

EFECTO DEL CONTENIDO DE HUMEDAD SOBRE LA VIABILIDAD DEL POLEN DE TRES ESPECIES DE CONÍFERAS.

Nepamuceno Martínez Felipe.*
De la Garza López de L. Pilar.**

RESUMEN

Un factor importante para la conservación prolongada del polen es su contenido de humedad. Se evaluó el efecto del contenido de humedad (c.h.) sobre la viabilidad en almacenamiento de 300 a 375 días, en frascos herméticos a 4°C. El control de la humedad se efectuó a través de la aplicación de vacío (0.1 mm de presión) a distintos tiempos (0, 10, 30 y 60 minutos). En *Pinus pseudostrobus*, los altos valores de c.h. inicial (27.9%) no permitieron su reducción aceptable aún con 60 minutos de vacío, perdiendo la viabilidad. En *Pinus teocote* con un c.h. inicial de 6% el vacío alteró poco este valor y después de 300 días la viabilidad permaneció alta y sin diferencias significativas entre 0, 10 y 30 minutos de vacío; solamente 60 minutos (c.h.=5%) provocó una mayor viabilidad. Para *Abies religiosa* con c.h. y viabilidad inicial de 14.5 y 90.4% respectivamente, se obtuvieron diferencias significativas entre los cuatro tiempos de vacío y sus correspondientes contenidos de humedad después de 375 días de almacenamiento: desde 4.5% de viabilidad con un c.h. de 14.5% (0 minutos) hasta 69.4% de viabilidad con 7.2% de c.h.(60 minutos). Los contenidos de humedad entre 5 y 7% son efectivos para mantener la viabilidad del polen almacenado.

Palabras clave: Coníferas, *Pinus pseudostrobus*, *P. teocote*, *Abies religiosa*, viabilidad de polen, genética forestal.

ABSTRACT

Moisture content is an important factor for pollen storage. The moisture content of pollen of *Pinus teocote*, *P. pseudostrobus* and *Abies religiosa* were evaluated after 300

* Biólogo Investigador Titular del CENID COMEF, INIFAP-SARH.

** Bióloga Investigador Titular del CENID COMEF, INIFAP-SARH.

and 375 days of storage in sealed containers at 4°C. The moisture content was monitored through vacuum application (0.1 mm of pressure) at different time intervals (0, 10, 30 and 60 minutes). Pollen of *Pinus pseudostrobus* showed high values of moisture content, even at the minutes vacuum pressure, causing a reduction of pollen viability. On the other hand *Pinus teocote* maintained high viability at 6% moisture content. This moisture content did not change after 300 days with variation in vacuum pressure period (0, 10 and 30 minutes), besides, there was an increase in pollen viability when moisture content decrease to 5% at 60 minutes vacuum pressure. *Abies religiosa* showed significant differences in pollen viability among the different period of vacuum application and among pollen moisture content. Moisture contents between 5 and 7% were the most effective for maintaining pollen viability during storage conditions.

key words: Conifers, *Pinus pseudostrobus*, *P. teocote*, *Abies Religiosa*, pollen viability, forest genetics.

INTRODUCCIÓN

La conservación de los recursos genéticos es posible por medio de reservas naturales o estableciendo colecciones; estrategias que se denominan de conservación "in situ" o "ex situ" respectivamente. En esta última se sitúan los bancos de polen, los cuales resultan esenciales en los programas de mejoramiento genético. La conservación por sí misma cumple una importante función, no obstante el material genético aumenta su valor si se prosigue una cuidadosa evaluación del mismo, tanto para valorar su calidad como las técnicas implicadas.

En México, son escasos los estudios sobre el manejo de polen de coníferas y más aún los referidos al almacenamiento prolongado, por lo que en el presente estudio se propone evaluar la viabilidad del polen almacenado de tres especies de coníferas y la relación con sus contenidos de humedad.

ANTECEDENTES.

Experiencias extranjeras

Shoenike y Calvin (1981)¹ mencionan las ventajas de la conservación de genes en forma de polen:

a) El espacio de almacenaje se reduce. Cerca de 1 000 frascos de polen pueden ser almacenados en un espacio pequeño dentro de un cuarto, en comparación con 100 árboles que requieren de 0.4 ha o más.

b) El almacenamiento es económico. Un refrigerador doméstico puede guardar fácilmente grandes cantidades de colecciones vivas y el costo es muy bajo.

c) El almacenaje es eficiente. Se puede seguir un control fácil durante el almacenamiento y preservar muestras de todo el rango natural de una especie.

d) El manejo de registros es simplificado. Un solo registro es suficiente para contener toda la información de polen almacenado.

La desventaja del uso de los bancos de germoplasma polínico, es principalmente la conservación de la viabilidad en el almacenamiento y la renovación del polen a intervalos establecidos.

Sprague y Johnson (1977)² mencionan que los bancos de polen eliminan la dificultad de usarlo durante el mismo año de colecta, de manera que las polinizaciones controladas pueden realizarse con mejor resultado en años subsecuentes.

La producción de semillas como resultado del manejo y almacenaje del polen ha sido poco estudiada, pero autores como Livingston y Ching (1967)³, establecen que la polinización con material almacenado y fresco no tiene diferencias.

La capacidad del polen para crecer y responder a los ensayos tanto *In vivo* como *In vitro*, son un complemento que han utilizado diferentes autores para determinar la calidad del mismo. Así el método de la gota suspendida, junto con la técnica de formación de semillas, son ensayos muy usuales.

¹ Schoenike, R. E. and F. B. Calvin, 1981. "Conserving genes through pollen", pp. 84-87.

² Sprague J., R. y V. W. Johnson. 1977. "Extraction and storage of loblolly pine *Pinus taeda* pollen", pp. 20-27.

³ Livingston G., K. y K. K. Ching. 1967. "The longevity and fertility of freeze dried Douglas-fir pollen", pp. 98-101.

Snyder y Clausen (1974)⁴ presentaron un resumen detallado de las pruebas de viabilidad para muchas especies de angiospermas y gimnospermas que incluyen la composición del medio de germinación e incubación.

La calidad del polen para su uso posterior, depende de las condiciones de almacenaje. Para plazos cortos el polen puede ser almacenado (4 a 8 semanas) en envases de plástico dentro de un desecador a 4°C, mientras que el almacenaje a mediano y largo plazo requiere de un control más estricto de las condiciones ambientales para reducir la actividad metabólica del polen y la presencia de hongos y bacterias, Duffield (1954)⁵.

Wang (1975)⁶ enumeró una serie de factores que deterioran la calidad inicial del polen, estos son:

- a) Agotamiento del sustrato respiratorio.
- b) Inactivación de enzimas, hormonas de crecimiento y ácido pantoténico.
- c) Acumulación de productos secundarios metabólicos.
- d) Cambio de lípidos en la exina del polen y su autooxidación.

La mayoría de los autores coinciden en mencionar que el factor de mayor importancia durante el almacenaje es el contenido de humedad, ya que altos contenidos de ésta, promueven gran actividad metabólica, así como actividades destructivas de los hongos y bacterias contaminantes, por lo que acortan la vida fisiológica del polen, Stanley (1974)⁷, Livingston y Ching (1967)⁸ y Sprague y Johnson (1977)⁹.

Una técnica para controlar la humedad ha sido la aplicación de agentes desecadores como el cloruro de calcio o el ácido sulfúrico, que proporcionan buenos resultados, así como el secado al vacío; Snyder y Clausen (1974)¹⁰ establecieron el secado necesario para el almacenaje de varias especies forestales de Estados Unidos y proporcionaron

⁴Snyder, B., E. y K. E. Clausen. 1974. "Pollen Handling". pp. 75-97.

⁵Duffield J., W. 1954. "Studies of extraction, storage and testing of pine pollen". pp. 22-24.

⁶Wang P. 1975. "Tree seed and pollen, storage for genetic conservation possibilities and limitation". pp. 27-40.

⁷Stanley R., E. and H. F. Linskens. 1974. Pollen Biology, biochemistry and management.

⁸Livingston G., K. y K. K. Ching. 1967. "The longevity and fertility of freeze dried Douglas-fir pollen", pp. 98-101.

⁹Sprague J., R. y V. W. Johnson, 1977. "Extraction and storage of loblolly pine *Pinus taeda* pollen". pp. 20-27.

¹⁰Snyder, B., E. and K. E. Clausen 1974. "Pollen Handling". pp. 75-97.

diferentes métodos de secado que han sido usados para cada uno de los tres tipos de almacenaje:

- a) Contenedores tapados con algodón en cámaras de humedad controladas de 0 a 5°C.
- b) Contenedores herméticos en congelación a -20°C o menos.
- c) Secado en frío o al vacío de polen en ampollas selladas.

Otros autores emplearon el método convencional de almacenaje, que es a bajas temperaturas ambientales controladas con reguladores químicos de humedad, demostrando que la viabilidad del polen de pino no cambia apreciablemente cuando se almacena a temperaturas reducidas en un refrigerador doméstico.

Estudios realizados por Ching y Ching (1964)¹¹, Livingston y Ching (1967)¹² y Wang (1975)¹³, demostraron que el método de liofilización o deshidratación por congelación resulta una técnica útil que mantiene la viabilidad del polen de las coníferas por largos períodos.

En otros trabajos Hesseltine y Snyder (1958)¹⁴, intentaron conservaciones afortunadas con el método de secado al vacío con bajas temperaturas, determinando que es efectivo para muchas especies de pino; el método permite que el polen se almacene por espacio de varios años en cuartos a temperatura ambiente sin control rígido de temperatura y humedad. Actualmente, el almacenaje al vacío resulta positivo para preservar el material polínico durante largo tiempo con resultados confiables.

Experiencias en México.

Los resultados publicados sobre manejo de polen de coníferas en el país son muy escasos. Jasso (1982)¹⁵ desarrolló una investigación que fue uno de los primeros estudios prácticos en el manejo de polen en especies forestales, específicamente en *Pinus montezumae* Lamb.; el autor manejó el polen de la siguiente manera: polinización controlada en cruzamientos de árboles, polinizaciones controladas en autofecundación, así como libres, se colectó polen seco y se almacenó según el método

¹¹Ching T., N. y K. K. Ching. 1964. "Freeze-drying pine pollen", pp. 705-709.

¹²Livingston G., K. y K. K. Ching. 1967. "The longevity and fertility of freeze dried Douglas-fir pollen", pp. 98-101.

¹³Wang P. 1975. "Tree seed and pollen, storage for genetic conservation possibilities and limitation", pp. 27-40.

¹⁴Hesseltine C., W. y E. B. Snyder. 1958. "Attempts freeze-dry pine pollen for prolonged storage", pp. 134-135.

¹⁵Jasso M., J. 1982. "Ensayos preliminares de selección y cruzamientos en una población natural de *Pinus montezumae* Lamb", pp. 24-32.

estándar para uso inmediato. Se almacenó en frascos no herméticos de 50 ml con roscas y en desecadores a base de carbonato de calcio, en cuartos a temperatura ambiente que fluctuaba de 5 a 16°C; en este trabajo no se obtuvieron los porcentajes de germinación ni los contenidos de humedad debido a que el polen se utilizó inmediatamente.

Nepamuceno y Meneses (1986)¹⁶, propusieron una nueva metodología para la siembra y almacenaje de polen de pinos, mencionando que el polen que se almacene o colecte recientemente requiere de una evaluación de su capacidad de germinación para crecer normalmente, siendo estas pruebas importantes dentro de las estrategias de mejoramiento genético, producción de semillas e investigación forestal. La metodología consistió en la preparación de soluciones peso a volumen de granos de polen y la siembra por succión sobre papel filtro, utilizando el sistema *millipore*, lo que provoca siembras con densidad y distribución homogéneas; el papel filtro ya sembrado se puede colocar sobre sustrato agar o también sobre una laminilla de agua simple. El almacenamiento esencialmente utiliza frascos farmacéuticos de 5 ml que se sellan con tapas de hule más una cinta de metal a los cuales se les puede aplicar vacío.

Jasso y Vargas (1986)¹⁷ investigaron la germinación del polen de *Pinus montezumae* en diferentes soluciones nutritivas y períodos de almacenaje donde se manifestó la existencia de una fuerte variación individual en la calidad inicial del polen medido por el porcentaje de germinación y se concluyó que estas diferencias de la capacidad inicial pueden estar asociadas tanto a diferencias genotípicas como a diferencias fenológicas, o bien a condiciones de almacenaje y extracción. También en *Pinus montezumae*, se ha probado el almacenaje con envases de plástico y de vidrio, con y sin aplicación de vacío, Vargas *et al.* (1987)¹⁸, después de varios meses de almacenamiento se ha encontrado que existe una amplia variación de viabilidad entre árboles y fechas de colecta para cada individuo. Esta variación también se manifestó durante el periodo de almacenamiento donde el polen almacenado en ampollitas selladas al vacío sufrió una reducción inmediata del 30% en su germinación; sin embargo, al transcurrir 10 meses, éste polen presentó una mayor viabilidad (20 a 40%) que el polen almacenado en envases de plástico (15 a 30%).

¹⁶Nepamuceno M., F. y R. A. Meneses P. 1986. "Una nueva metodología para la siembra de polen de pinos en México". pp. 177.

¹⁷Jasso M., J., J. Vargas H. 1986. y a Muñoz O. "Fenología reproductiva de *Pinus montezumae* Lamb". Germinación de polen en diferentes soluciones nutritivas y períodos de almacenamiento.

¹⁸Vargas H., J., J. Jasso M. y A. Muñoz O. 1987. "Fenología reproductiva de *Pinus montezumae* Lamb, El Efecto de la época de colecta y el método de almacenamiento sobre la viabilidad del polen". Fitotécnica: 129-139. pp.

La única evaluación del polen almacenado a largo plazo es referida por Nepamuceno y Gómez (1988)¹⁹ en *Pinus pseudostrobus*, determinando que transcurridos siete años, el polen mantiene de un 13 a 28% de germinación en envases farmacéuticos con y sin vacío a temperaturas de 4°C. Se ha señalado también que ciertos factores ambientales pueden intervenir con el proceso fenológico de formación de polen; con estas condiciones, en *Pinus pseudostrobus* Lindl., se encontró que las bajas temperaturas (menores de 0°C) que ocurrieron durante el tiempo de esporogénesis, provocaron una capacidad germinativa muy disminuida del polen en comparación con los valores de germinación de otros años en que no se presentaron estas temperaturas, asimismo los pólenes que lograron germinar se caracterizaron por su morfología anormal, Nepamuceno (1987)²⁰.

METODOLOGÍA

Este trabajo se elaboró en tres partes, las cuales comprendieron cada una, métodos comunes y específicos como se señala a continuación:

a) Colecta y extracción de polen. Las muestras de polen se obtuvieron de árboles adultos individuales (uno por especie) ubicados en la serranía del Ajusco, D.F. Las colectas se realizaron para *Abies religiosa* y *Pinus pseudostrobus*, los días 17 y 22 de febrero de 1989 respectivamente, y para *Pinus teocote* el día 20 de abril. La extracción de polen se realizó en los días subsiguientes, se utilizaron bolsas de lona con dispositivos y tamiz para conducir el polen a frascos; estas bolsas se colocaron en el sol indirecto y corriente natural de aire. El polen obtenido se tamizó con malla de 0.15 mm con la que se limpió; éste se sometió a los tratamientos de envasado al vacío efectuando simultáneamente determinaciones iniciales del contenido de humedad y de su viabilidad correspondiente según la metodología de Snyder y Clausen (1974)²¹ La aplicación de vacío y envasado se efectuó los días 22 de febrero, 6 y 7 de marzo respectivamente para *Abies religiosa* y *Pinus pseudostrobus*, así como el 2 de mayo de 1989 para *Pinus teocote*.

b) Ensayo y aplicación de vacío. Se utilizaron frascos farmacéuticos de cristal de 10 ml con tapa de hule y con sellado hermético, se envasaron 2 g de polen por frasco. Con

¹⁹Nepamuceno M., F. y L. Gómez de O. 1988. "Viabilidad del polen de pino después de 7 años de almacenamiento", pp. 32.

²⁰Nepamuceno M., F. 1987. "Irregularidades de la germinación de polen *Pinus pseudostrobus* Lindl. por efecto de bajas temperaturas", In Memorias de resúmenes del XXII Congreso de Fitogenética. Soc. Mèx. Gen. pp. 376.

²¹Snyder B. E. y K. E. Clausen. 1974. "Pollen Handling", pp. 75-97.

el polen incluido, se procedió a extraer el aire contenido por medio de una bomba de vacío de 1/3 de HP y 0.1 mm de presión. la regulación del contenido de humedad se estableció por el control de los tiempos de vacío (minutos a horas) y cada tiempo constituyó un tratamiento: Los tiempos de vacío aplicados fueron 10, 30 y 60 minutos. Los frascos con polen de cada tratamiento, se almacenaron en refrigeradores domésticos $4 \pm 1^\circ \text{C}$.

c) **Siembra de viabilidad del polen.** El método de siembra consistió en la aplicación del sistema de succión propuesto por Nepamuceno y Meneses (1986)²², utilizando como medio nutritivo Agar al 2% + sacarosa al 4%, en cajas de Petri de 5 cm donde se sembró el polen sobre papel filtro, grado 615. La incubación fue a $26 \pm 1^\circ \text{C}$ por 5 días, bajo un diseño totalmente aleatorio con 4 repeticiones. En cada repetición la viabilidad se evaluó por determinación de los granos de polen en 10 campos de observación microscópica (10X).

Las evaluaciones de la viabilidad se efectuaron al inicio del almacenamiento, a los dos y a los cuatro meses. La viabilidad inicial se realizó de manera simultánea al envasado y vacío, a excepción de *Pinus teocote*, en donde la primera evaluación de viabilidad se hizo tardíamente. La evaluación de los primeros meses se aplicó sólo al tratamiento de vacío ligero (10 minutos), debido a la imposibilidad de extraer el polen de los frascos de 30 y 60 minutos de vacío respectivamente.

La evaluación final acumuló desde 300 hasta 375 días de almacenamiento. Al concluir este período se hicieron verificaciones de los contenidos de humedad. Conviene señalar que las muestras para viabilidad y contenido de humedad correspondieron siempre a un mismo frasco.

RESULTADOS

Pinus pseudostrobus. La viabilidad inicial para la especie fue de 43.7% con un contenido de humedad de 27.8%. En el Cuadro No. 1 se resumen las evaluaciones de viabilidad en los meses siguientes.

Se observó que el contenido de humedad con la aplicación de 60' de vacío, se redujo hasta un 15.5% y que al final del almacenamiento, éste resultó alto para mantener la

²²Nepamuceno M., F. y R. A. Meneses P. 1986. "Una nueva metodología para la siembra de polen de pinos en México". pp. 177.

viabilidad del polen. La variación de los contenidos de humedad al final del experimento, indicaron una alta interacción entre la humedad del polen en niveles extremos, lo que provocó la mortalidad del mismo.

Pinus teocote. El contenido de humedad inicial del polen fue reducido (6.0%) y considerando la evaluación de viabilidad a los 65 días de almacenaje, que fue de 58.1%, como viabilidad inicial, el polen de *Pinus teocote* se consideró como excelente en cuanto a la viabilidad inicial real. La aplicación de vacío redujo ligeramente la humedad del polen donde al final se obtuvieron niveles mínimos. La viabilidad al término del almacenaje se indica en el Cuadro No. 2.

Abies religiosa. La viabilidad del polen de *Abies religiosa* fue inicialmente de 90.4% con un contenido de humedad de 11.9%. La aplicación del vacío disminuyó el contenido de humedad hasta valores de 6.4 y 7.2% en 30 y 60 minutos de vacío.

La evaluación de la viabilidad del polen a los 130 días de almacenamiento con 10 minutos de vacío, contabilizó un 45.5%. La viabilidad al término del período de almacenaje (Cuadro No. 3), que acumuló 375 días fue diferente para cada tratamiento.

Se demostró que existen diferencias significativas en la viabilidad del polen de *Abies religiosa* por el efecto de vacío, y que al aumentar los tiempos del mismo se logra una mayor viabilidad, obteniendo un máximo de 69.4% de viabilidad con 60 minutos de vacío, (Cuadros No.4 y 5).

DISCUSIÓN

Durante el almacenamiento del polen, los factores que se consideraron como fundamentales para mantener su viabilidad son: el contenido de humedad y la temperatura de almacenamiento, Sprage y Johnson (1977)²³ La humedad del polen puede ser controlada durante su proceso de extracción por el uso de agentes desecadores y corrientes de aire seco, así como por aplicación de vacío o por combinación de estos procedimientos. En general se mencionó que el polen alcanza un punto de equilibrio de humedad con su medio ambiente y que los bajos porcentajes de contenido de humedad, son mas adecuados para disminuir la pérdida de viabilidad.

²³Sprague J., R. y V. W. Johnson, 1977. "Extraction and storage of loblolly pine *Pinus taeda* pollen". pp. 20-27.

Tratamiento de vacío (minutos)	Contenido de humedad (% de peso seco)	% De viabilidad a 90 días de almacenamiento	Contenido de humedad al final del almacenamiento	% de viabilidad a 355 días de almacenamiento
Sin vacío	27.8	-----	37.0	0
10 min.	21.0	20.0	29.6	0
30 min.	21.8	-----	24.0	0
60 min.	15.5	-----	27.2	0

Cuadro No. 1 Comportamiento de la viabilidad del polen de *Pinus pseudostrobus* en los tratamientos de vacío y contenidos de humedad.

Tratamiento de vacío	Contenido de humedad inicial (%)	% de viabilidad a 65 días de almacenamiento	Contenido de humedad al final del almacenamiento (%)	% de viabilidad a 300 días de almacenamiento
Sin vacío	6.0	-----	7.2	53.8
10 min.	5.8	58.1	6.6	50.7
30 min.	5.6	-----	5.8	58.5
60 min.	5.0	-----	5.8	69.0

Cuadro No. 2 Viabilidad del polen de *Pinus teocote* en relación con el tratamiento de vacío y contenido de humedad.

Tratamiento de vacío	Contenido de humedad (%)	% de viabilidad a 130 días de almacenamiento	Contenido de humedad al final del almacenamiento	% de viabilidad a 375 días de almacenamiento
Sin vacío	11.9	-----	13.4	4.5
10 min.	12.3	45.5	12.7	34.8
30 min.	6.4	-----	4.6	54.8
60 min.	7.2	-----	6.3	69.4

Cuadro No. 3 Efecto del vacío en la viabilidad del polen de *Abies religiosa* en relación con el contenido de humedad.

Tratamiento de vacío	sin vacío	10 min.	30 min.	60 min.
Contenido de humedad inicial (%)	11.90	12.3	6.4	7.2
	4.55	34.8	54.8	69.4
	a	b	c	d

Cuadro No. 4 El análisis de varianza realizado indica los efectos en la viabilidad debido a los tratamientos (con una $p < 0.01$). Prueba de separación medias (Tukey).

Tratamiento de vacío	Sin vacío	10 min.	30 min.	60 min.
Contenido de humedad inicial (%)	6.0	5.8	5.6	5.0
Viabilidad (X)	50.7	53.8	58.5	69.4
	a	a	a	b

En letras iguales no existen diferencias significativas al 0.05

Cuadro No. 5 El análisis de varianza aplicado, indica que existen efectos de los tratamientos de vacío o contenidos de humedad ($p < 0.01$).

Los resultados de esta investigación, mostraron que con altos contenidos de humedad inicial, como en el caso del polen *Pinus pseudostrobus* con 27.8%, los tratamientos de vacío aunque lograron disminuir la humedad hasta en 15.5% (con 60 minutos de vacío), éste porcentaje resultó alto provocando la pérdida de la viabilidad después de 355 días a 4°C. En *Pinus teocote* la humedad inicial del polen fue baja (6.0%), y la aplicación de vacío disminuyó ligeramente la humedad (5.0% con 60 minutos); en esta especie el polen no disminuyó su viabilidad y después de 300 días de almacenamiento a 4°C, no se detectaron diferencias entre los tratamientos de 30 y 10 minutos con el testigo sin vacío; sólo la aplicación de 60 minutos fue significativamente diferente con una mayor viabilidad.

Para *Abies religiosa*, la aplicación de vacío sí mostró diferencias con respecto al testigo, debido a que el contenido de humedad inicial fue intermedio (11.9%). Para esta especie se encontró una gradual conservación de la viabilidad con el aumento de los tiempos de vacío y consecuente disminución del contenido de humedad. Con 30 y 60 minutos, el contenido de humedad disminuyó hasta 6.4 y 7.2%, manteniendo estos contenidos después del almacenaje. La viabilidad que alcanzó con los tratamientos de mayor vacío fue de 54.8 a 69.4%. El contenido de humedad de 11.9%, en donde no se aplicó vacío, fue perjudicial para mantener la viabilidad del polen.

Los datos de este trabajo confirman lo reportado sobre los efectos perjudiciales de la excesiva humedad Sprage y Jonhson, *op. cit.* La aplicación de vacío promueve una reducción del contenido de humedad y primordialmente mantiene la baja humedad por periodos largos.

En varias especies de pinos, Ahlgren y Ahlgren (1978)²⁴ mostraron que el vacío (2 mm de Hg por 30 minutos) permitió mantener la viabilidad sin cambios apreciables durante un periodo de 5 años. En el presente trabajo la presión de vacío fue de 0.1 mm. con tiempos mayores y se mostró que 60 minutos resulta un tiempo adecuado para mantener la viabilidad del polen. Conviene señalar finalmente la posibilidad de promover o mejorar la germinación del polen almacenado, por medio de tratamientos de rehidratación previos, tal como se determinó en *Pseudotsuga menziesii*, Charpentier y Bonner-Masimbert (1983)²⁵.

²⁴Ahlgren C., E. y I.F. Ahlgren. 1978. "Viability and fertility of vacuum dried pollen of 5-needle species". pp. 100-102.

²⁵Charpentier J.,P. y M. Bonnet-Masimbert. 1983. "Effect of prior rehydration on the germination *in vitro* of Douglas-fir *Pseudotsuga menziesii* pollen after storage". pp. 309-317.

CONCLUSIONES

Existe un efecto del contenido de humedad en la viabilidad del polen de las tres especies de coníferas estudiadas.

El contenido de humedad inicial entre 6 y 7% para *Abies religiosa*, y del 5 al 6% para *Pinus teocote* son necesarios para mantener una viabilidad aceptable (>50%).

El contenido de humedad regulado por los tiempos de vacío durante 60 minutos y presión de 0.1 mm, proporcionó los mejores resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahlgren C., E. y I.F. Ahlgren. 1978. "Viability and fertility of vacuum dried pollen of 5-needle species". *Forest Science* 24 (2): pp. 100-102.
- Charpentier J.,P. y M. Bonnet-Masimbert. 1983. "Effect of prior rehydration on the germination *in vitro* of Douglas-fir *Pseudotsuga menziesii* pollen after storage". *Annales des sciences Forestieres* 40(3): pp. 309-317.
- Ching T., N. y K. K. Ching. 1964. "Freeze-drying pine pollen". *Plant Physiology* 39(5): pp. 705-709.
- Duffield J.,W. 1954. "Studies of extraction, storage and testing of pine pollen". *Silvae Genetic.* 8(1): pp. 22-24.
- Hesfseltine C., W. y E. B. Snyder. 1958. "Attempts freeze-dry pine pollen for prolonged storage". *Bulletin Torrey Botanical Club.* 85(2): pp. 134-135.
- Jasso M.,J. 1982. "Ensayos preliminares de selección y cruzamientos en una población natural de *Pinus montezumae* Lamb.". Tesis profesional División de Ciencias Forestales UACH. pp. 24-32.
- Jasso M., J., J. Vargas H. 1986. y. A. Muñoz O. Fenología reproductiva de *Pinus montezumae* Lamb. Germinación de polen en diferentes soluciones nutritivas y periodos de almacenamiento. *Agrociencia en revisión.*

- Livingston G., K. y K. K. Ching. 1967. "The longevity and fertility of freeze dried Douglas-fir pollen". *Silvae Genetic.* 16(3): pp. 98-101.
- Nepamuceno M., F. y R. A. Meneses P. 1986. "Una nueva metodología para la siembra de polen de pinos en México". *In Memoria de resúmenes XXI Congreso de Fitogenética. Soc. Méx. Fit. Gen.* pp. 177.
- Nepamuceno M., F. 1987. "Irregularidades de la germinación de polen *Pinus pseudostrobus* Lindl. por efecto de bajas temperaturas". *In Memorias de resúmenes del XXII Congreso de Fitogenética. Soc. Méx. Gen.* pp. 376.
- Nepamuceno M., F. y L. Gómez de O. 1988. "Viabilidad del polen de pino después de 7 años de almacenamiento". *In Memoria de Resúmenes. I Reunión Científica Forestal y Agropecuaria. Centro de Investigaciones Forestales y Agropecuarias del Distrito Federal.* pp. 32.
- Snyder B., E. y K. E. Clausen. 1974. "Pollen Handling". *Forest Service U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook No. 450.* pp. 75-97.
- Sprage J., R. y V. W. Johnson. 1977. "Extraction and storage of loblolly pine *Pinus taeda* pollen". *Fourteenth South for Tree improv. Conf. Proc.* pp. 20-27.
- Stanley R., E. y H. F. Linskens. 1974. Pollen Biology, biochemistry and management. Springer-Verlag. New York. p. 307.
- Schoenike R., E. y F. B. Calvin. 1981. "Conserving genes through pollen". *USDA Forest Service Agriculture Handbook. No. 587,* pp. 84-87.
- Vargas H., J., J. Jasso M. y A. Muñoz O. 1987. "Fenología reproductiva de *Pinus montezumae* Lamb. II Efecto de la época de colecta y el método de almacenamiento sobre la viabilidad del polen". *Fitotécnia:* 129-139. pp.
- Wang P. 1975. "Tree seed and pollen, storage for genetic conservation possibilities and limitation". *Food and Agriculture of the United Nations. Report on a pilot study on the methodology of conservation of forest genetic resources. Fo. NISC-75-(8):* pp. 27-40.