peso de la bandeja de pesar). Después, la bandeja de pesar con el polen debe ser introducida en el horno secador por una hora (como mínimo). Eso extraerá toda la humedad de la muestra. La bandeja junto con el polen debe ser pesada inmediatamente después de sacarla del horno para asegurar que la muestra no absorba humedad ambiental. Este peso representa el peso total “seco”. Luego, se utilizan estos números en la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Contenido de humedad} = \frac{(\text{peso de polen 'verde'}) - (\text{peso de polen seco})}{\text{peso de polen seco}} \times 100$$

Para almacenar, Moody (1988) comentó que en general para evitar el deterioro significativo del polen almacenado (también citado en NCSU-TIP, 2000), el polen de pino debe tener menos del 10-15% de contenido de humedad (%CH). Otras recomendaciones varían entre 7-20%CH, dependiendo de la especie y la duración de almacenamiento deseada (Snyder, 1957) (Jett y Frampton, 1990) (Bonnet-Masimbert y Webber, 1995) (Hoekstra, 1992) (Lanteri *et al.*, 1993) (Siregar y Sweet, 2000). Hoekstra (1992) explica que no se puede detectar la respiración fisiológica del polen con contenidos de humedad menor del 20%CH. También explica que en polen con un CH entre 10-15% no existe agua libre (disponible) para transporte intracelular. Si el polen es activo fisiológicamente bajo cualquier método de almacenamiento, la viabilidad disminuye rápidamente y las prácticas de almacenamiento se vuelven inútiles. El control del contenido de humedad es esencial para el almacenamiento exitoso del polen. En la gran mayoría de los pólenes de pinos, 6-8%CH es recomendado para almacenamiento bajo refrigeración, pero el polen almacenado entre 3-5%CH parece mantener su viabilidad mejor cuando es congelado o almacenado criogénicamente (vea Sección 5). Un contenido de humedad inferior al 16% también asegura que las larvas de *Neodiprion*, spp., en el caso de estar presentes, serán eliminadas (Sprague y Snyder, 1981).

Por medio de experiencias en CAMCORE, aprendimos que si el contenido de humedad en polen de pinos tropicales o subtropicales es mayor o igual al 10%CH, el polen debe ser secado antes del almacenamiento. Muchas instituciones dedicadas al mejoramiento genético han logrado bajar el contenido de humedad en el polen de especies de pino por medio de un secado sobre sílica gel (Sprague y Snyder, 1981) o liofilización con un “freeze dryer” (Ching y Ching, 1964) (Layne y Hagedorn, 1963), pero el polen debe ser monitoreado cuidadosamente para evitar su sobresecado. La humedad del polen puede ser reducida también de manera similar a la de la Sección 4—Extracción y Secado del Polen. El polen debe ser vertido en bolsas de papel Kraft con las juntas selladas y puestas en un horno secador con una temperatura muy baja (29°-30°C). Un horno secador de aire forzado (*forced-air oven*) funciona mejor (Figura 8.), forzando el aire cálido por encima de las bolsas de papel para absorber y extraer la humedad entre las fibras del papel Kraft. Jett y Frampton (1990) encontraron que el régimen de humedad en el polen es muy semejante al régimen en muestras de madera, y sus necesidades para el secado son similares. Generalmente, para secar polen de pino desde 14%CH a 5%CH de esta manera demora aproximadamente 6 horas (Tighe,



Figura 8. Un horno secador de aire forzado de marca Precision® aceptable para el secado de polen en 29-30° C.

datos no publicados). El polen se debe monitorear durante el secado, y el contenido de humedad se debe medir antes de remover las muestras del horno.

Cuando el polen alcanza el %CH deseado para almacenamiento, se descarga el contenido de las bolsas de papel en los contenedores de almacenamiento permanentes. Estos contenedores deben ser herméticos y sus orillas bien selladas con Parafilm™ u otro sellador similar para evitar la absorción de humedad durante el almacenamiento.

5. Almacenamiento del Polen.

La sincronización de la dispersión del polen y el período de receptividad floral, junto con las necesidades para hibridación entre especies, y el deseo de reintentar polinizaciones no exitosas son algunos de los factores que determinan la necesidad para el almacenamiento del polen. Estos factores también demuestran las distintas necesidades en los programas de mejoramiento genético forestal, desde el almacenamiento de corto plazo a mediano y largo plazo. El polen puede ser reservado por unos cuantos meses, o guardado por años dependiendo de las metas del programa de mejoramiento.

5.1. Selección de frascos para el Almacenamiento.

Cuando el polen ha sido secado hasta el contenido de humedad deseado, el polen debe ser colocado en un frasco hermético para su almacenamiento. La selección del frasco depende del método de polinización controlada a ser utilizado. Se puede lograr la polinización utilizando bolsas de aislamiento (*natural or microfiber bags*) y pinceles de pelo de camello, jeringas, (Moody y Jett, 1990) (Bramlett y O’Gwynn, 1981), u otros polinizadores distintos desarrollados por programas forestales de investigación. Se puede encontrar una buena descripción de varios métodos en Bramlett y O’Gwynn (1981). Un ejemplo de esto es el polinizador de ciclón (“cyclone pollinator”, Figura 9) desarrollado por el USDA Laboratorio del Servicio Forestal juntos con Weyerhaeuser, y provee un método eficiente de polinización. Cada vez que el bulbo de goma es apretado, el aire generado expele aproximadamente 1cc de polen en la bolsa de aislamiento en una nube grande, con un movimiento giratorio que mejora la distribución del polen. El depósito del polen plástico del polinizador permite que el usuario lo cargue con aproximadamente 10cc de polen por vez. Entonces, si quiere polinizar con este instrumento, frascos de 10cc (*10cc screw top vials*) serán eficientes para el almacenamiento del polen, permitiendo el usuario cargar el depósito del polinizador y polinizar aproximadamente 10 bolsas de aislamiento con exposición mínima al aire y humedad ambiental. Similarmente,



Figura 9. Polinizador de ciclón armado en CAMCORE, basado en los diseños de la Cooperativa NCSU-TIP y MeadWestvaco.

la capacidad del polinizador debe ser determinada antes de la selección de los frascos para todos los instrumentos, para asegurar que solo la cantidad justa de polen será sacada del almacenamiento diariamente. El polen utilizado para polinización en masa (en cantidad) puede ser almacenado en volúmenes más grandes, tales como los frascos de polen de 175cc (*marca Nalgene®*) que se muestran en la Figura 10. Cada vez que el polen se expone a temperaturas más altas y a ambientes húmedos disminuirá la viabilidad del polen y anulará los efectos del almacenamiento del polen. El contenido de humedad y la temperatura son los dos factores que más influyen en la longevidad del polen en su almacenamiento (Wang, *et al.*, 1993).

5.2. Duración del Almacenamiento Deseado.

Las distintas metas y necesidades de varios programas forestales requieren distintos períodos de almacenamiento del polen para lograr sus fines. Generalmente, a medida que se extiende



Figura 10. Frascos de 175cc de polen tropical, subtropical, y templada en almacenamiento, CAMCORE.

el período de almacenamiento deseado, la temperatura utilizada para su almacenamiento disminuye (Siregar y Sweet, 2000). Las especies plantadas en las zonas tropicales, subtropicales, y templadas pueden exhibir diferencias en su máxima dispersión de polen con respecto a y su máxima receptividad floral, obligando al profesional forestal a almacenar el polen hasta que los estróbilos femeninos alcancen su período de receptividad máxima. Normalmente, esto requiere almacenamiento a corto plazo de sólo unos meses (hasta 6 meses).

Otros programas pueden tener producción precoz de polen y de estróbilos femeninos, o simplemente desarrollan un polimix de pólenes que desean replicar el próximo año. También incluidos aquí son los programas que pierden la época de polinización y deben esperar hasta el próximo período. Estos constituyen almacenamiento a mediano plazo (6-18 meses). La última situación incluye el almacenamiento de polen vivo en estado de latencia por años, y se usa frecuentemente con esfuerzos de conservación o bancos genéticos de polen para protección permanente. Esto es almacenamiento de largo plazo (18 meses-perpetuidad). Los tres métodos son evaluados en detalle abajo, respaldados con datos preliminares de ensayos de germinación realizados por el autor.

5.2.1. Almacenamiento a Corto Plazo.

El polen en estado de latencia puede ser almacenado en el corto plazo por varios métodos (Layne y Hagedorn, 1963). Con el polen de pino, la manera más efectiva para realizar su almacenamiento a corto plazo es bajo refrigeración a 4°C. Esto resulta en un almacenamiento efectivo hasta aproximadamente un año, pero luego tiende a disminuir rápidamente. Siregar y Sweet (2000) reportan, “No existe una ventaja en almacenar polen secado al 10%CH a -20° C (congelamiento—*autor*) si sólo se requiere un año de almacenamiento.” Este es el mejor método para intervalos cortos entre la disponibilidad de polen y la receptividad de estróbilos femeninos, o para cruces realizados en zonas alejadas de la zona de recolección de polen.

5.2.2. Almacenamiento a Mediano Plazo.

El almacenamiento a mediano plazo puede ser logrado exitosamente por medio de congelación a -20°C (Duffield y Callaham, 1959) o secado al vacío / congelación (disminuir el %CH bajo vacío, luego almacenar a -20°C) con un “vacuum dryer”. Aunque los experimentos del autor muestran resultados pobres para las muestras expuestas al secado bajo vacío, ésta practica se usa operacionalmente con varias especies de manera exitosa (NCSU-TIP, 2000). Se evita el congelamiento y el deshielo del polen por medio del uso de frascos pequeños. Ciclos repetidos de congelamiento / deshielo pueden dañar la viabilidad del polen de pino (Matthews y Kraus, 1981). Este es el método preferible a aplicar si se pierde la época de polinización, como una reserva simple de polen si factores ambientales o errores humanos causaron pobres resultados en la polinización el año anterior.

5.2.3. Almacenamiento a Largo Plazo.

Para lograr almacenamiento a largo plazo con viabilidad aceptable, el polen puede ser congelado o secado al vacío / congelamiento a los -20°C de la misma manera que almacenamiento a mediano plazo. Esto ha sido probado como un método confiable para el almacenamiento a largo plazo en muchas especies, y está disponible para la mayoría de los profesionales forestales (Hanna, 1994) (Duffield y Callaham, 1959) (NCSU-TIP, 2000) (Towill y Walters, 2000) (Jensen, 1964).

Otra manera efectiva y muy utilizada en la agricultura es la preservación criogénica. El polen de muchas especies ha sido almacenado exitosamente por criopreservación y una lista de estas especies está disponible en Hanna y Towill (1995). Criopreservación puede ser realizada por medio de Ultrafreezers o refrigeradores criogénicos (*cryogenic refrigerators*). Los Ultrafreezers generalmente almacenan el polen a los -80°C , mientras los refrigeradores criogénicos usan inmersión bajo nitrógeno líquido para llegar a los -196°C . Ambos métodos son efectivos, uno de los métodos requiere electricidad para mantener la temperatura baja (cortes de electricidad podrían causar daños), y el otro requiere monitoreo

constante para asegurar que el polen se mantiene en inmersión. El autor hizo un estudio utilizando un refrigerador criogénico (Figura 11), el cual dio buenos resultados después de 6 meses a los -196°C (Tighe, datos no publicados 2004). Se evaluaron también los métodos de congelación y deshielo, y resultaron mejor las prácticas de congelación lenta y deshielo lento como se sugiere en Matthews y Kraus (1981). Estos resultados con especies de pinos tropicales, subtropicales y templados son consistentes con resultados de criopreservación de polen de pino obtenido con *Pinus ponderosa* en el Laboratorio Nacional de Semillas Forestales (Nat. Tree Seed Lab.) en Colorado, EEUU (Connor y Towill, 1993).

Este método es adecuado para polen comprado o recolectado de gran valor, o polen deseado para actividades a largo plazo o de conservación permanente.



Figura 11. Frascos criogénicos de marca Nunc® (izq.) y una heladera criogénica (Der.) para almacenamiento en nitrógeno líquido.

6. Recomendaciones.

El polen en estado de latencia de pinos tropicales y subtropicales procedentes de rodales naturales puede ser almacenado exitosamente por períodos extendidos bajo un manejo responsable del polen. Por lo general, el conocimiento del comportamiento típico del polen de especies de pino parece ser aceptable para estas especies también. Sin embargo, se puede hacer unas recomendaciones para ayudar al profesional forestal en el manejo del polen:

1. Aunque de naturaleza rústica, el polen del pino responde de manera desfavorable a cambios bruscos de temperatura o humedad. Los mejores resultados parecen lograrse con cambios lentos en el ambiente del polen.
2. Una vez que se saque el polen de su almacenamiento y éste vuelve a la temperatura y humedad del ambiente, no se recomienda su re-almacenamiento. El deshielo y el congelamiento repetitivos deben ser evitados porque disminuyen la viabilidad del polen (NCSU-TIP, 2000). Es importante sacar del almacenamiento solamente el polen que se vaya a usar durante el día, y mantenerlo fresco en una nevera bajo sombra durante el día laboral.
3. Los protocolos adecuados para evaluar la viabilidad de polen por medio del análisis de germinación de grano se encuentran en Moody (1990). Existen distintas opiniones con respecto al límite mínimo de la germinación del polen para considerarlo viable, pero el 30% parece ser del rango mínimo. Debido al ciclo reproductivo largo (~24 meses) de los pinos, el polen con un porcentaje de germinación por debajo de este valor debería ser evaluado cuidadosamente, y utilizado sólo si no hay otra fuente disponible para asegurar una polinización exitosa. Callaham (1966) afirma que el polen con germinación tan baja como al 10% puede ser utilizado para obtener buenos resultados de semillas viables, pero puede ser que el polen en estas condiciones no representará la misma composición genética del lote original (Towill, 1985).

Muchos matices del manejo de polen para pinos tropicales y subtropicales todavía están por ser determinados, pero la creciente importancia de estas especies en la silvicultura de plantaciones al nivel mundial estimula investigación adicional. Este manual pretende proveer un resumen de prácticas aceptables, experiencias personales, y citas literarias para ayudar al profesional forestal en el manejo y recolección del polen procedente de rodales naturales.

Se puede obtener más información contactando al autor:

Michael E. Tighe, Research Forester
CAMCORE
NCSU Box 7626
Grinnells Labs, Rm. 1106
Raleigh, NC, USA 27695-7626
Tel: (919)-513-2264
Fax: (919)-821-0611
Email: metighe@unity.ncsu.edu

7. Agradecimientos

Me gustaría agradecer al Dr. Bruce Zobel y su esposa Barbara por la creación de la Donación Zobel para Estudios de Ciencias Forestales Internacionales en la Universidad Estatal de Carolina del Norte. Estos fondos y la inspiración de los Zobel contribuyeron mucho a mi motivación para comenzar este proyecto.

También me gustaría agradecer a Dr. Erin Sills y a Dr. Bill Dvorak por su paciencia y asistencia para realizar este proyecto.

Finalmente, la mayor porción de este conocimiento fue aprendida por medio de mis experiencias y recursos adquiridos en CAMCORE. Agradecimientos a José Luis Romero por su motivación y las oportunidades dadas de visitar estos rodales naturales. Un agradecimiento especial para los señores Elmer Gutiérrez y Mauro Gómez de CAMCORE-Guatemala quienes me ayudaron en la recolección del polen en el 2003. Su trabajo excelente y consistente en mejoramiento genético forestal brinda el conocimiento práctico para hacer posible un manual aplicado de esta naturaleza.

8. Literatura Citada.

- Beers, W.L., Bivins, J., y J.E. Mocha. 1981. Pollen Collection. In: E.C. Franklin, E. Pollen Management Handbook, Agric. Handbook 587, USDA For. Serv., Washington, D.C., p. 30-31.
- Binding, G.J. 1980. About Pollen: Health Food and Healing Agent. Thorsons Publishers Limited, Wellingborough, Northamptonshire, England. As cited on www.graminex.com.
- Bonnet-Masimbert, M. y Webber, J.E. 1995. From flower induction to seed production in forest tree orchards. *Tree Physiology*, 15, 419-426.
- Bramlett, D. L. y Bridgwater, F.E. 1989. Pollen development classification system for loblolly pine. Proc. 20th So. For. Tree Improv. Conf., June 26-30. Charleston, SC, p.116-121.
- Bramlett, D.L. y O'Gwynn, C.H. 1981. Controlled Pollination. In: E.C. Franklin, E. Pollen Management Handbook, Agric. Handbook 587, USDA For. Serv., Washington, D.C., p. 44-51.
- Brune, A. 1990. Reproductive Biology and Tropical Plantation Forestry, Ch.24 in: Reproductive Ecology of Tropical Forest Plants. Edited by K.S. Bawa and M. Hadley. UNESCO Man and the Biosphere Series, Parthenon Publishers, Park Ridge, NJ. 421 pp.
- Callaham, R.Z. 1966. Hybridizing pines with diluted pollen. Proceedings of the 8th Southern Forestry Tree Improvement Conference, June 16-17, Savannah, GA. Southern Forest Tree Improvement Committee Pub. #24.
- Ching, T.M., y Ching, K.K. 1964. Freeze-drying pine pollen. *Plant Physiology* 39:5, pp. 705-709.
- Connor, K.F. y Towill, L.E. 1993. Pollen-handling protocol and hydration/dehydration characteristics of pollen for application to long-term storage. *Euphytica* 68:77-84. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- DFSC, 2000. Conservation of genetic resources of *Pinus merkusii* in Thailand. DFSC Series of Technical Notes. TN56 Danida Forest Seed Centre, Humlebaek, Denmark.
- Donahue, J.K., y Mar-López, C. 1995. Observations of *Pinus maximartinezii* Rzed. *Madroño*. 42(1): 19-25. Published by the California Botanical Society.
- Dorman, K.W. 1976. The genetics and breeding of southern pines. USDA For. Serv. Agric. Handbook #471., Washington, D.C. 407 pp.

- Duffield, J.W. y Callaham, R.Z. 1959. Deep-freezing pine pollen. *Silvae Genetica* 8:22-24.
- Dvorak, pers. comm. 2004. Personal communication with Dr. William S. Dvorak, CAMCORE.
- Dvorak, W.S., Hamrick, J.L., y G.R. Hodge. 1999. Assessing the sampling efficiency of ex situ gene conservation efforts in natural pine populations in Central America. *Forest Genetics* 6(1): 21-28.
- Dvorak, W.S., Stanger, T.K., y Romero, J.L. 2000. *Pinus maximartinezii*. In: Conservation & Testing of Tropical & Subtropical Forest Tree Species by the CAMCORE Cooperative. College of Natural Resources, NCSU, Raleigh, NC. USA. pp. 96-105.
- Griffin, A.R. 1990. Effects of inbreeding on growth of forest trees and implications for management of seed supplies for plantation programmes, Ch.25 in Reproductive Ecology of Tropical Forest Plants. Edited by K.S. Bawa and M. Hadley. UNESCO Man and the Biosphere Series, Parthenon Publishers, Park Ridge, NJ. 421 pp.
- Gutiérrez, E. 2004. Personal communication regarding practices at the CAMCORE - Guatemala office.
- Hanna, W.W. 1994. Pollen storage in frostless and conventional frost-forming freezers. *Crop Science*. 34:1681-1682.
- Hanna, W.W., y Towill, L.E. 1995. Long-term pollen storage. In: Janick, J. (ed.), Plant Breeding Reviews, Vol. 13. p. 179-207. Wiley and Sons, New York.
- Hoekstra, F.A. 1992. Stress Effects on the Male Gametophyte. In: Cresti, M. and Tiezzi, A. (ed.) Sexual Plant Reproduction. Springer-Verlag, Berlin. pp. 193-201.
- Jensen, C.J. 1964. Pollen storage under vacuum. Royal Veterinary and Agricultural College Yearbook. Copenhagen, Denmark. Pp 133-146., as cited in: Towill and Walters, 2000 (see below).
- Jett, J. B., y Frampton, L.J., Jr. 1990. Effect of Rehydration on In Vitro Germination of Loblolly Pine Pollen. *South. J. App. Forestry*. 14(1): 48-51.
- Mirov, N.T. 1967. The Genus PINUS. The Ronald Press Company. 602 pp.
- Moody, W.R., y Jett, J.B. 1990. Effects of pollen viability and vigor on seed production of loblolly pine. *Southern Journal of Applied Forestry*. 14:1, 33-38. South Carolina Forestry Commission, Tillman, SC.
- Moody, W.R. 1988. Evaluation of loblolly pine pollen quality. Thesis (M.S.)--North Carolina State University. 68 pp.

- Lanteri, S., Belletti, P., y Lotito, S. 1993. Storage of Pollen of Norway Spruce and Different Pine Species. *Silvae Genetica*, 42,2-3. J.D. Sauerlander's Verlag. Frankfurt Am. Main.
- Layne, R.E.C., y Hagedorn, D.J. 1963. Effect of Vacuum –Drying, Freeze-Drying and Storage Environment on the Viability of Pea Pollen. *Crop Science*, 3:433-436.
- Matthews, F.R., y Kraus, J.F. 1981. Pollen Storage. In: E.C. Franklin, E. Pollen Management Handbook, Agric. Handbook 587, USDA For. Serv., Washington, D.C., p. 37-39.
- NCSU-TIP Coop. 2000. December 5, 2000 Contact Meeting Notebook. North Carolina State University Industry Tree Improvement Cooperative. Raleigh, NC. 20 pp.
- Nel, A. 2002. Factors Influencing Controlled Pollination of Pinus Patula. Master's Thesis. University of Natal, Pietermaritzburg, South Africa. 100 pp.
- Siregar, I.Z., y Sweet, G.B. 2000. The Impact of Extraction and Storage Conditions on the Viability of Radiata Pine Pollen. *Silvae Genetica*, 49, 1. p. 10-14.
- Snyder, E.B. y K.E. Clausen, 1974. Pollen handling. In: C.S. Schopmeyer, ed., Seeds of woody plants in the United States. USDA Agric. Handbook 450.
- Snyder, E.B. 1957. Pollen Handling. Proceedings of the 4th Southern Forestry Tree Improvement Conference. Jan 8-9, Athens, GA. Southern Institute of Forest Genetics, USDA Southern Forest Experiment Station. pp. 111-115.
- Sprague, J.R., y Snyder, E.B. 1981. Extracting and Drying Pine Pollen. In: E.C. Franklin, E. Pollen Management Handbook, Agric. Handbook 587, USDA For. Serv., Washington, D.C., p. 33-36.
- Tighe, M.E. 2004. Unpublished data from research pursuant to a Master's of Science degree at NC State University, Raleigh, North Carolina, USA.
- Towill, L.E. 1985. Low temperatures and freeze/vacuum drying preservation of pollen. In: Kartha, K.K., ed. Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL. 276 pp.
- Towill, L.E. y C. Walters. 2000. Cryopreservation of pollen. In: F. Englemann and H. Takagi (eds.) Cryopreservation of tropical plant germplasm: Current research progress and applications. International Plant Genetic Resources Institute, Rome. Pp. 115-129
- Vergara L., R., Ipinza C., R., y Pérez P., Erika. 1995. Manual de Cruzamientos Controlados para Pinus radiata D. Don. Cooperativa de Mejoramiento Genético UACH/CONAF/Empresas Forestales. Univ. Austral de Chile, Valdivia. 50 pp.
- Wang, B.S.P., Charest, P.J., y Downie, B. 1993. *Ex situ* storage using pollen, Ch. 3 in: Ex Situ storage of seeds, pollen and in vitro cultures of perennial woody plant species. Food and Agriculture Organization of the United Nations Forestry Paper #113. Rome. 83 pp.

Apéndice 1. Proveedores y Equipo Básico Usado en el Mejoramiento Genético Forestal

Abajo se encuentra una lista de instrumentos y equipo básico para realizar actividades de mejoramiento forestal tales como las mencionadas en el texto. Esta lista pretende dar solamente una idea de las herramientas necesitadas, unos proveedores, y el costo actual publicado en julio del 2004 para los instrumentos para la venta en los EEUU. No incluye flete, y unas herramientas no se encuentran para venta internacional de estos proveedores. La lista sirve para darle una idea del producto al profesional forestal, con su respectivo sitio web y número de catálogo para encontrar imágenes de las herramientas mencionadas y entonces identificar el proveedor adecuado según los recursos y la ubicación del programa forestal.

Artículo	Proveedor	Información de contacto	Unidades	Número de Catálogo	Costo Aprox. (US\$)
Pine Life Cycle Chart (from Non-flowering plants CD)	Carolina Biological Supply Company	2700 York Rd. Burlington, NC 27215-3398. URL: www.carolina.com	1 set (with other charts incl.)	39-8924	\$109.95
Soil Sieve set	Fisher Scientific	www.fishersci.com	3 sizes (#35, #60, #120)	04-881Q 04-881U 04-881Y	\$57.22 \$61.42 \$58.80
Cyclone pollinators	CAMCORE, USFS, or MeadWestvaco	CAMCORE, Tel: (919)-515-6424, Email: info@camcore.org	Each	-----	\$30
Sausage casings (permeable fibrous casings)-3.75" x 15"	Devro Teepak	Teepak ATTN: Janie Hackett 915 N. Michigan Ave. Danville, IL 61832 1-800-637-8121 www.teepak.com	Pack of 1000	F263360000 20000	\$464.94
Kraft paper bags 12" x 7" x 17"	ReStockIt.com	www.restockit.com	1 case of 500	#80076	\$39.57
Snap-cut Pole pruner	Forestry Suppliers, Inc.	www.forestry-suppliers.com	Each	81090	\$75.00
Precision© brand forced-air oven—4.5 ft ³ capacity	Fisher Scientific	www.fishersci.com	Each	13-254-27	\$1,702.07

Artículo	Proveedor	Información de contacto	Unidades	Número de Catálogo	Costo Aprox. (US\$)
Isotemp® Laboratory Convection oven	Fisher Scientific	www.fishersci.com	Each	13-247-625G	\$1,240.70
Standard oscillating fan	Local suppliers	Local suppliers	Each	----	\$20.00
Small, natural-hair paintbrushes	Fisher Scientific	www.fishersci.com	Pack of 12	03-670	\$23.20
Nalgene® 175ml plastic flasks (for pollen)	Fisher Scientific	www.fishersci.com	1 case—72 bottles	03-311-2B	\$127.70
Aluminum weigh boats	Fisher Scientific	www.fishersci.com	Pack of 144	08-732	\$18.90
Parafilm® wax sealing tape	Fisher Scientific	www.fishersci.com	Each	13-374-16	\$20.25
10cc glass screw-top vials	Fisher Scientific	www.fishersci.com	Pack of 144	03-339-21E	\$43.90
Cryogenic refrigerator	VWR International	www.vwr.com	Each	55709-982	\$945.00
Nunc® brand Cryo vials	VWR International	www.vwr.com	1 box of 500	66021-985	\$310.00
-80°C, 85L Ultrafreezer	VWR International	www.vwr.com	Each	14230-142	\$7,366.66
BenchTop 6K Freeze Dryer, ES® vacuum dryer	Virtis	www.virtis.com	Each	#405072	\$7,000.00
Conventional (-20°C) freezer, compact 5 ft ³	Local suppliers	Local Suppliers	Each	----	\$200.00
Conventional refrigerator (4°C), compact 4.4ft ³	Local Suppliers	Local Suppliers	Each	----	\$150.00
Laboratory thermometer, (-20-150°C)	VWR International	www.vwr.com	Each	61013-040	\$8.40