

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL

TESIS DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA
EN INGENIERÍA FORESTAL

Manejo de polen de teca (*Tectona Grandis* L.F.)

LUIS PAULINO ZÚÑIGA MIRANDA

CARTAGO, COSTA RICA

2018

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL

TESIS DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA
EN INGENIERÍA FORESTAL

Manejo de polen de teca (*Tectona Grandis* L.F.)

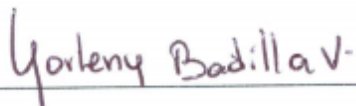
LUIS PAULINO ZÚÑIGA MIRANDA

CARTAGO, COSTA RICA

2018

CONSTANCIA DE DEFENSA PÚBLICA DE PROYECTO DE GRADUACIÓN

Trabajo final de graduación defendido públicamente ante el Tribunal Evaluador integrado por M.Sc. Yorlenny Badilla Valverde, Ph.D. Olman Murillo y M.Sc. Gustavo Torres Córdoba como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica.



Ing. Yorlenny Badilla Valverde, M.Sc.
Directora de Tesis



Ing. Gustavo Torres Córdoba, M.Sc.
Profesor lector



Ing. Olman Murillo Gamboa, Ph.D.
Profesor lector



Dorian Carvajal Venegas, MS.c
Coordinador de trabajos finales de
graduación



Luis Paulino Zúñiga Miranda
Estudiante

Índice General

Índice General	iv
Introducción	1
CAPÍTULO I. DESARROLLO DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS EN TECA.....	7
Resumen	7
Abstract	8
Materiales y métodos	10
1.1 Descripción del sitio	10
1.2 Comportamiento fenológico en el periodo reproductivo de la teca.....	10
1.3. Panículas y flores	13
1.4. Desarrollo de frutos	15
1.5. Antesis	16
1.6 Producción de panículas y frutos por árbol.....	16
Resultados.....	19
Comportamiento fenológico en el periodo reproductivo de la teca.....	19
Desarrollo de panículas, flores y frutos	22
Producción de panículas y frutos	26
Discusión	27
Conclusiones	32
CAPÍTULO II. ALMACENAMIENTO DE POLEN A CORTO PLAZO.....	33
Resumen	33
Abstract	34
Introducción	35
Materiales y métodos	36
2.1 Extracción del polen	36
2.2 Germinación del polen en diferentes concentraciones de sacarosa	38
2.3 Almacenamiento a corto plazo de polen a diferentes temperaturas.....	39
2.4 Germinación del polen en aceite de canola y en disolución de sacarosa	39
2.5 Conteo del polen germinado	40
2.6 Análisis estadístico	43
Resultados.....	44
Discusión	51
Conclusiones	53
Referencias	54

Índice de Figuras

Figura 1. Distribución espacial de los clones de teca en el huerto clonal, La Cruz de Guanacaste, Costa Rica.	11
Figura 2. Primeros ramilletes de una panícula de teca en estadio inicial de crecimiento estructural. Fuente propia.	13
Figura 3. Parámetros utilizados en la medición del desarrollo de panículas de teca. Fuente: Missouri Botanical Garden.	14
Figura 4. Desarrollo del fruto. La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. Fuente propia.	15
Figura 5. Conteo de frutos La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. Fuente propia. .	18
Figura 6. Distribución promedio de la floración en el huerto clonal (promedio) durante el periodo reproductivo de la teca en el 2016. La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. Elaboración propia.	19
Figura 7. Distribución promedio de la presencia de fruto verde en el huerto clonal (promedio) durante el periodo reproductivo de la teca en el 2016. La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. Elaboración propia.....	20
Figura 8. Diámetro promedio del fruto de teca con cáliz fructífero. La Cruz de Guanacaste, Costa Rica.	24
Figura 9. Maduración del fruto de teca aún envuelto en el cáliz fructífero. La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. Fuente propia.	24
Figura 10. Proceso de antesis en teca. La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. Fuente propia	25
Figura 11. Continuación del crecimiento vegetativo posterior al periodo reproductivo. La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. Fuente propia.	29

Figura 12. Figura 12. Visitadores atraídos por el néctar de las flores de teca, La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. Fuente propia.	30
Figura 13. Proceso de extracción y procesamiento de polen.	37
Figura 14. Eppendorf con polen de teca extraído (fondo) posterior a la separación y tamizaje de residuos florales. Fuente propia.	38
Figura 15. Conteo de los granos de polen. La Cruz de Guanacaste, Costa Rica.	42
Figura 16. Porcentaje de germinación en función de los tratamientos (Genotipo - Concentración de sacarosa - Horas de estadía en el medio). Elaboración propia.	45
Figura 17. Porcentaje de germinación en función de los tratamientos (Semana - Genotipo - Temperatura). Elaboración propia..	47
Figura 18. Estigma de la flor de teca, adhesión del polen.	49
Figura 19. Porcentaje de germinación en función de los tratamientos (Clon- Horas de estadía en el medio). Elaboración propia.	50

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Parámetros en la estimación porcentual de las evaluaciones fenológicas en cada individuo presente en el huerto clonal en La Cruz de Guanacaste, Costa Rica.	12
Cuadro 2. Formulario de campo para evaluar la presencia de flores y frutos en las panículas de los genotipos del huerto clonal La Cruz de Guanacaste, Costa Rica.	12
Cuadro 3. Registro del crecimiento de la panícula y aparición de flores de teca, Peñas Blancas, La Cruz de Guanacaste, Costa Rica.	14
Cuadro 4. Genotipos de teca con presencia de floración mayor a un 50% en sus panículas en el mes de julio 2016, La Cruz de Guanacaste, Costa Rica	21
Cuadro 5. Desarrollo estructural de panículas de teca, La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. Elaboración propia.	22
Cuadro 6. Dimensiones finales de panículas de teca en un mes de monitoreo, La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. Elaboración propia.	23
Cuadro 7. ANDEVA del ensayo de germinación de polen de teca a diferentes concentraciones de sacarosa. Elaboración propia.	44
Cuadro 8. ANDEVA de polen de teca procedente de tres machos, sometido a tres periodos de almacenamiento y a tres temperaturas de germinación. Elaboración propia.	46
Cuadro 9. ANDEVA de la germinación del polen en aceite de canola y disolución de sacarosa. Elaboración propia.	48

Introducción

El mejoramiento genético es la aplicación de técnicas de selección y recombinación de genes, que considera la herencia genética y la variación natural de una especie, con el fin de aumentar la frecuencia de alelos favorables de las características de interés en una población dada. Esta serie de técnicas están destinadas a aumentar la productividad y rentabilidad de la actividad económica forestal; además de mantener la variabilidad genética de la especie (Fonseca 2010).

Una técnica utilizada en el mejoramiento genético forestal es la polinización controlada, la cual es importante para crear progenies o descendencias que contengan los genes de cada uno de los dos progenitores, previamente conocidos. El uso de la polinización controlada en los cruces es fundamental para maximizar la ganancia genética, producir una siguiente generación de mayor productividad y calidad, y lograr un mayor control genético de la población (Fonseca 2010).

En los programas de conservación y mejoramiento genético forestal, es de suma importancia alcanzar una segunda generación filial, ya que las proporciones en las cuales los descendientes se desarrollan y dividen, en la primera y segunda generación, presumiblemente se mantienen vigentes para toda la progenie posterior (Eleotério, Resende, Da Silva, Ribeiro 2011). De esta forma se conocen rápidamente las progenies con caracteres dominantes y recesivos en una población determinada (Mendel 1865).

Tectona grandis conocida en muchos países como teca, es una especie forestal latifoliada que llega alcanzar hasta los 20 m, y pertenece a la familia *Lamiaceae*. Esta especie se distribuye naturalmente en el sureste de Asia, específicamente en India, Myanmar, norte de Tailandia y la parte oeste de Laos (Keiding 1993).

Las flores de esta especie son muy pequeñas, pero aparecen en grandes panículas. Son funcionalmente hermafroditas, por lo tanto, tiene órganos femeninos y masculinos en una misma flor (Bryndum y Hedegaard 1969, Egenti 1978). Presenta inflorescencia en grandes panículas, multiramificadas, axilares y terminales con respecto a las ramas, corola campanulada y blanca, de 6 a 8 estambres que

sobresalen. El estilo sobresaliente, estigma diminuto, marcadamente bilobado. El fruto subgloboso, drupáceo, mide de 20 a 30 mm de largo y 20 a 25 mm de ancho, densamente lanado; con cuatro semillas (Missouri Botanical Garden 2015).

Se reporta que la época de floración y fructificación de esta especie varía dependiendo de las condiciones climáticas. En Costa Rica, la floración ocurre durante la época lluviosa, desde inicios del mes de junio y se extiende hasta el mes de noviembre. Mientras que los frutos se observan en plena madurez desde finales del año y con mayor concentración, en los meses de enero y febrero.

Actualmente, la teca es muy utilizada en reforestación en prácticamente todo el mundo tropical y subtropical (Missouri Botanical Garden 2015). En Costa Rica, Según la Oficina Nacional Forestal (ONF, 2015), esta especie reporta un alto valor comercial que le permite posicionarse como la especie más utilizada en reforestación en el país. Es por ello que, en este país, se impulsa y desarrolla importantes programas de conservación y mejoramiento genético forestal con esta especie, con el fin de aumentar la productividad y rentabilidad de los proyectos forestales (Murillo *et al* 2013).

Los genotipos utilizados en este trabajo son pertenecientes al programa permanente de vinculación en investigación y desarrollo en mejoramiento genético y silvicultura clonal GENFORES, impulsado por la Escuela de Ingeniería Forestal del TEC y un grupo de empresas reforestadoras costarricenses. Por lo que uno de los principales objetivos de este arduo trabajo fue el desarrollo de habilidades y capacidades en el manejo del polen. Este tipo de programas pretenden mejorar características deseables en los árboles de plantación comercial, tales como hábitos de ramificación, calidad del fuste, resistencia al viento, tasa de crecimiento, aparición temprana y color del duramen, adaptación a sitios marginales, reducción del turno de rotación, tolerancia a enfermedades, entre otros (Murillo, Wright, Monteuis y Montenegro 2013).

En los trabajos de mejoramiento genético, es esencial, dominar las técnicas de polinización controlada para obtener vía cruzamiento, individuos de características deseables y de alto rendimiento. Previo al trabajo de polinización, es necesario

desarrollar técnicas de cosecha, preparación y almacenamiento de polen a corto, mediano y largo plazo. Con esto se reduce la dependencia de infraestructura costosa y permite un adecuado almacenamiento asegurará la capacidad germinativa y funcional del polen para ser utilizado en el momento deseado.

Los primeros estudios sobre la polinización controlada en *Tectona grandis* L.f. fueron iniciados por Bryndum y Hedegaard (1969). Quienes describen un procedimiento de polinización controlada con bolsas pequeñas para aislar flores y bolsas grandes de algodón sobre un armazón elaborado con bambú para aislar inflorescencias enteras. El primer éxito de la polinización manual controlada fue reportado por Hedegaard (1973). Quien registró que, con polinización manual el porcentaje de flores que se desarrollaron a fruto con éxito tuvo un rango entre 6% y 60%, en promedio de 20%.

El último estudio sobre almacenamiento y germinación de polen de *Tectona grandis* L.f. fue realizado por Egenti (1997), donde se menciona que la mejor concentración de sacarosa en el medio germinativo fue del 14%; quien consideró que era un medio adecuado para germinar el polen de teca, ya que proporcionaba una germinación temprana y profusa. Se menciona también que disoluciones entre 1% y 3% provocaron ruptura de los granos de polen, donde de un 35% y 40% presentaron plasmólisis. Las experiencias reportan que el polen en condiciones ambientales no controladas es viable hasta el segundo día posterior a la antesis (Tangmitcharoen 1997). Cuando el polen se almacenó durante 35 días en un desecador (25°C en promedio), en una incubadora enfriada (5°C en promedio) o incubadora (-15°C), no hubo diferencias significativas en su viabilidad.

El presente proyecto posee una gran cantidad de material visual, y demostrativo que pertenecen a la propiedad intelectual del autor, las mismas pueden ser utilizadas solamente para fines académicos con previo permiso del autor. No así, para fines comerciales con el objetivo de lucrar con dicho conocimiento. Al igual que la obra completa, el cual se encuentra protegida bajo una Licencia Creative Commons Atribución no comercial SIn Derivadas 4.0 Internacional.

CAPÍTULO I. DESARROLLO DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS EN TECA

Luis Paulino Zúñiga Miranda

Resumen

Se realizó un seguimiento fenológico durante el 2016 en los individuos presentes en el huerto clonal de una de las empresas ubicada en La Cruz de Guanacaste, Costa Rica la cual es miembro de GENFORES, programa de mejoramiento genético impulsado por el Instituto Tecnol. Se determinó que la teca desarrolla su periodo reproductivo en los meses de junio a noviembre, donde se observa floración efectiva de julio hasta la mitad del mes de setiembre. La fructificación aparece desde julio hasta noviembre, con predominancia a partir de setiembre.

Además, se seleccionaron seis yemas a baja altura en árboles injertados que facilitaran su revisión periódica. Se rotularon con la fecha inicial. Resultando que la floración efectiva se manifiesta entre la cuarta y séptima división dicotómica de la panícula, que ocurre aproximadamente a los 11 días de iniciado su proceso de formación. Se determinó el desarrollo y el diámetro del fruto alcanzado en un mes, realizando mediciones periódicas. El fruto junto con el cáliz fructífero llegó a medir 3,2 cm de diámetro en 38 días (0,1cm/día), mientras que, la drupa ya madura alcanzó en promedio 1,8 cm.

Para el monitoreo del proceso de antesis, a las 5:30 am se seleccionó una panícula y se marcaron por medio de gazas de colores los botones florales próximos a la apertura en ese mismo día. Dicho proceso inicia con la apertura florar a partir de las 6:00am, pero con una dehiscencia completa de las anteras de los estambres a partir de las 8:00 am. En adelante y hasta el mediodía, la flor se encuentra totalmente abierta, con sus órganos reproductivos erguidos. Las anteras se oxidan a partir a las 3:00 pm, junto con el desprendimiento de la corola con los estambres.

Palabras clave: Biología reproductiva, mejoramiento genético, polen, fenología.



Esta obra está protegida bajo una Licencia Creative Commons Atribución no comercial Sin Derivadas 4.0 Internacional.

Abstract

A phenological monitoring was carried out during 2016 in the individuals present in the clonal garden of one of the companies located in La Cruz de Guanacaste, Costa Rica, which is a member of GENFORES, a genetic improvement program promoted by the Forest Engineering School of TEC . It was determined that the teak develops its reproductive period in the months of June to November, where effective flowering is observed from July to the middle of September. Fructification appears from July to November, with predominance starting in September.

In addition, six low-lying buds were selected on grafted trees to facilitate their periodic review. They were labeled with the initial date. It turns out that the effective flowering is manifested between the fourth and seventh dichotomous division of the panicle, which occurs approximately 11 days after the start of its formation process.

The development and diameter of the fruit reached in a month was determined, making periodic measurements. The fruit, together with the fruiting calyx, measured 3.2 cm in diameter in 38 days (0.1 cm / day), while the drupe, already mature, reached an average of 1.8 cm.

To monitor the anthesis process, at 5:30 a panicle was selected and the floral buttons next to the opening on that same day were marked by means of colored gauze. Said process begins with the flower opening starting at 6:00 am, but with a complete dehiscence of the anthers of the stamens from 8:00 am. From now on and until noon, the flower is completely open, with its reproductive organs upright. The anthers are oxidized at 3:00 pm, along with the detachment of the corolla with the stamens.

Key words: Reproductive biology, tree improvement, pollen, phenology.



Esta obra está protegida bajo una Licencia Creative Commons Atribución no comercial Sin Derivadas 4.0 Internacional.

Introducción

El inicio del periodo reproductivo de la teca está determinado por la aparición de las primeras panículas en su estadio inicial de crecimiento vegetativo. Estas inflorescencias pueden llegar a desarrollar más de mil botones florales. Como solo el 1-3% de las flores en una inflorescencia florecen cada día, la antesis de toda la inflorescencia ocurre durante un período de 1 a 2 meses, dependiendo del tamaño (Tangmitcharoen 1997).

La fenología de la especie varía dependiendo de las condiciones climáticas. Existen datos que reflejan que, en la India, aparecen las nuevas hojas en junio y julio, seguidas por el período de floración durante septiembre y octubre. El desarrollo del fruto finaliza en noviembre y la maduración en marzo (Seth y Kaul 1978 mencionado en Tangmitcharoen). En Indonesia, el período de floración ocurre en febrero y marzo, seguido del desarrollo de la fruta en abril y mayo. La maduración de junio a agosto y las frutas se caen en septiembre (Palupi 1996 mencionado en Tangmitcharoen 1997).

El proceso de antesis que permite a la flor a ser fertilizada inicia con la aparición de los botones florales dispuestos para la receptividad del polen durante ese día. En general, cada día solo una pequeña cantidad de flores se dispone a la apertura de sus corolas. Este evento inicia a las 7:00 am con la apertura, y se desarrolla hasta cerca de las 4:00 pm con el periodo pos-receptivo (Tangmitcharoen 1997).

Este capítulo aborda el proceso de floración y fructificación, donde el objetivo general fue determinar el proceso de desarrollo de las estructuras reproductivas de la teca en Costa Rica. De manera específica se determinó la fenología del desarrollo floral y antesis, conocer el tiempo de formación de estructuras reproductivas, estimar la tasa de producción efectiva de flores y frutos.

Materiales y métodos

1.1 Descripción del sitio

El trabajo de investigación se realizó en los individuos presentes en el huerto clonal de una de las empresas pertenecientes a GENFORES, ubicada en La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. (coordenadas 11°12'40.15" N y 85°36'45.84" O). Este lugar tiene un promedio de lluvia anual de 1745 mm, temperatura promedio de 27°C y una estación seca de aproximadamente 5 meses (Moya y Marín 2011).

Dentro de la finca se encuentra el huerto clonal, establecido en 1999 y comprendido por una colección de 56 genotipos, que sirvieron de base para el seguimiento fenológico de la especie (Figura 1).

1.2 Comportamiento fenológico en el periodo reproductivo de la teca

Se realizó un seguimiento fenológico en los individuos presentes en el huerto clonal, durante todo el ciclo reproductivo de la especie. Para ello, se realizaron seis visitas a campo en el periodo comprendido de julio a noviembre del 2016.

Lo anterior consistió en evaluar la condición fenológica en cada individuo, mediante una inspección ocular periférica en cada árbol, hasta lograr observar el total de las panículas y asignar un valor porcentual de la abundancia de flores y frutos dentro de las panículas, tal y como se detalla en el cuadro 1. Dicho valor se registró utilizando un formulario (Cuadro 2).

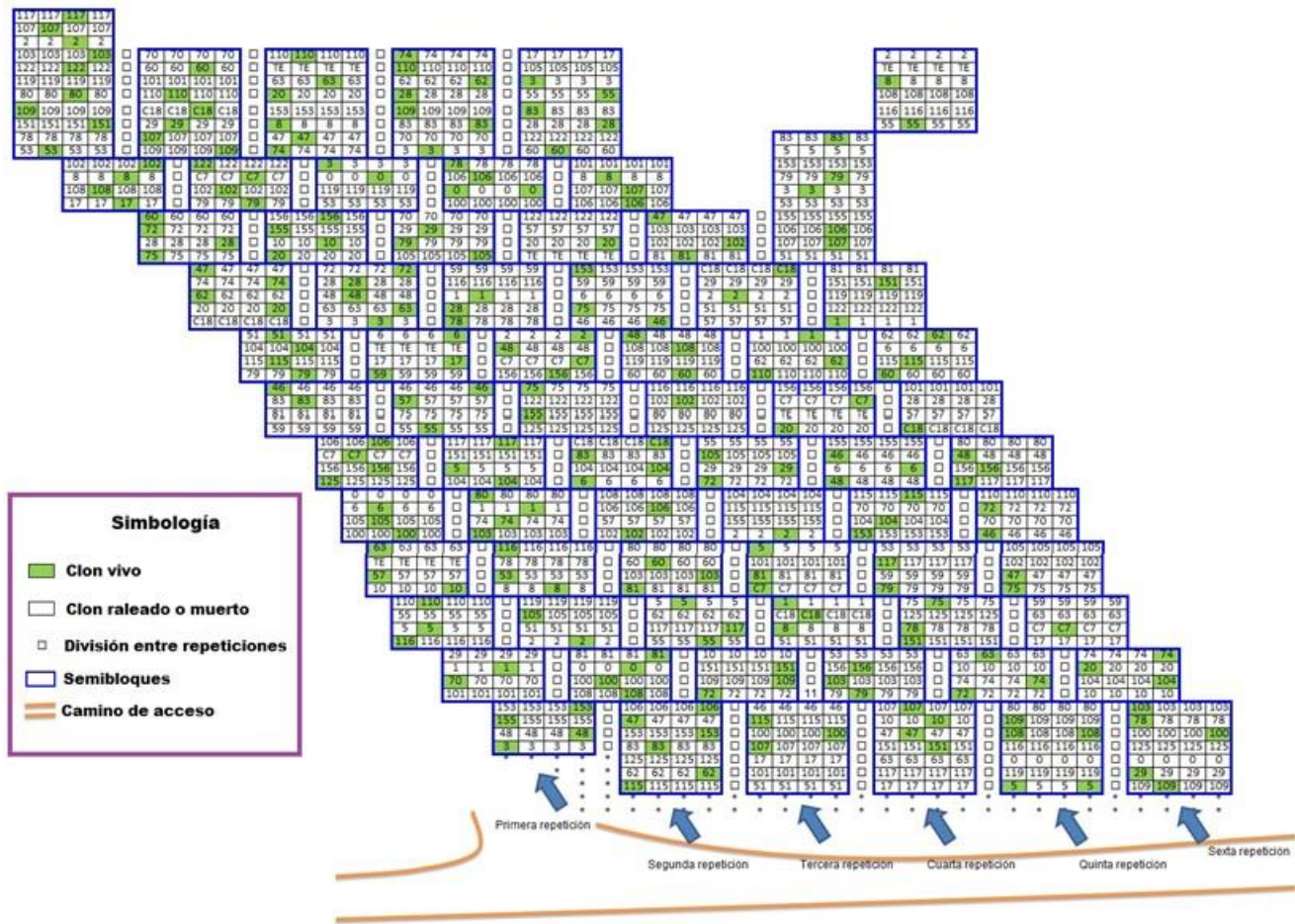


Figura 1. Distribución espacial de los clones de teca 80 en el huerto clonal, La Cruz de Guanacaste, Costa Rica.

Cuadro 1. Parámetros en la estimación porcentual de las evaluaciones fenológicas en cada individuo presente en el huerto clonal en La cruz de Guanacaste, Costa Rica.

Calificación porcentual	Flores	Frutos
0%-24%	Es un árbol en el cuál sus panículas no poseen flores, o la presencia de las mismas es escaza y no llega a la cuarta parte de su potencial.	Es un árbol en el cuál sus panículas no poseen frutos o la presencia de los mismos es escaza y no llega a la cuarta parte de su potencial.
25%-49%	Es un árbol en el cuál sus panículas poseen una considerable cantidad de flores, alcanzando menos de la mitad de su potencial.	Es un árbol en el cuál sus panículas poseen una considerable cantidad de frutos, alcanzando menos de la mitad de su potencial.
50%-74%	Es un árbol en el cuál sus panículas poseen una cuantiosa cantidad de flores, alcanzando más de la mitad y menos de tres cuartas partes de su potencial.	Es un árbol en el cuál sus panículas poseen una cuantiosa cantidad de frutos, alcanzando más de la mitad y menos de tres cuartas partes de su potencial.
75%-100%	Es un árbol en el cuál sus panículas poseen una numerosa cantidad de flores, alcanzando más de las tres cuartas partes de su potencial, o la cobertura de las flores activas en la panícula es total.	Es un árbol en el cuál sus panículas poseen una numerosa cantidad de frutos, alcanzando más de las tres cuartas partes del potencial, o la cobertura de los mismos es total.

Cuadro 2. Formulario de campo para evaluar la presencia de flores y frutos en las panículas de los genotipos del huerto clonal La Cruz de Guanacaste, Costa Rica.

Fecha	Repetición	Clon	Floración (%)	Fructificación (%)

1.3. Panículas y flores

Para conocer la duración en el desarrollo de las panículas se seleccionaron seis yemas a baja altura en árboles injertados que facilitaran su revisión periódica. Las yemas se mostraban aún indiferenciadas y a punto de dar a origen a la inflorescencia (Figura 2). Se rotularon con la fecha inicial, y se anotó (Cuadro 3) su crecimiento periódico en centímetros en dirección distal o hacia su ápice (tomado desde la división del primer eje en la base de la panícula). Se tomó también el ancho de la panícula (tomado de extremo a extremo sobre los ramilletes basales), número de divisiones del eje principal, nivel de división dicotómica y número total de flores presentes (Figura 3). El número de flores receptivas el día de la toma de datos se determinó contando manualmente el total presente. En total se realizaron nueve registros durante un mes de observaciones.



Figura 2. Primeros ramilletes de una panícula de teca en estadio inicial de crecimiento estructural. Fuente propia.

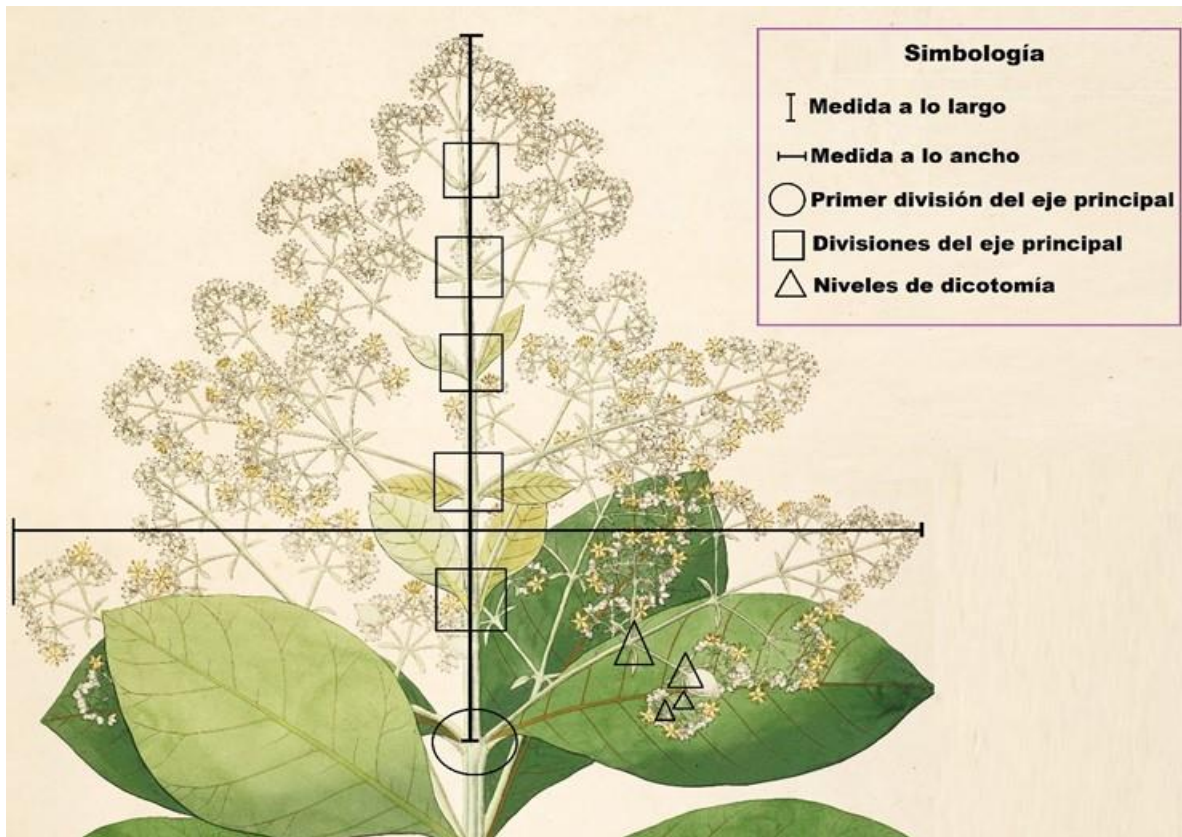


Figura 3. Parámetros utilizados en la medición del desarrollo de panículas de teca.
Fuente: Missouri Botanical Garden.

Cuadro 3. Registro del crecimiento de la panícula y aparición de flores de teca, Peñas Blancas, La Cruz de Guanacaste, Costa Rica.

Fecha	N° panícula	Largo (cm)	Ancho (cm)	Divisiones del eje principal	Nivel de divisiones dicotómicas	No. de flores	Observaciones

Fuente propia.

1.4. Desarrollo de frutos

Se marcaron flores fertilizadas mediante polinización controlada, utilizando gazas de colores en una panícula baja, en árboles injertados de porte pequeño (Figura 4).

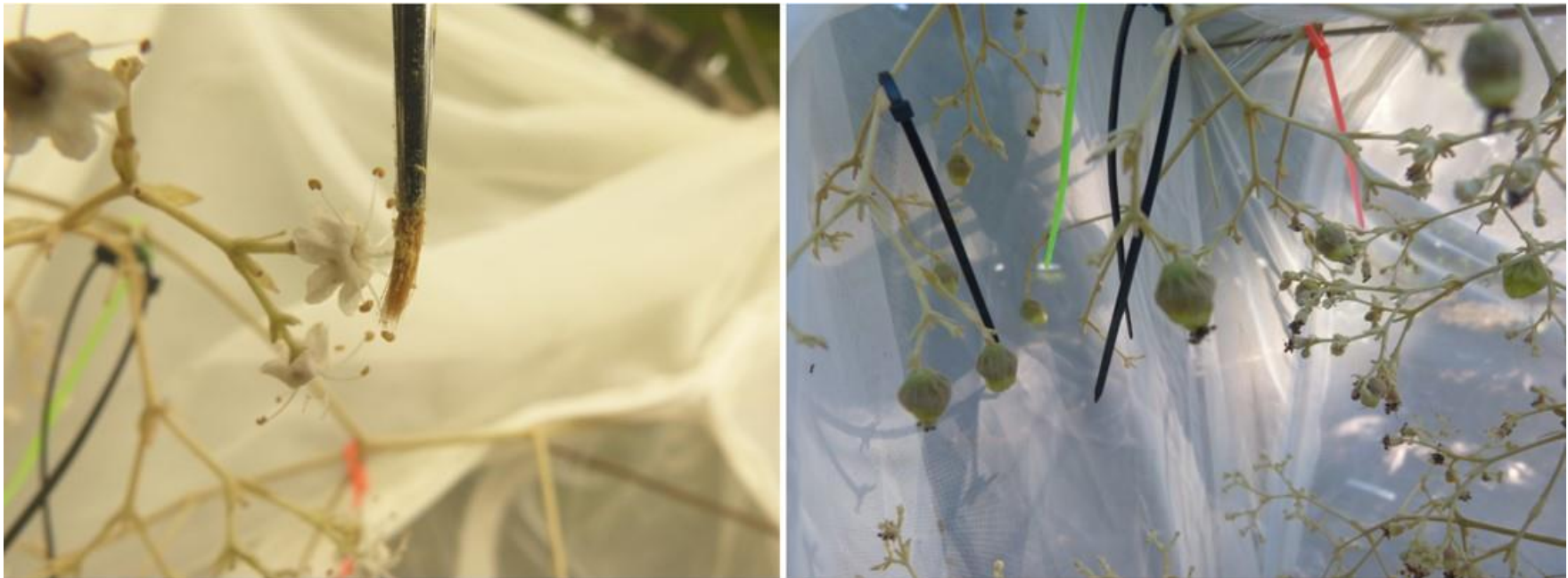


Figura 4. Desarrollo del fruto: a) Polinización controlada en teca utilizando pincel. b) Frutos en fase de llenado marcados con gazas de colores. La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. Fuente propia.

Se seleccionó una panícula desarrollada con botones florales próximos a la apertura en el día de la polinización. A las 5:30 am, previo a la antesis, se eliminaron todas las flores abiertas en toda la inflorescencia, ya que podrían estar fertilizadas naturalmente desde días anteriores. Esto dejó solamente botones florales cerrados que se esperaba que iniciaran la antesis ese mismo día. Posteriormente, se procedió al aislamiento completo de la panícula, mediante su envoltura por medio de una bolsa de malla fina. Con este aislamiento se aseguró evitar el ingreso de agentes polinizadores que pudieran fertilizar flores emergentes posterior al marcaje inicial.

A las 8:00 am se abrió la envoltura aislante y se procedió con la polinización controlada de todas las flores que abrieron. Se utilizó polen fresco extraído el mismo día de al menos tres machos diferentes.

Se realizaron tres mediciones del diámetro del fruto. Al inició con la medición inicial, momento cuando el ovario se visualizó abultado, signo de una flor polinizada en desarrollo a la formación del fruto (aproximadamente tres días). Una segunda medición se tomó aproximadamente a los 20 días. Para finalizar, se midió el fruto hasta su crecimiento máximo (aún en color verde) previo a la etapa de maduración final.

1.5. Antesis

Para el monitoreo del proceso de antesis, a las 5:30 am se seleccionó una panícula y se marcaron por medio de gazas de colores los botones florales próximos a la apertura en ese mismo día. Posteriormente, desde las 5:30 am hasta las 3:00 pm se tomaron datos descriptivos y fotografías paso a paso, del proceso de apertura de las flores marcadas.

1.6 Producción de panículas y frutos por árbol

Se contabilizó la cantidad de panículas por árbol en una población de 151 individuos del huerto clonal, el cual tiene una edad de 15 años, y ha tenido varios raleos, con lo que se mantiene una distancia de aproximadamente 8m entre árboles. Para ello

se utilizó un formulario que registró la cantidad de panículas por individuo, cuyo promedio se obtuvo del conteo visual de tres personas.

Se estimó la cantidad de frutos desarrollados completamente todavía en color verde, a partir de conteos en una población de más de 50 árboles maduros en distintos rodales y sitios en la zona de La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. Se tomaron datos únicamente de árboles aislados o en borde de rodales. Los conteos se realizaron mediante la toma de fotografías de la panícula, que fueron posteriormente visualizadas en el computador por medio de un analizador de imágenes (Figura 5). Este procedimiento evitó contabilizar más de una vez un mismo fruto y aseguró el conteo completo de todos los frutos presentes en la panícula. En total se fotografiaron 45 panículas.



Figura 5. Conteo de frutos completos inmaduros en una panícula de teca, utilizando un analizador de imágenes, La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. En el ejemplo se contabilizaron $n= 91$ frutos. Fuente propia.

Resultados

Comportamiento fenológico en el periodo reproductivo de la teca

En la Figura 6 se puede apreciar la distribución promedio de la floración para el huerto en general, y promedio por fila o bloque (repetición) durante un periodo reproductivo. Los datos consideran el comportamiento fenológico desde el mes de julio hasta inicios de noviembre, año 2016. Puede observarse una mayor concentración de la floración en el mes de julio, que se extiende hasta el mes de setiembre. Ya en el mes de octubre, prácticamente no se observó floración.

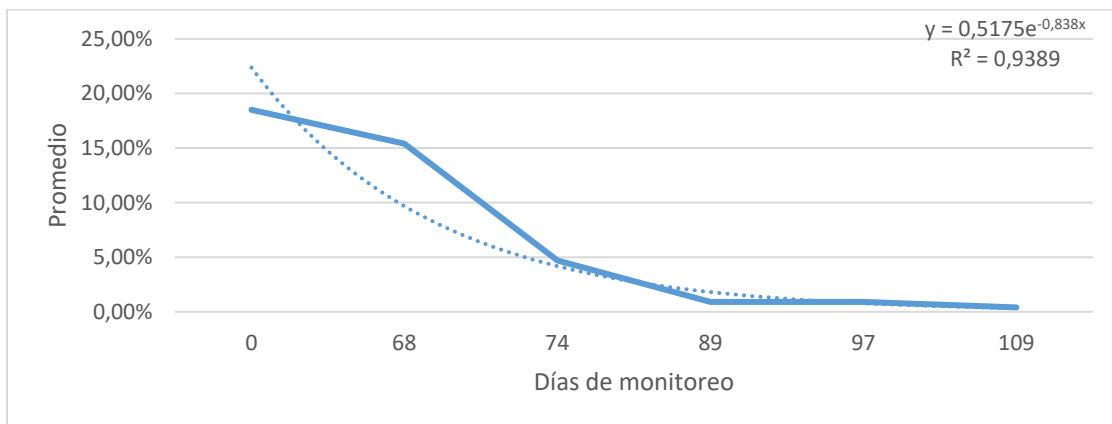


Figura 6. Distribución promedio de la floración en el huerto clonal (promedio) durante el periodo reproductivo de la teca en el 2016. La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. Elaboración propia.

En la Figura 7 se registra el comportamiento de la fructificación durante un periodo reproductivo. Puede observarse que la aparición de los frutos verdes se presenta en forma evidente a partir del mes de setiembre, continúa en aumento, hasta prácticamente estar presente en todos los árboles a partir del mes de octubre hacia noviembre.

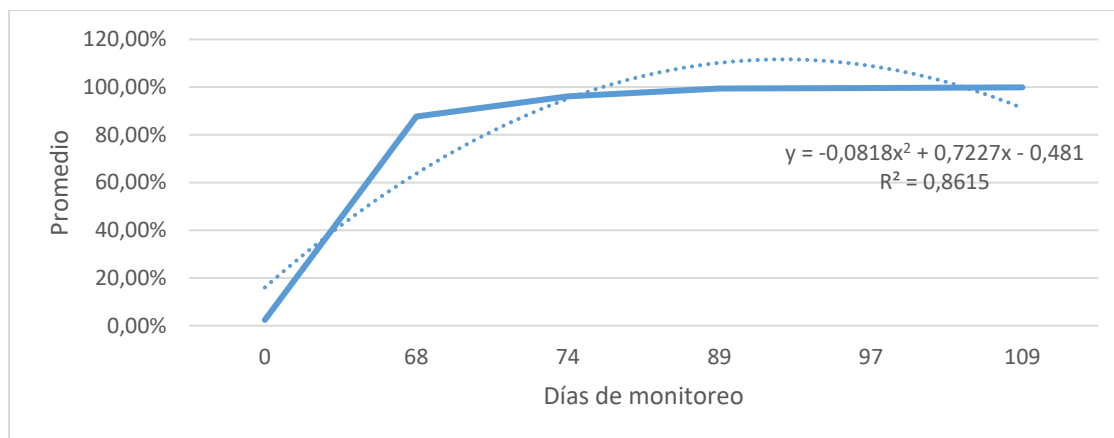


Figura 7. Distribución promedio de la presencia de fruto verde en el huerto clonal (promedio) durante el periodo reproductivo de la teca en el 2016. La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. Elaboración propia.

Puede observarse el patrón de cambio de la fenofase de floración a fructificación en panículas. Puede notarse que la tasa de floración se reduce 2 a 3 veces desde el inicio del mes, en comparación con el final del mismo mes. setiembre parece ser el mes de transición entre la predominancia de la floración y la fructificación.

El cuadro 4 muestra un listado de los genotipos del huerto semillero que en la primera visita mostraban una floración profusa (con porcentaje de flores superior al 50%). El huerto clonal de forma general mostró que las panículas tenían un 18,5% de flores y un 2,4% de frutos. Lo cual indica que las inflorescencias en esa visita tenían un alto potencial para la producción de flores, y solo unos pocos individuos poseían frutos en desarrollo.

Cuadro 4. Genotipos de teca con presencia de floración mayor a un 50% en sus panículas en el mes de julio 2016, La Cruz de Guanacaste, Costa Rica

Bloque	Clon	%	Bloque	Clon	%
4	72	80	2	79	60
2	100	70	4	151	60
2	72	70	4	108	60
2	122	70	4	153	60
2	107	70	4	3	60
4	47	70	4	28	60
4	29	70	6	74	60
4	75	70	6	151	60
6	72	70	6	3	60
1	3	60	1	28	50
1	70	60	1	80	50
1	100	60	2	46	50
1	46	60	2	155	50
1	53	60	2	29	50
1	107	60	3	100	50
2	2	60	4	C18	50
2	53	60	4	C7	50
2	57	60	4	2	50
2	3	60	6	29	50
2	28	60			

Durante la segunda visita los genotipos 3, 28, 29, 72 y 100 presentaron floración profusa en más de un bloque. Para esa fecha los genotipos 78, 104 y 117 exhibieron respectivamente, un 100%, 80% y 75% de panículas cubiertas por frutos. Estos mismos genotipos fueron los primeros en presentar flores en el año 2016.

Durante el mes de setiembre en ambos años, el registro de frutos en las panículas fue muy alto. De esta población, se eligieron genotipos con porcentaje inferior al 40% de frutos en panículas, con el objeto de conocer cuales individuos tardaron más en mostrar sus drupas.

Desarrollo de panículas, flores y frutos

En cuanto al desarrollo de la panícula, el aumento promedio en largo fue de 0,29 cm diarios. Mientras que en el ancho mostró un crecimiento de casi 0,5 cm/día. En el proceso de desarrollo, la panícula mostró cada 8 días una nueva división del eje principal. El aumento en el nivel de dicotomía se observó que ocurrió uno nuevo cada 8-10 días (Cuadro 5). A lo largo del mes de monitoreo, en el cuadro 9 se muestra que las panículas en promedio alcanzaron 38,16 cm de ancho y 60,12 cm de largo (Cuadro 6).

Cuadro 5. Desarrollo estructural de panículas de teca, La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. Elaboración propia.

Panícula	Aumento en el largo (cm)	Aumento en el ancho (cm)	Aumento en divisiones del eje principal	Aumento en el nivel de dicotomía	Surgimiento de la primer flor en la panícula	Cantidad máxima de flores
1	2,15 en 7 días	2,20 en 14 días	1 en 10,5 días	1 en 7 días	10 días	140
2	2,30 en 10 días	2,05 en 7 días	No reportó	1 en 7 días	no se registró	50
3	1,15 en 7 días	6,60 en 7 días	No reportó	1 en 7 días	no se registró	78
4	4,80 en 7 días	2,35 en 14 días	1 en 10,5 días	1 en 3 días	11 días	252
5	1,35 en 7 días	5,85 en 7 días	1 en 7 días	1 en 14 días	no se registró	166
6	2,10 en 7 días	7,60 en 7 días	1 en 4 días	1 en 7 días	11 días	ND
Promedio	2,31 ± 1,31 en 7,5 días	4,44 ± 2,52 en 9 días	1 en 8 días	1 en 7,4 días	10,5 días	137 ± 79

Cuadro 6. Dimensiones finales de panículas de teca en un mes de monitoreo, La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. Elaboración propia.

Panícula	Ancho máximo (cm)	Largo máximo (cm)
1	52,35	72,10
2	25,60	54,75
3	29,80	58,30
4	45,75	64,50
5	55,15	62,80
6	40,30	48,25
Promedio	41,52 ± 14,79	60,12 ± 8,28



Figura 8. Diámetro promedio del fruto de teca con cáliz fructífero. La Cruz de Guanacaste, Costa Rica.. a) Medición inicial el 30/9/2016: 0,50 cm; b) Medición intermedia el 19/10/2016: 2,45 cm; c) Medición final el 7/11/2016: 3,20 cm. La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. Fuente propia.



Figura 9. Maduración del fruto de teca aún envuelto en el cáliz fructífero. Diámetro promedio de la drupa: 1,85 cm. La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. Fuente propia.



Figura 10. Proceso de antesis en teca: a) Botón floral con corola cerrada (5:30 a.m.); b) Botón floral parcialmente abierto (6:00 a.m.); c) Flor semiabierta mostrando anteras (6:30 a.m.); d) y e) Flor abierta con el estilo semierguido (8:00 a.m.); f) Flor abierta con el estilo en posición horizontal (12:00 p.m.); g) Flor con anteras oxidándose (3:00 p.m.); h) Flor polinizada y desprendimiento de corola (posterior a las 3:00 p.m.). La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. Fuente propia.

Producción de panículas y frutos

Con base en una muestra de 151 árboles se determinó que en promedio se registran $62,3 \pm 32,2$ panículas por árbol, con un coeficiente de variación de poco más del 50%. Los árboles se encontraban dentro del huerto clonal, y no se incluyó en la muestra individuos que estuvieran en los bordes.

Se realizó el conteo de frutos verdes en 45 panículas, en una cantidad de 15 árboles, y se obtuvo en promedio $82,8 \pm 8,0$ frutos verdes por panícula. El coeficiente de variación es bajo, con un valor inferior al 10%.

Discusión

Durante el periodo comprendido entre julio y noviembre del 2016 se registró en el huerto clonal, que un 18,5 % de las panículas contenían flores en el primer registro a inicios del mes de julio. En ese mismo mes de julio, se registró que las panículas contenían un 2,4% de frutos.

En la segunda toma de datos (setiembre) se observó un leve incremento en la floración de un 3,1% con respecto a julio. En contraste, el panorama para la fructificación fue distinto, donde se observó un incremento de un 85,3%. Los datos sugieren que en el mes de setiembre las panículas tuvieron el mayor incremento en fructificación, sin embargo los árboles mantenían una disponibilidad similar de flores.

En el tercer registro a finales de noviembre (una semana después), la disponibilidad de flores por panícula era ya sumamente baja. En los registros posteriores prácticamente no había ya presencia de floración. Mientras que la fructificación se desarrolló plenamente durante este período de tiempo, entre octubre y noviembre. Estos resultados sugieren que la actividad floral efectiva sigue un ciclo de aproximadamente cuatro meses (junio a finales de setiembre), mientras que la fenofase de fructificación se extiende desde finales de setiembre hasta el mes de diciembre/enero (aproximadamente 4 meses).

La repetición 1 del clon 78, la repetición 2 del clon 104, y la repetición 2 del clon 75 en el primer registro, tenían sus panículas con porcentajes mayores a 75% de presencia de frutos, lo que sugiere que fueron los primeros individuos en florecer.

Notoriamente se evidencia como la repetición 2 del clon 81 y la repetición 5 del clon 106, en esa fecha contaban con más del 50% de sus panículas cubiertas de flores y con menos de un 40% de frutos.

Se determinó que el surgimiento de la primera flor dentro de la panícula ocurrió en promedio a los 10 días después de aparecer el cuarto nivel de desarrollo dicotómico

de la panícula. Se contabilizaron también hasta 252 flores por panícula en un mes de desarrollo.

La medición del diámetro en los frutos inmaduros se realizó sobre el cáliz fructífero de los mismos, ya que en las primeras etapas no hay diferenciación con la drupa que se desarrolla internamente. Llegó a alcanzar 3,2 cm en diámetro en 38 días de crecimiento (0,1 cm/día). Posterior a ello, el fruto entra en la fase de llenado y maduración, donde en promedio la drupa llegó a medir 1,8 cm de diámetro.

Finalizada la fase de fructificación, la estructura de la panícula por lo general se seca y bifurca, por lo que se observa el vestigio del eje principal junto a la reiteración de la rama en crecimiento. Sin embargo, en individuos con alta dominancia apical, se observó que el ápice continuó con su crecimiento vegetativo en el mismo eje sin bifurcarse (Figura 11).



Figura 11. Continuación del crecimiento vegetativo posterior al periodo reproductivo: a) La yema vegetativa reinicia y continúa su crecimiento sin producir una bifurcación. b) Vestigio de una panícula de la floración, el ápice muere y estimula la aparición de dos ramitas nuevas provocando una bifurcación. La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. Fuente propia.

El monitoreo en el proceso de antesis en la teca, inició con el botón floral cerrado, aún cubierto por la corola no expandida (5:00 am), la cual envuelve los órganos reproductivos de la flor aún enrollados. La apertura paulatina de la corola va descubriendo los estambres y el estilo semiemergidos (6:00-8:00 am), en este punto da inicio la dehiscencia de las anteras. En la sección inferior de la corola se visualiza el néctar, que coincide con la visita de agentes polinizadores (Figura 12).



Figura 12. Visitadores atraídos por el néctar de las flores de teca, La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. Fuente propia.

Posteriormente, los pétalos continúan desplegándose hasta doblarse hacia abajo de forma total, y el estilo se mantiene erecto completamente (12:00 pm), Según Tangmitcharoen (1997), este es el momento receptivo óptimo. El polen que logró llegar al estigma, empezará a hidratarse para germinar y hacer crecer el tubo polínico, que se conectará con el ovario donde ocurrirá la fecundación. En el periodo posterior a la recepción del polen (3:00 pm), las anteras se pueden observar oxidadas, con un color oscuro, y a partir de este punto la corola se puede desprender.

Este comportamiento tiene implicaciones para los trabajos de polinización. Significa entonces que las flores tienen un periodo efectivo de pocas horas y que al día siguiente, nuevas flores inician el ciclo reproductivo. Una misma panícula estará produciendo diariamente una oferta de flores potenciales para su fertilización, durante un período que puede extenderse por más de 30 días. Que puede determinarse desde que alcanza el cuarto periodo de división dicotómica hasta la sexta ó séptima división de la panícula. Por esto es posible posteriormente, visualizar frutos de tamaños y desarrollo diferentes dentro de una misma panícula. Se puede observar frutos más cercanos al eje principal de la panícula (más grandes), y otros frutos de menor desarrollo localizados en su parte externa o periférica.

Este modelo de floración implica que el riesgo de polinización no deseada, en un programa de cruces controlados de mejoramiento, ocurrirá solamente durante el mismo día de trabajo. Una vez completado el proceso de polinización, se deberá mantener aislada la flor durante las siguientes horas del mismo día.

Conclusiones

Se determinó que la teca desarrolla su periodo reproductivo en los meses de junio a noviembre, donde se observa floración efectiva de julio hasta la mitad del mes de setiembre.

La floración efectiva se manifiesta entre la cuarta y séptima división dicotómica de la panícula, que ocurre aproximadamente a los 11 días de iniciado su proceso de formación.

La fructificación aparece desde julio hasta noviembre, con predominancia a partir de setiembre.

El fruto junto con el cáliz fructífero llegó a medir 3,2 cm de diámetro en 38 días (0,1cm/día), mientras que, la drupa ya madura alcanzó en promedio 1,8 cm.

El proceso de antesis inicia con la apertura floral a partir de las 6:00am, pero con una dehiscencia completa de las anteras de los estambres a partir de las 8:00 am. En adelante y hasta el mediodía, la flor se encuentra totalmente abierta, con sus órganos reproductivos erguidos. Las anteras se oxidan a partir a las 3:00 pm, junto con el desprendimiento de la corola con los estambres.

CAPÍTULO II. ALMACENAMIENTO DE POLEN A CORTO PLAZO

Resumen

Se realizaron diferentes experimentos con el propósito de desarrollar una metodología operativa de cosecha y procesamiento de polen, de su almacenamiento y de su análisis de germinación. Se logró determinar la mejor concentración de sacarosa y tiempo para la germinación de polen fresco de teca. Para esto se realizó un ensayo con un Diseño en Bloques Completos al Azar (DBCA), con un arreglo factorial. El clon n° 1 germinado en la concentración al 30% durante 8 horas; el clon n° 1 germinado en la concentración al 30% durante 5 horas; el clon n° 1 germinado en la concentración al 20% durante 8 horas; y el clon n° 1 germinado en la concentración al 30% durante 2 horas, fueron los mejores ya que entre ellos no hubo diferencias estadísticas. El porcentaje de germinación de los mejores tratamientos siempre rondó la cuarta parte del total de granos presentes.

Otro experimento determinó la mejor temperatura y tiempo de almacenamiento a corto plazo de polen fresco de teca. Para esto se realizó un ensayo con un Diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA), en un arreglo Se utilizaron tubos Eppendorf para cada genotipo a -18°C , 5°C , y 25°C , durante 1, 2 y 3 semanas. Se demostró que todos los tratamientos que se almacenaron en congelación (-18°C) obtuvieron los valores más altos de germinación.

Finalmente, se experimentó conocer si el polen fresco de teca lograba germinar en 0,5 mL de aceite de canola y 0,5 mL de solución de sacarosa al 30%. Se utilizó polen fresco de dos genotipos, y se procedió a añadirle la solución compuesta de canola y de sacarosa. Para esto se realizó un ensayo con un Diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA) en un arreglo factorial. Cada tubo eppendorf se dejó germinando durante 1, 2 y 3 horas, y resultó que la germinación in vitro utilizando este medio es posible, aunque los porcentajes son bajos.

Palabras clave: Teca, polen, mejoramiento genético, almacenamiento, germinación



Esta obra está protegida bajo una Licencia Creative Commons Atribución no comercial SIn Derivadas 4.0

Abstract

Different experiments were carried out with the purpose of developing an operative methodology of pollen harvest and processing, storage and germination analysis. It was possible to determine the best concentration of sucrose and time for the germination of fresh teak pollen. For this an essay was carried out with a Design in Complete Blocks at Chance (DBCA), with a factorial arrangement. Clone No. 1 germinated at 30% concentration for 8 hours; Clone No. 1 germinated at 30% concentration for 5 hours; clone No. 1 germinated in the 20% concentration for 8 hours; and the clone n ° 1 germinated in the concentration at 30% for 2 hours, were the best since among them there were no statistical differences. The percentage of germination of the best treatments always was around a quarter of the total of grains present.

Another experiment determined the best temperature and short-term storage time of fresh teak pollen. For this, a test with a Design of Complete Blocks Randomized (DBCA), in an array Eppendorf tubes were used for each genotype at -18 ° C, 5 ° C, and 25 ° C, for 1, 2 and 3 weeks. It was demonstrated that all the treatments that were stored in freezing (-18 ° C) obtained the highest values of germination.

Finally, we experimented to know if fresh teak pollen managed to germinate in 0.5 mL of canola oil and 0.5 mL of 30% sucrose solution. Fresh pollen of two genotypes was used, and the solution composed of canola and sucrose was added. For this an essay with a Design of Complete Blocks Randomly (DBCA) in a factorial arrangement was realized. Each eppendorf tube was allowed to germinate for 1, 2 and 3 hours, and it turned out that germination in vitro using this medium is possible, although the percentages are low.

Key words: Teak, pollen, genetic improvement, storage, germination.



Esta obra está protegida bajo una Licencia Creative Commons Atribución no comercial SIn Derivadas 4.0 Internacional.

Introducción

Los programas de mejoramiento genético forestal contemplan el almacenamiento del polen dentro de sus estrategias de polinización controlada, ya que es de suma importancia cuando existe desfase en los periodos de formación de flores y polen entre distintos individuos, los cuáles se desean cruzar con diferentes objetivos, ya sean de investigación o de manera operativa en la obtención de semilla mejorada.

Por su parte, algunas empresas han almacenado polen a corto plazo de manera empírica en refrigeración hasta cinco días. Sin embargo, para conocer la viabilidad del polen no contaban con otro método alternativo a la polinización en campo, o bien, el requerimiento de un laboratorio especializado lo cual es costoso, por lo que se propuso crear un método operativo sencillo que contemple solamente los aspectos más básicos que puede aportar un laboratorio, un microscopio con un lente óptico de 40X, un porta y cubre objetos, y un medio de germinación compuesto por sacarosa y agua destilada.

El objetivo de este capítulo fue el desarrollar un método operativo de almacenamiento y germinación de polen de *Tectona grandis*. De manera específica se pretendió determinar un método operativo para evaluar la germinación de polen, evaluar la tolerancia del polen al almacenamiento a corto plazo, sometido a distintas temperaturas, evaluar el potencial de almacenamiento de polen a temperatura ambiente, dentro de una emulsión.

Materiales y métodos

A continuación, se describen una serie de experimentos relacionados que se desarrollaron con el propósito de desarrollar una metodología operativa de cosecha y procesamiento de polen, de su almacenamiento y del análisis de su germinación.

2.1 Extracción del polen

El proceso de extracción inicia con la colecta de las flores disponibles que inician el proceso de anthesis en ese día. La mejor hora de trabajo es a las 5:30 am, hora en que se cosecha la panícula completa y se conserva en una bolsa plástica para mantener separadas las flores de cada genotipo mientras se abren de las corolas.

Dos horas después (8 am) se procede con la corta de las flores que han iniciado con su apertura. Con el uso de tijeras finas o pinzas, se procede con el desprendimiento de las anteras de cada flor hasta acumular 0,1g de anteras frescas en un recipiente de papel.

Seguidamente, se continúa con el proceso de deshidratación de las anteras, para promover su apertura y liberación de polen. Después el recipiente de papel con cada 0,1 g de anteras frescas a deshidratar, se debe de colocar sobre 50g de sílica gel en un frasco cerrado durante dos horas aproximadamente. Posteriormente, se retiran las anteras deshidratadas en el recipiente, y se tamiza el polen seco utilizando un vibrador eléctrico tipo vórtex, durante al menos tres minutos (Figura 13). Finalizada esta etapa se obtiene el polen en los tubos Eppendorf (Figura 14).



Figura 13. Proceso de extracción y procesamiento de polen.



Figura 14. Eppendorf con polen de teca extraído (fondo) posterior a la separación y tamizaje de residuos florales. Fuente propia.

2.2 Germinación del polen en diferentes concentraciones de sacarosa

El objetivo de este experimento fue determinar la mejor concentración de sacarosa y tiempo para la germinación de polen fresco de teca. Para esto se realizó un ensayo con un Diseño en Bloques Completos al Azar (DBCA), con un arreglo factorial de seis concentraciones de sacarosa (a) por tres tiempos de estadía en el medio (b). El ensayo fue establecido con polen fresco procedente de dos genotipos, que actuaron como repetición. Por tanto, el ensayo tuvo un total de 18 tratamientos, es decir, 6 concentraciones de sacarosa por 3 tiempos de estadía en el medio, para 18 tratamientos en total.

Se prepararon seis soluciones de sacarosa con agua destilada a diferentes concentraciones (0%, 10%, 20%, 30%, 40%, y 50%). Se agregó 0,5 ml de cada una de estas concentraciones en seis diferentes tubos Eppendorf con polen fresco, y se dejaron germinar a temperatura ambiente (25°C) durante 2, 5 y 8 horas

Para cada una de estas combinaciones de 18 tratamientos, se procedió a extraer del Eppendorf 0,15 ml de cada solución con el contenido de polen. Esta solución se colocó en un portaobjetos, con cubreobjetos, para luego ser analizada bajo microscopio a 40X. Donde se contabilizó el polen germinado (aquellos con tubo polínico de igual o mayor longitud al tamaño del diámetro del grano) en comparación con el polen no germinado, con el fin de determinar la tasa de germinación.

2.3 Almacenamiento a corto plazo de polen a diferentes temperaturas

En esta investigación se determinó la mejor temperatura y tiempo de almacenamiento de polen fresco de teca. Para esto se realizó un ensayo con un Diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA), en un arreglo factorial de cuatro tiempos de almacenamiento (a), a tres diferentes temperaturas (b). El ensayo fue repetido con polen fresco de tres genotipos (efecto de bloque), para un total de 4 tiempos x 3 temperaturas, en total 12 tratamientos.

Se utilizaron tubos Eppendorf para cada genotipo a -18°C, 5°C, y 25°C, durante 1, 2 y 3 semanas. El polen fresco fue agregado puro dentro de cada tubo. Cada semana se evaluó la viabilidad del polen almacenado, utilizando como indicador la germinación del mismo durante dos horas en una solución de sacarosa al 30% (30 gramos de sacarosa disueltos en 100 ml de agua destilada).

En cada evaluación semanal se procedió a extraer una pequeña muestra del polen almacenado en cada Eppendorf, que fue colocado en otro tubo donde se realizaría la germinación. Seguidamente, se le agregó 0,5 ml de la solución de sacarosa y se dejó germinar durante dos horas. Posteriormente, se colocó 0,15 mL de la solución con polen en un portaobjetos, con cubreobjetos, para analizarlo en un microscopio a 40X, siguiendo el procedimiento descrito en el experimento anterior. En total se realizó el conteo del polen en nueve campos oculares para cada tratamiento.

2.4 Germinación del polen en aceite de canola y en disolución de sacarosa

Este experimento permitió conocer si el polen fresco de teca lograba germinar en 0,5 mL de aceite de canola y 0,5 mL de solución de sacarosa al 30%. Se utilizó polen fresco de dos genotipos, se procedió a añadirle la solución compuesta de canola y de sacarosa. Para esto se realizó un ensayo con un Diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA) en un arreglo factorial de tres tiempos de germinación, repetido a partir de polen fresco de tres genotipos (efecto de bloque), para un total de seis tratamientos.

Cada tubo se dejó germinando durante 1, 2 y 3 horas. Finalizados estos tiempos, se procedió a extraer 0,15 mL de la disolución con polen de cada Eppendorf, y se procedió a colocar en un portaobjetos, con cubreobjetos, para analizar la muestra en un microscopio a 40X. Los conteos de germinación se realizaron (con tubo polínico igual o mayor al diámetro del grano) en comparación con el polen no germinado, con lo cual se obtuvo la tasa de germinación de cada tratamiento. En total se realizó el conteo del polen en nueve campos oculares para cada tratamiento siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Adicionalmente, en este experimento se realizó una prueba empírica que consistió en observar la adhesión de los granos de polen fresco y otros granos almacenados previamente en 0,5 mL de aceite de canola, sobre el estigma de la flor, para ser visualizado bajo el microscopio.

2.5 Conteo del polen germinado

En las pruebas efectuadas, se realizó el conteo del polen en nueve campos oculares elegidos aleatoriamente para cada tratamiento. Esto debido a que el polen presente en las alícuotas visualizadas bajo el microscopio no se distribuye uniformemente. La cantidad de campos se determinó a partir de la obtención de coeficientes de variación inferiores al 10%.

Para el cálculo de la tasa de germinación en cada campo ocular, se tomó una fotografía sobre el lente del microscopio, la cual permitió contabilizar el número de granos germinados entre el número total de granos presentes. Para ello se utilizó

un analizador de imágenes, lo que permitió conteos manuales precisos por medio de marcas visuales en la imagen, de tal modo que evita contabilizar varias veces el mismo grano, o bien, eludirlo (Figura 15). Finalmente, el polen germinado se expresó de forma porcentual en relación al total presente.

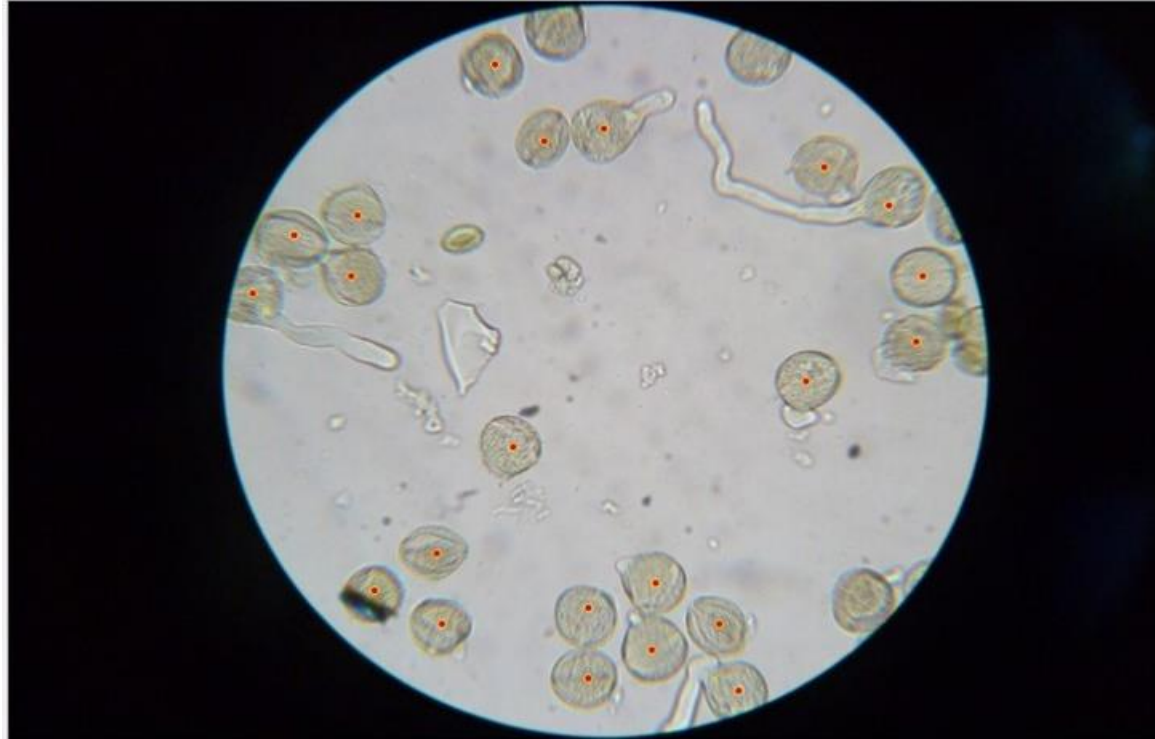


Figura 15. Conteo de los granos de polen utilizando un analizador de imágenes. (Puntos rojos representan la totalidad de granos, y las cruces amarillas los que germinaron). La Cruz de Guanacaste, Costa Rica. En el ejemplo se contabilizaron $n= 22$ granos.

2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico en cada prueba se realizó por medio de un análisis de varianza utilizando el software Infostat. Se verificaron los supuestos del ANDEVA de los datos colectados. Finalmente, se someten los datos a la prueba de Tuckey como método de comparación de medias para conocer si existían diferencias significativas entre los tratamientos. Se utilizó un nivel de significancia de $\alpha=0,05$.

Resultados

En el cuadro 7 se observa los resultados del ANDEVA del ensayo de germinación de polen a distintas concentraciones de sacarosa.

Cuadro 7. ANDEVA del ensayo de germinación de polen de teca a diferentes concentraciones de sacarosa. Elaboración propia.

F. V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Genotipo	751,28	1	751,28	284,27	<0,0001
Concentración (%)	7555,97	5	1511,19	571,81	<0,0001
Tiempo (horas)	505,96	2	252,98	95,72	<0,0001
Genotipo*Concentración (%)*Tiempo (horas)	265,3	10	26,53	10,04	<0,0001
Error	761,14	288	2,64		
Total	10713,7	323			

Existen diferencias significativas entre genotipos, concentraciones de sacarosa, tiempos de germinación, y las interacciones entre estos factores. Tomando en cuenta cada factor individualmente, el genotipo que tuvo mejor comportamiento fue el n° 2, la concentración con mayor germinación fue la de 30%, y a las 8 horas los datos indican que había mayor cantidad de polen germinado.

Las interacciones entre los factores evaluados, permitieron conocer cuál fue el tratamiento más efectivo en función al mayor porcentaje de germinación, por lo que los siguientes cuatro tratamientos fueron los que obtuvieron el mejor comportamiento en esta prueba, ya que estadísticamente no presentaron diferencias significativas entre ellos (Figura 16). El clon n° 1 germinado en la concentración al 30% durante 8 horas; el clon n° 1 germinado en la concentración al 30% durante 5 horas; el clon n° 1 germinado en la concentración al 20% durante 8 horas; y el clon n° 1 germinado en la concentración al 30% durante 2 horas. El promedio del porcentaje de germinación de los mejores tratamientos fue de 24,96%.

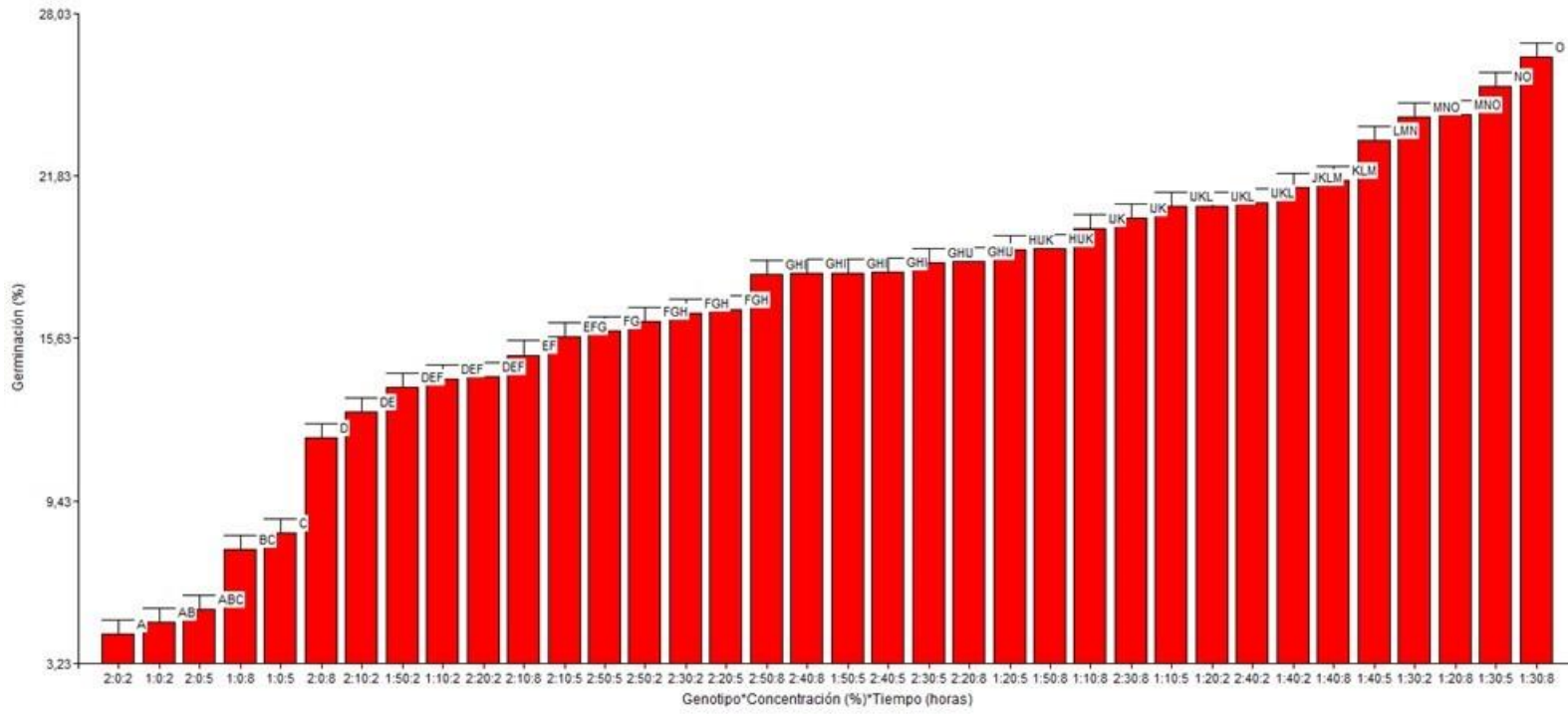


Figura 16. Porcentaje de germinación en función de los tratamientos (Genotipo -Concentración de sacarosa - Horas de estadía en el medio). Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Elaboración propia.

Cuadro 8. ANDEVA de polen de teca procedente de tres machos, sometido a tres periodos de almacenamiento y a tres temperaturas de germinación. Elaboración propia.

F. V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Semana	295,19	2	147,6	113,69	<0,0001
Genotipo	101,48	2	50,74	39,08	<0,0001
Temperatura	15526,89	2	7763,45	5979,79	<0,0001
Semana*Genotipo*Temperatura	180,64	8	22,58	17,39	<0,0001
Error	280,43	216	1,3		
Total	17284,47	242			

Cada uno de los factores evaluados en este experimento obtuvieron diferencias significativas. Específicamente, el genotipo n° 1 manifestó un mejor comportamiento en comparación al n° 2 y n° 3, mientras el periodo de almacenamiento que presentó mayor porcentaje de germinación fue el almacenado solamente durante una semana. Por su parte, el factor temperatura mostró que el polen almacenado a -18°C fue el que obtuvo mayor porcentaje germinativo.

Sin embargo, las interacciones muestran que las dos mejores combinaciones de factores fueron los tratamientos donde el polen del genotipo 3 se almacenó 3 semanas a -18°C y el polen del genotipo 2 que se almacenó 3 semanas igualmente a -18°C, ya que no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Figura 17). El promedio del porcentaje de germinación de los mejores tratamientos fue de 23,04%.

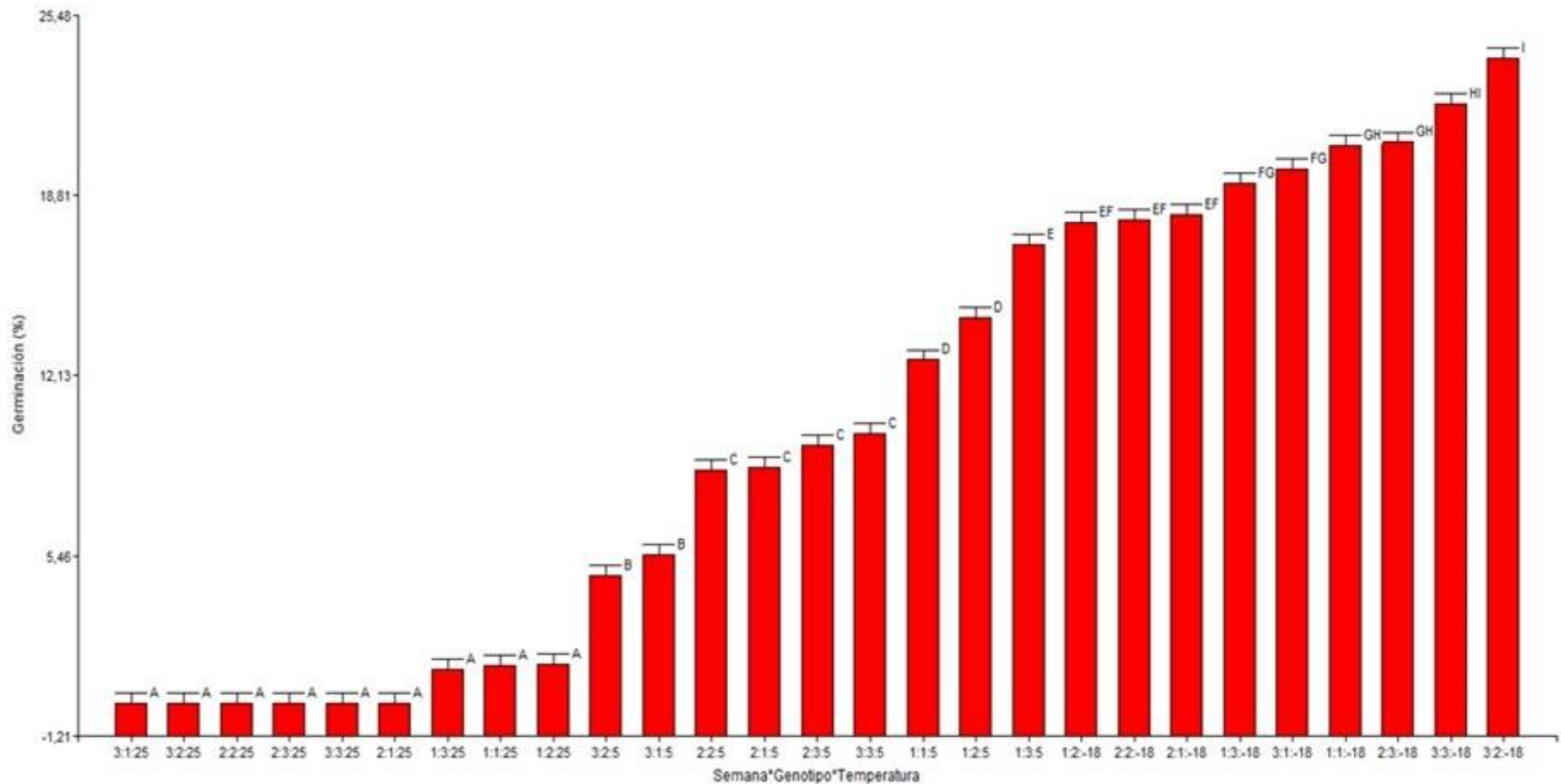


Figura 17. Porcentaje de germinación en función de los tratamientos (Semana -Genotipo - Temperatura). Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Elaboración propia..

Cuadro 9. ANDEVA de la germinación del polen en aceite de canola y disolución de sacarosa. Elaboración propia.

F. V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Genotipo	20,82	1	20,82	172,23	<0,0001
Hora	14,24	2	7,12	58,9	<0,0001
Genotipo*Hora	0,41	3	0,2	1,7	0,1931
Error	6,53	54	0,12		
Total	41,99	59			

Se presentaron diferencias significativas en los factores de la germinación de granos de polen en aceite de canola y sacarosa al 30%. Al momento de realizar el análisis de varianza con los factores involucrados, se determinó que individualmente la mayor germinación la obtuvo el genotipo 105, y la mejor hora de estadía en el medio fue de tres horas.

En cuanto a la adhesión del polen, bajo microscopio se observó que efectivamente el polen fresco se adhirió sin mayor inconveniente al estigma de la flor. Por su parte, el polen almacenado en canola no logró adherirse al estigma (Figura 18).

En las interacciones, el tratamiento que obtuvo mejor resultado en función a la germinación fue el genotipo 105 cuando se dejaba germinando 3 horas de estadía en la solución. Aunque no se pudo afirmar que se efectuó dicha interacción, ya que su p-valor fue superior al nivel de significancia establecido, el comportamiento cuando los factores se evalúan individualmente refleja el mismo resultado, y que estadísticamente es confiable (Figura 19). El promedio del porcentaje de germinación del mejor tratamiento fue de 4,72%

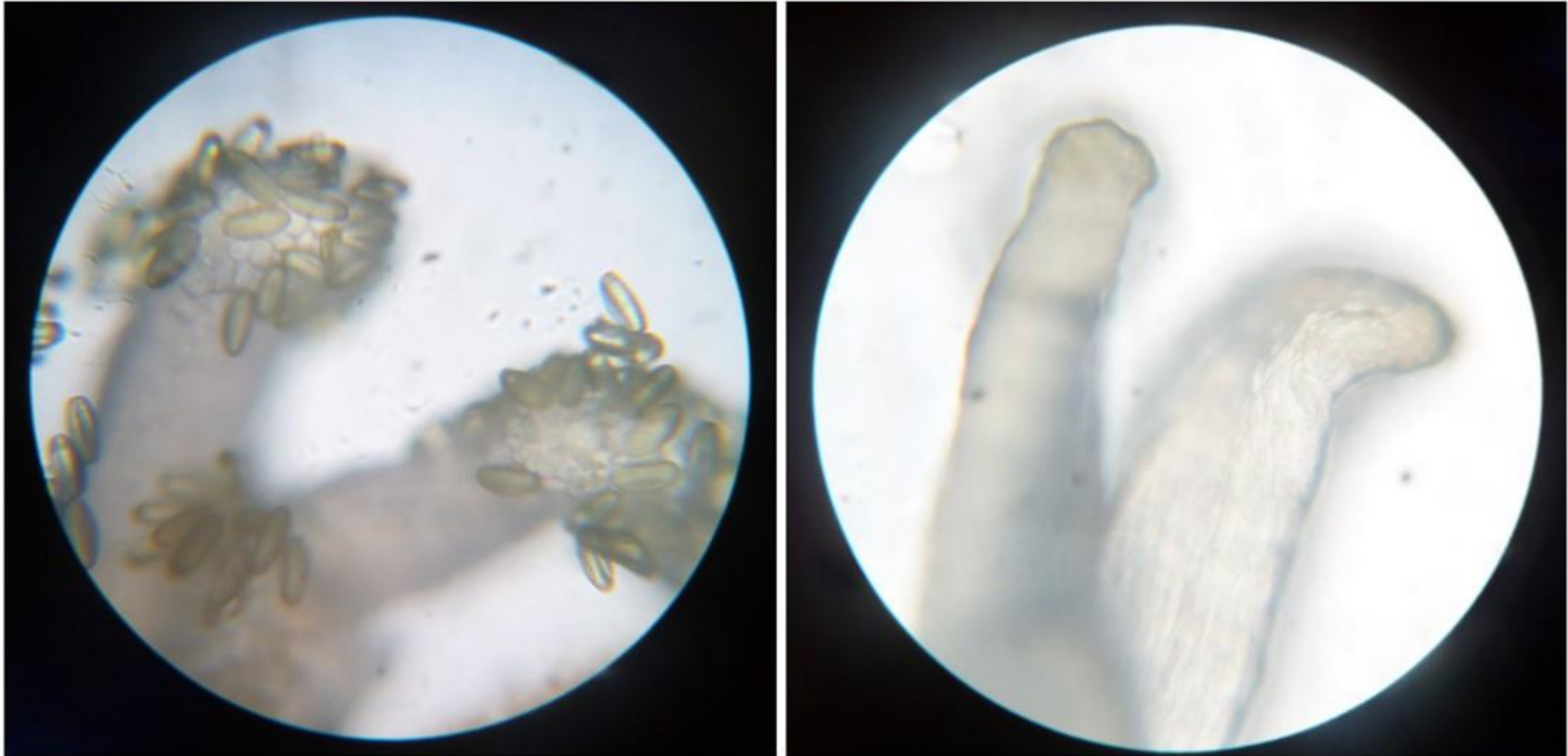


Figura 18. Estigma de la flor de teca: a) Adhesión de polen fresco sobre el estigma de la flor mediante polinización controlada; b) Se observa que no se logra la adhesión del polen almacenado en 0,5 ml de aceite de canola, durante la polinización controlada. Fuente propia.

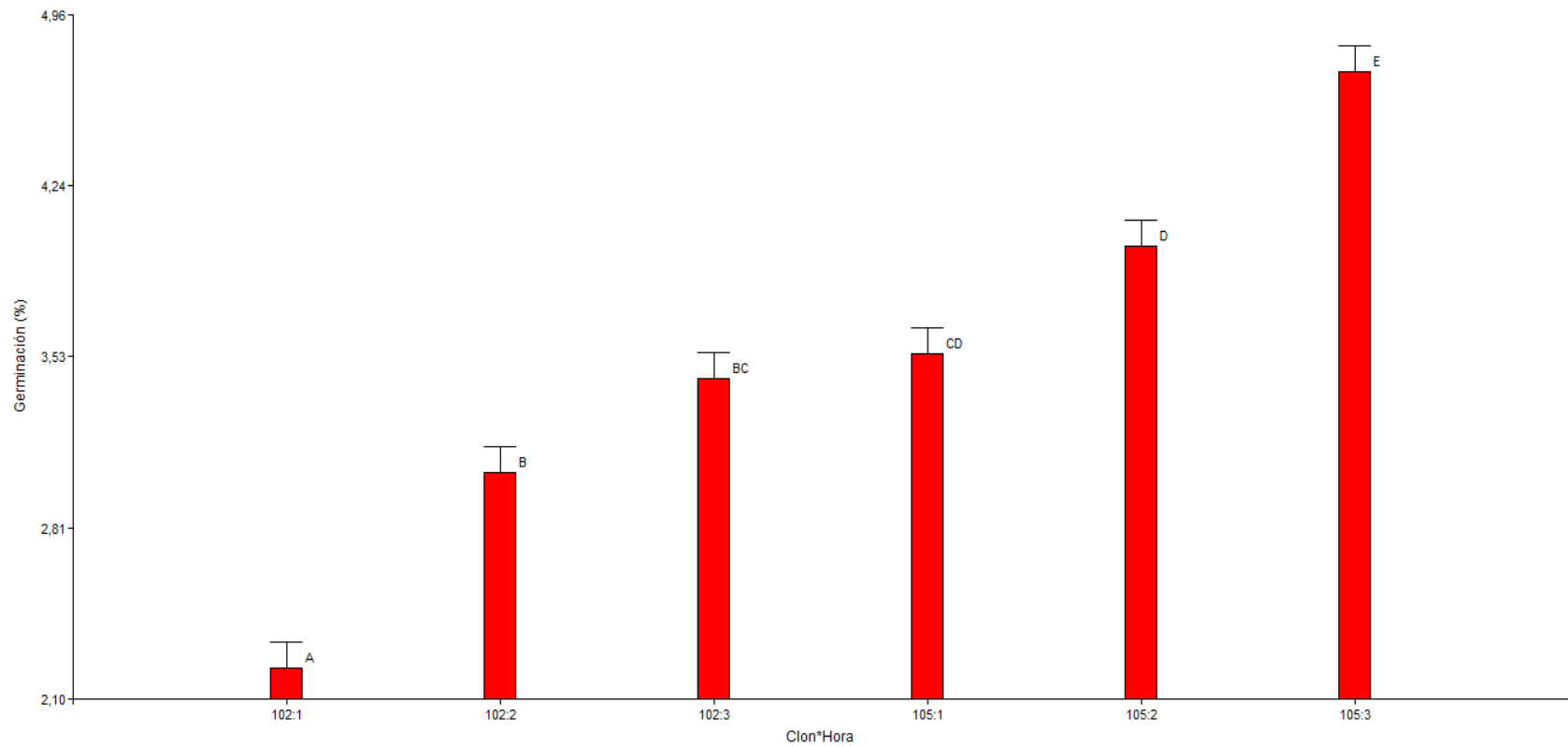


Figura 19. Porcentaje de germinación en función de los tratamientos (Clon- Horas de estadía en el medio). Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Elaboración propia.

Discusión

Mediante el método de comparación utilizado, se evidenció una marcada diferencia entre la germinación de los granos de polen cuando se comparan los factores individualmente, y cuando se analizan las interacciones.

La diferencia entre clones posiblemente obedezca al genotipo utilizado y a la calidad y cantidad de reservas de nutrientes del polen, propiciadas por las condiciones ambientales donde se produjo el material genético utilizado en el experimento (Araméndiz 2012).

La prueba de germinación del polen fresco determinó que la sacarosa es un catalizador en la germinación y formación del tubo polínico, ya que en todos los tratamientos siempre hubo presencia de polen germinado, inclusive al 0% aunque estos se presentaron a niveles muy bajos.

En los mejores tratamientos, hubo presencia de los tres tiempos de estadía en el medio, incluido un tratamiento con polen con 2 horas de estadía. Lo cual puede indicar que otros factores como ambientales o genéticos que no han sido controlados pueden influenciar en los tiempos de la germinación.

Las concentraciones de sacarosa muestran diferencias entre ellas, y la solución al 30% obtuvo el mayor promedio de germinación. Es diferente a los resultados obtenidos por Edgenti (1978), en donde se efectuó un experimento de comparación de porcentajes de germinación de polen de teca germinados in vitro solamente con soluciones de sacarosa en distintas concentraciones, y menciona que al 14% dio la mejor germinación, ya que del 1% al 3% observó ruptura de los granos, y de 35% a 40% observó plasmólisis. Sin embargo, existen otros factores que pudieron influir en la germinación lo que pudo provocar estas diferencias, como las diferencias genotípicas anteriormente mencionadas.

En la prueba de almacenamiento en diferentes condiciones de temperatura, el polen tratado a -18°C fue el que obtuvo el mayor rendimiento, inclusive a la tercera semana de estar almacenado, por el contrario los tratamientos con temperatura más

elevada presentaron los porcentajes de germinación más bajos, lo cual indica que el porcentaje de germinación de los granos de polen disminuye con el aumento de la temperatura, como resultado de la deshidratación de los granos de polen y consecuente pérdida de viabilidad (Torres 2003).

Evaluated independientemente, el factor tiempo de almacenamiento que obtuvo mayor porcentaje de germinación fue el polen almacenado solamente durante una semana, lo cual es razonable debido a que es el momento del experimento en el que el polen se encuentra más fresco. Aunque, en la interacción de los factores, el mejor tratamiento se comportara mejor con el polen almacenado por 3 semanas, los otros dos factores (genotipo y temperatura) pudieron influenciar en mayor medida el porcentaje de germinación del tratamiento.

En la germinación de polen fresco en una solución compuesta por canola y sacarosa al 30 %, los resultados indicaron que de los tres tiempos evaluados la mayor germinación se dio a la tercera hora de estadía en el medio, y fue el genotipo 105 el que obtuvo el mejor rendimiento. Lo cual corrobora los resultados de la prueba de germinación de polen en distintas concentraciones de sacarosa, en cuanto a los tiempos evaluados, indicando que a mayor tiempo de estadía en el medio mayor fue su germinación.

La adhesión de los granos de polen fresco al estigma de la flor, es de carácter natural, ya que el polen no fue sometido a ningún proceso durante el experimento. Sin embargo, el polen fresco previamente almacenado en aceite de canola, no logró dicha adhesión, posiblemente por inconvenientes de carácter físico, relacionado a la interacción entre el polen, el aceite, y el estigma.

Conclusiones

En la prueba de germinación de polen en diferentes concentraciones de sacarosa, El clon n° 1 germinado en la concentración al 30% durante 8 horas; el clon n° 1 germinado en la concentración al 30% durante 5 horas; el clon n° 1 germinado en la concentración al 20% durante 8 horas; y el clon n° 1 germinado en la concentración al 30% durante 2 horas, fueron los mejores ya que entre ellos no hubo diferencias estadísticas. El porcentaje de germinación de los mejores tratamientos siempre rondó la cuarta parte del total de granos presentes.

Evidentemente la prueba de almacenamiento de polen a corto plazo a diferentes temperaturas demostró que todos los tratamientos que se almacenaron en congelación (-18°C) obtuvieron los valores más altos de germinación. Lo que indica que es un medio adecuado para el almacenamiento del polen de teca. Sin embargo, habría que realizar polinizaciones controladas para validar estos resultados operativamente.

Además, la prueba de germinación de polen fresco en una solución compuesta por canola y sacarosa al 30 %, indica que la germinación in vitro utilizando este medio es posible, aunque los porcentajes son bajos.

La polinización controlada utilizando polen almacenado en canola necesita de mayor investigación relacionada a la metodología adecuada en la sustracción de los granos de este aceite que está actuando como medio de almacenamiento, para eventualmente realizar cruces controlados.

Referencias

- Araméndiz Tatis, H., Cardona Ayala, C., & Lugo Torres, E. A. (2012). Germinación del Polen de Berenjena (*Solanum melongena* L.) en Condiciones *in vitro*. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, 65(2), 6637-6643.
- Bryndum, K., & Hedegart, T. (1969). Pollination of teak (*Tectona grandis* L.). *Silvae Genetica*, 18(3), 77-80.
- Egenti, L. (1978). Pollen and stigma viability of teak (*Tectona grandis* L. f.). *Silvae Genet*, 27, 29-32.
- Fonseca, S. (2010). Manual pratico de melhoramento genético de eucalipto. Ed. UFV.
- Hedegart, T. (1973). Pollination of teak (*Tectona grandis* L.) 2. *Silvae Genetica*, 22(4), 124-128.
- Keiding, H. (1993). Teak, *Tectona grandis* Linn F (Vol. 4). Humlebaek, Dinamarca: Danida Forest Seed Centre.
- Mendel, G. (1865). Experiments in Plant Hybridisation, trans. Castle, WE, *Genetics and Eugenics*, 281-321.
- Murillo, O., Wright, J., Monteuis, O., & Montenegro, F. (2013). Mejoramiento genético de la teca en América Latina. En R. De camino, & J. Morales, *Las plantaciones de teca en América Latina: mitos y realidades* (pág. 410). Turrialba: CATIE.
- ONF. (2015). Estadística 2014. Usos y aportes de la madera en Costa Rica
- Tangmitcharoen, S. (1997). Technique for controlled hand-pollination of teak (*Tectona grandis* Linn. f.).
- Torres, L. F. C. (2003). Almacenamiento de Polen de Guanábano. *Colombia forestal*, 8(16), 121-125.