

Instituto Tecnológico de Costa Rica  
Universidad Nacional de Costa Rica  
Universidad Estatal a Distancia  
Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo



**Manejo y conservación de polen de *Tectona grandis* y *Gmelina arborea***

**Tesis sometida a la consideración del  
tribunal evaluador como requisito para optar por el grado de Doctora en  
Ciencias Naturales para el Desarrollo con énfasis en Gestión de Recursos  
Naturales**

**ANA LIZETH HINE GÓMEZ**

**Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica**

**Diciembre 2020**

**Instituto Tecnológico de Costa Rica  
Universidad Nacional de Costa Rica  
Universidad Estatal a Distancia**



**MANEJO Y CONSERVACIÓN DE POLEN DE *TECTONA GRANDIS*  
Y *GMELINA ARBOREA***



**Trabajo de graduación sometido a la consideración del  
tribunal evaluador como requisito para optar por el grado de Doctora en  
Ciencias Naturales para el Desarrollo con énfasis en Gestión de Recursos  
Naturales**

**Estudiante:**

**Ana Lizeth Hine Gómez**

**Tutor:**

**Olman Murillo Gamboa. PhD**

**Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica**

**Diciembre 2020**

**Instituto Tecnológico de Costa Rica  
Universidad Nacional de Costa Rica  
Universidad Estatal a Distancia  
Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo**



**MANEJO Y CONSERVACIÓN DE POLEN DE  
*TECTONA GRANDIS* Y *GMELINA ARBÓREA***

Trabajo sometido a consideración del tribunal evaluador como requisito para optar  
el grado de Doctora en Ciencias Naturales para el Desarrollo con énfasis en  
Gestión de Recursos Naturales.

MSc. Ana Hine Gómez

Sustentante

**Tribunal Examinador**

Dra. Gabriela Jones Román

Sistema de Estudios de Posgrado

\_\_\_\_\_

Dr. Giovani Sáenz Arce

Coordinador General del DOCINADE

\_\_\_\_\_

Dr. Olman Murillo Gamboa

Director de tesis

\_\_\_\_\_

Dra. Ana Abdelnour Esquivel

Asesora de tesis

\_\_\_\_\_

Dr. Dagoberto Arias Aguilar

Asesor de tesis

\_\_\_\_\_

**Diciembre 2020**

## **DEDICATORIA**

A mi madre y hermanos por todo el apoyo que me han dado.

A mis hijas Hallie y Hanna, mi respiro y motivación para llegar hasta el fin...

## **AGRADECIMIENTOS**

La investigadora agradece el apoyo financiero de la Universidad Nacional de Costa Rica, así como del Instituto de Investigaciones y Servicios Forestales (INISEFOR) de la UNA, a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica, a la Cooperativa de mejoramiento genético forestal GENFORES, al Ministerio de Ciencia, Tecnología y Telecomunicaciones de Costa Rica (MICITT); así como el apoyo especial de la empresa Novalteak Costa Rica S.A y a la administración del Jardín Clonal de melina del CATIE, para la realización de la investigación.

Un agradecimiento especial al Dr. Olman Murillo Gamboa, a la Dra. Ana Abdelnour Esquivel y al Dr. Dagoberto Arias Aguilar por el apoyo y dirección en la parte académica. Por las instrucciones en el tema de manejo de polen para un programa de mejoramiento genético y por su disponibilidad en atender las dudas planteadas en el momento oportuno.

# ÍNDICE DE GENERAL

Tribunal Examinador .....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	iv
Índice de General .....	v
Índice de cuadros .....	vii
Índice de figuras .....	ix
Siglas y Acrónimos .....	x
Introducción .....	1
Objetivo General .....	19
Objetivos específicos .....	19
Literatura citada .....	20
Marco Metodológico .....	28
Capítulo I .....	29
Optimización de la germinación de polen de teca ( <i>Tectona grandis</i> ) para programas de mejoramiento genético .....	29
Resumen .....	30
Abstract .....	31
Introducción .....	32
Materiales y métodos .....	34
Resultados .....	37
Discusión .....	41
Conclusiones .....	44
Capítulo II .....	49
Crioconservación de polen de teca ( <i>Tectona grandis</i> ) para un programa de mejoramiento genético .....	49
Resumen .....	50
Abstract .....	51
Introducción .....	52
Materiales y métodos .....	53
Resultados .....	58

Discusión .....	64
Conclusiones .....	67
Literatura citada.....	68
Capítulo III .....	72
Efecto de productos bioactivos sobre la germinación de granos de polen de teca crioconservados .....	72
Resumen.....	73
Abstract.....	74
Introducción .....	75
Materiales y métodos .....	76
Resultados.....	79
Discusión .....	83
Conclusiones .....	86
Literatura citada.....	87
Capítulo IV.....	90
Crioconservación de polen de melina ( <i>Gmelina arborea</i> ) para un programa de mejoramiento genético.....	90
Resumen.....	91
Abstract.....	92
Introducción .....	93
Materiales y métodos .....	94
Resultados.....	98
Discusión .....	104
Conclusiones .....	107
Literatura citada.....	108
Síntesis de Resultados .....	111
CONCLUSIONES .....	113
RECOMENDACIONES.....	114

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Medios de cultivo empleados en la germinación in vitro de granos de polen de teca ( <i>Tectona grandis</i> ), deshidratados previamente en sílica gel durante 2h.....	37
Cuadro 2. Efecto de la deshidratación en sílica gel sobre el porcentaje de viabilidad y germinación de granos de polen de teca ( <i>Tectona grandis</i> ), analizados dentro y fuera de la antera; y germinados en el medio BK (1963) al 10% de sus sales + 10% de sacarosa (g/100 mL) en solución acuosa a pH=7. ....	39
Cuadro 3. Efecto del pH sobre el porcentaje de viabilidad y germinación de granos de polen de teca ( <i>Tectona grandis</i> ), deshidratados durante 0h, 2h, 4h, extraídos y analizados fuera de la antera; y germinados en el medio BK (1963) al 10% de sus sales + 10% de sacarosa (g/100 mL) en solución acuosa a pH=7. ....	40
Cuadro 4. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el porcentaje de viabilidad y germinación de polen de teca ( <i>Tectona grandis</i> ), deshidratados previamente en sílica gel durante 2 h; y germinados en el medio BK (1963) al 10% de sus sales + 10% de sacarosa (g/100 mL) en solución acuosa a pH=7. ....	41
Cuadro 5. Contenido de humedad luego 0, 2, 4 y 6 h de deshidratación en sílica gel y porcentaje de viabilidad y germinación de los granos de polen fresco (NL-) y granos de polen congelados (NL+); germinados en el medio BK (1963) al 10% de sus sales + 10% de sacarosa (g/100 mL) en solución acuosa a pH=7.....	59
Cuadro 6. Porcentaje de viabilidad y germinación de granos de polen crioconservado (39,5% CH) durante 18 meses, y germinados en el medio BK (1963) al 10% de sus sales + 10% de sacarosa (g/100 mL) en solución acuosa a pH=7.....	61
Cuadro 7. Crecimiento in vivo del tubo polínico de granos de polen fresco (39,5% CH) e incubados a 25 °C.....	61
Cuadro 8. Receptividad del estigma, empleando polen fresco (39,5% CH) y polen crioconservado (39,5% CH) durante 2 años, luego de 12 horas de incubación a 25 °C. ....	62
Cuadro 9. Tratamientos empleados para la germinación los granos de polen de teca a los 0, 4 y 8 meses de crioconservación (-196 °C).....	77
Cuadro 10. Efecto del medio de cultivo y el tiempo de crioconservación en la germinación de polen de teca. ....	79
Cuadro 11. Mediciones de área y longitud del tubo polínico en granos de polen de teca crioconservado y germinado en diferentes medios complementados con Biobras-16® y Pectimorf®.....	81
Cuadro 12. Contenido de humedad luego 0, 2, 4 y 6 h de deshidratación en sílica gel y porcentaje de viabilidad y germinación de los granos de polen fresco (NL-) y granos de polen congelados (NL+); y germinados en el medio BK (1963) al 10% de sus sales + 10% de sacarosa (g/100 mL) en solución acuosa a pH=7. ....	100

Cuadro 13. Porcentaje de viabilidad y germinación de granos de polen crioconservados (35% CH) durante 12 meses, germinados en el medio BK (1963) al 10% de sus sales + 10% de sacarosa (g/100 mL) en solución acuosa a pH=7.....	102
Cuadro 14. Crecimiento in vivo del tubo polínico de granos de polen fresco (35% CH) e incubados a 25° C.....	102
Cuadro 15. Receptividad del estigma, empleando polen fresco (35% CH) y polen crioconservado (35% CH) durante 1 hora, luego de 12 horas de incubación a 25 °C. ....	103

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura floral de teca. ....	5
Figura 2. Estructura floral de melina. ....	6
Figura 3. Mapa conceptual de la metodología que se siguió para el desarrollo de la investigación en manejo y conservación de pole de teca y melina. ....	28
Figura 4. Polen de teca ( <i>tectona grandis</i> ) no viable (a) barra= 100 $\mu$ m, viable (b) y germinado (c) barra= 10 $\mu$ m, empleando la tinción con acetocarmín. ....	36
Figura 5. Polen de teca ( <i>tectona grandis</i> ) viable y germinado: dentro de la antera (a) y fuera de la antera (b). Barra= 100 $\mu$ m, empleando la tinción con acetocarmín. ....	38
Figura 6. Receptividad de granos de polen en el estigma; y crecimiento in vivo del tubo polínico de granos de polen fresco a lo largo del pistilo de la flor de teca. Barra = 50 $\mu$ m. P= posición del pistilo ....	62
Figura 7. Polen fresco (39,5% ch) (a), polen crioconservado (39,5% ch) (b) de teca. Barra = 20 $\mu$ m, empleando la tinción pas /tbo. ....	63
Figura 8. Efecto del biobras-16® y pectimorf® sobre la germinación de polen crioconservado de teca durante 0, 4, 8 meses. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (tukey, $p \leq 0,05$ ).....	80
Figura 9. Germinaciones de granos de polen de teca crioconservados. Control bk (a), bk+0,001 mgl-1 biobras-16® (b), bk+0,05 mgl-1 biobras-16® (c), bk+5 mgl-1 pectimorf® (d), bk+10 mgl-1 pectimorf® (e), barra= 100 $\mu$ m.....	82
Figura 10. Análisis de correlación. Entre las variables área del grano de polen y longitud de tubo polínico. Tratamientos suplementados con biobras-16® (a). Tratamientos suplementados con pectimorf® (b).....	83
Figura 11. Receptividad de granos de polen en el estigma; y crecimiento in vivo de tubo polínico de granos de polen fresco a lo largo del pistilo de la flor de melina. Barra = 500 $\mu$ m. P= posición en el pistilo ....	103
Figura 12. Polen fresco (35% ch) (a), polen crioconservado (35% ch) (b) de melina. Barra = 10 $\mu$ m, empleando la tinción pas /tbo. ....	104
Figura 13. Paso para el establecimiento de un criobanco de polen. ....	112

## **Siglas y Acrónimos**

DOCINADE (Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo)

ITCR (Instituto Tecnológico de Costa Rica)

UNA (Universidad Nacional de Costa Rica)

UNED (Universidad Estatal a Distancia)

CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza)

MICITT (Ministerio de Ciencia y Tecnología y Telecomunicaciones)

INISEFOR (Instituto de Investigaciones y Servicios Forestales)

GENFORES (Cooperativa de Mejoramiento Genético Forestal)

CACH (Centro Agrícola Cantonal de Hojancha)

CIPF (Convención Internacional de Protección Fitosanitaria)

CAB International (Centre for Agricultural Bioscience International)

ONF (Oficina Nacional Forestal)

Dap (Diámetro a altura de pecho)

OSP (One-Step Pollination)

ARP (Análisis de Riesgo de Plagas)

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)

LBF (Laboratorio de Biotecnología Forestal)

DGN (Diversidad Genética Nuclear)

PAS (Ácido Periódico de Shiff)

TBO (Azul de Toluidina)

## INTRODUCCIÓN

A pesar de la importancia económica de la teca (*Tectona grandis L.*) y la melina (*Gmelina arborea Roxb.*) en el mundo forestal tropical y de la existencia de programas de mejoramiento genético desde antes de los años 70 para ambas especies, se reportan avances modestos hacia las generaciones avanzadas de mejoramiento (CAB Internacional, 2000). Desde el Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) se creó en el 2002 la primera cooperativa de mejoramiento y conservación genética forestal (GENFORES) que se tenga conocimiento en el mundo tropical (Gutiérrez *et al.* 2003), hoy día con 12 empresas miembro y con presencia en cinco países latinoamericanos (Costa Rica, Nicaragua, Ecuador, Colombia y Brasil). Su misión ha sido el desarrollo de material genético superior para estimular el establecimiento de plantaciones forestales en la región y con esto, contribuir a mejorar la calidad de vida de sus habitantes (Murillo 2011, Murillo y Badilla 2012, Murillo *et al.* 2016).

GENFORES es una de las organizaciones líder a nivel internacional en mejoramiento de la teca, con más de 450 accesiones en 4 países, 9 programas activos en conjunto con empresas y más de 50 ensayos genéticos en campo en la región latinoamericana (Badilla y Murillo, 2017). Además, retomó en los últimos años los programas de mejoramiento genético de melina, basado en una estrategia clonal (Chacón y Murillo 2005, Ávila *et al.* 2015). Sin duda, hoy día GENFORES desarrolla el programa de mejoramiento genético más importante para estas especies a nivel internacional (Murillo 2011, Badilla y Murillo 2011ab). Luego de más de 18 años continuos de investigación y desarrollo en vinculación directa con las empresas miembros, se ha desarrollado nuevas tecnologías de propagación clonal y de evaluación genética.

Debido a estos avances GENFORES ha llegado a un nuevo desafío científico-tecnológico en relación con el salto hacia la segunda generación de mejoramiento genético de teca y melina (Murillo 2011). Para esto, se requiere desarrollar un programa de cruzamientos controlados entre los genotipos de mejor desempeño, con el fin de alcanzar la mayor ganancia genética posible. Sin embargo, esto no será posible sin el desarrollo de capacidades para el procesamiento y conservación a corto y largo plazo del polen de los materiales seleccionados. Por lo tanto, se considera como de vital importancia el desarrollo de la capacidad de procesamiento y conservación de polen, a través de un concepto de banco de polen. Su concepción y funcionamiento deberá abordar distintas metodologías, entre ellas: la crioconservación (-196°C), almacenamiento a temperaturas bajas (5°C) y almacenamiento a temperatura ambiente (25°C). El banco de polen deberá tomar en cuenta el futuro intercambio de germoplasma entre empresas miembros de la cooperativa y el corto periodo de viabilidad del polen en su estado natural. Otras de las consideraciones a tomar en cuenta es el tema de la transferencia internacional de germoplasma y las regulaciones fitosanitarias de ingreso y salida en cada país. El envío de polen seco, por ejemplo, tiene restricciones menos rigurosas en relación con el Análisis de Riesgo de Plagas (ARP) que emiten la normativa de cada país (Ganeshan *et al.* 2008, Arriagada 2011, CIPF 2016). Sin duda la creación y funcionamiento de una estrategia de bancos de polen, abre una opción que facilitaría enormemente el intercambio internacional de germoplasma entre las empresas miembro de GENFORES, así como la posibilidad de su comercio en el futuro cercano.

Se ha reportado que investigadores asiáticos y venezolanos han logrado polinizar en forma controlada las especies de teca y melina, empleando polen fresco, sin un procesamiento ni almacenamiento previo (Tangmitcharoen y Owens 1997ab, Palupi y Owens 1997, Indira y Mohanadas 2002, Vasudeva *et al.* 2004, Stock *et al.* 2004, Solomon y Purnachandra 2006 y Palupi *et al.* 2010). Estos trabajos aportan información respecto a las horas adecuadas para colectar las anteras (polen), la

receptibilidad de la flor, el periodo de viabilidad del polen fresco el cual no supera las 48h en ambas especies y, de la posibilidad de realizar polinización artificial con polen fresco de manera exitosa. Sin embargo, estos trabajos no aportan conocimiento sobre el desarrollo de técnicas de procesamiento y conservación a corto y largo plazo del polen.

La ejecución de la investigación se realizó a partir de julio del 2016 y hasta diciembre del 2019. El trabajo experimental se realizó en el programa de mejoramiento genético de teca de la empresa Novelteak (La Cruz, Guanacaste), y en el caso de melina las panículas se colectaron del Jardín Clonal de melina de CATIE (Turrialba, Cartago).

Lograr el desarrollo de técnicas y procedimientos para el manejo y conservación del polen, permitirá avanzar aceleradamente en cruzamientos controlados de ambas especies en GENFORES, lo cual permitirá mantener su liderazgo internacional alcanzado en mejoramiento genético forestal y, alcanzar las siguientes generaciones de mejoramiento, que no ha logrado obtener ninguna organización con teca ni melina hasta la fecha. La competencia internacional es sumamente fuerte en materia de comercio de germoplasma. En especial de teca, una de las especies forestales tropicales más cotizadas en el mundo y donde Costa Rica juega hoy día un liderazgo en ciencia, tecnología y exportación de madera hacia los países asiáticos.

### **Características e importancia de la teca y la melina**

La teca (*Tectona grandis*, *Lamiaceae*), es un árbol originario del sureste asiático. Puede alcanzar 45 a 50 m de altura y de 2 a 2,5 m de diámetro (dap) en su lugar de origen. La zona ecológica de distribución natural abarca el bosque seco tropical y el bosque húmedo tropical del sureste asiático (CAB Internacional 2000, Fonseca 2004). La teca tiene un fuste recto con corteza áspera y fisurada de coloración café claro, que desfolia en capas grandes y delgadas. Las hojas son simples opuestas,

con pecíolos gruesos. El fruto es subgloboso, tetrágono y aplanado; el exocarpo es delgado y algo carnosos cuando está fresco; el endocarpo es grueso, óseo y corrugado con cuatro celdas que encierran cada una, de una a dos semillas (CAB Internacional 2000, Fonseca 2004, Keogh 2013).

El árbol de teca produce inflorescencia en panículas terminales y las flores poseen un cáliz campanulado de color amarillo verdoso con borde dentado, los pétalos se juntan formando un tubo corto, cinco o seis estambres insertados debajo del tubo de la corola, anteras amarillas, ovadas y oblongas (Figura 1). Estilo blanco amarillento, más o menos pubescente con pelos ramificados, estigma blanco amarillento, bifido, ovario ovado o cónico, densamente pubescente, con cuatro celdas (flor perfecta). La antesis para la inflorescencia entera ocurre durante 1-2 meses. Las flores son débiles portadoras ya que el polen se cae a las pocas horas de su apertura. El período receptivo máximo es entre la media mañana y la primera hora de la tarde; después de este tiempo la viabilidad del polen disminuye gradualmente. Se sabe que es polinizada por dos tipos de abejas *Ceratina hieroglyphica* Sm., de la familia Anthophoridae y *Heriades binghami* Dover (*H. partula* Bingham) de la familia Megachilidae. La madera de teca por su solidez, resistencia, trabajabilidad y calidades estéticas es considerada una de las más valiosas para el mercado de la mueblería, construcciones navales, muelles o atracaderos, puentes y compuertas en agua dulce, durmientes de ferrocarril, piso de parquet, postes de líneas de transmisión eléctrica y de cercas; instrumentos musicales y juguetes (Tangmitcharoen y Owens 1997a, Fonseca 2004, Keogh 2013). La teca se maneja en la actualidad en turnos de corta de 20 a 25 años para la producción de madera comercial (Ladrach 2019).



Figura 1. Estructura floral de teca.

Por el valor de su madera, la teca fue introducida en Costa Rica por la compañía bananera en los años 50's, en la zona de Parrita (Pacífico central), donde alcanza alturas superiores a los 35 m en los mejores sitios. Los mejores crecimientos se dan en altitudes menores a 500 msnm, con una estación seca marcada de 3 a 6 meses, entre 23 y 27 °C de temperatura y una precipitación de 1300 a 2500 mm/año (Fonseca 2004).

La melina (*Gmelina arborea*, *Verbenaceae*) es originaria del sudeste asiático. Es un árbol caducifolio de 12 a 40 m de altura y 60 a 100 cm de diámetro (dap). Presenta una copa amplia en sitios abiertos, pero en plantación su copa es densa y compacta. La corteza es gris o gris amarillento, lisa o escamosa, de marrón pálida a grisácea; en árboles de 6-8 años se exfolia en la parte engrosada de la base del tronco y aparece una nueva corteza, de color más pálido y lisa. Las hojas son simples opuestas. La floración es abundante; flores de color amarillo-anaranjada, en racimos, monoicas perfectas (Figura 2). Su inflorescencia es un racimo o panícula cimosa terminal, cáliz tubular, corola con 4-5 sépalos soldados a la base del ovario, de color amarillo brillante, cáliz 2,5 cm de largo y 4 estambres. El cáliz tiene forma de campana, de largo, 5 dientes de 5 mm; la corola es de color naranja brillante de color amarillo o amarillo parduzco. El fruto es una drupa ovada o

piriforme de 2- 2,5 cm de largo, liso, la pulpa de color naranja-amarillo, que produce de una a cinco semillas. Las semillas de esta especie se encuentran formando parte del endocarpo del fruto, son de forma elipsoidal, comprimidas, de 7-9 mm de largo; testa color café, lisa, opaca, membranosa, muy delgada; el embrión es recto, comprimido, de color amarillo-crema y ocupa toda la cavidad de la semilla, los cotiledones son planos, carnosos y elipsoidales; la radícula es inferior y corta (Rojas *et al.* 2004 y Stock *et al.* 2004). La floración comienza en la estación seca cuando los árboles están sin hojas. La floración ocurre justo cuando las hojas han caído o cuando las nuevas hojas comienzan a desarrollarse. En su área de distribución natural la melina florece de febrero a abril (Rojas *et al.* 2004). En Centroamérica la floración se presenta, usualmente, entre diciembre y febrero, pero en general, en América tropical florece de febrero a marzo, prolongándose en ocasiones hasta abril. *G. arborea* normalmente, inicia su época de floración y fructificación entre los 6-8 años, sin embargo, en algunas plantaciones en Costa Rica florece a partir del tercer año (Rojas *et al.* 2004).



Figura 2. Estructura floral de melina.

La melina tiene gran importancia en nuestros países debido a su tasa extraordinaria de crecimiento y rendimiento en plantación (Rojas *et al.* 2004). Desde su introducción en Costa Rica a finales de los años 60's, su aceptación en el mercado local ha venido en aumento. Se considera como la principal especie para la

producción de tarimas, pero las bondades de su madera le han permitido incursionar en numerosos productos de construcción hasta la industria del mueble (Barrantes y Ugalde 2013). A inicios de los años 90's, algunas empresas reforestadoras como Stone Forestal en Costa Rica y Simpson Company en Guatemala, desarrollaron programas de mejoramiento genético a escala comercial, estableciendo los primeros huertos semilleros en la región (Murillo 1992, Zeaser 1998, Alfaro y De Camino 2000). En los últimos años, GENFORES continuó con los programas de mejoramiento genético de melina en Costa Rica, basado en una estrategia clonal (Chacón y Murillo 2005). La melina fue la especie de mayor producción en los viveros forestales de Costa Rica en el 2012 y posiblemente la de mayor reforestación nacional, con cantidades cercanas a los 2,5 millones de plantas (Murillo y Guevara 2013).

### **Manejo del polen de material élite de teca y melina**

Investigadores asiáticos han logrado polinizar la teca en forma controlada empleando polen fresco, sin embargo, solo han sido reportes a nivel científico. Lo anterior, no corresponde a programas estructurados de mejoramiento genético o de generaciones avanzadas de mejora a escala operativa y mucho menos al componente de manejo y conservación del polen para tal fin (Tangmitcharoen y Owens 1997ab, Palupi y Owens 2010, Indira y Mohanadas 2002, Vasudeva *et al.* 2004).

Palupi y Owens (1997), realizaron investigación en el tema de la polinización, fertilización y producción de embriones. Para ese mismo tiempo Tangmitcharoen y Owens (1997ab), desarrollaron dos trabajos; uno relacionado con el estudio de la biología floral, la polinización, la receptibilidad del pistilo y el crecimiento del tubo polínico del polen de teca. Mientras que el otro estudio estuvo relacionado más específicamente con la viabilidad del polen, crecimiento del tubo polínico y polinización controlada, estos relacionados a la baja producción de frutos en teca. Recientemente Palupi *et al.* (2010) investigaron sobre la importancia de la

fructificación, el aborto de los frutos, y el éxito de la polinización tanto abierta como cruzada en la producción de frutos de teca. Sin embargo, la información aportada por estos trabajos no evidencia el establecimiento de un protocolo eficiente de manejo del polen. Los trabajos se basaron en observación de la polinización y producción de frutos en campo y en la observación de la elongación del tubo polínico por microscopía electrónica, esta última considerada como polinización controlada.

En el caso de melina, no se logró identificar grandes avances en el manejo de polen. Según Solomon y Purnachandra (2006), resultados de experimentos de polinización manual indican que la melina es capaz de producir frutos por autopolinización o polinización cruzada, pero siempre en bajo porcentaje. Solomon y Purnachandra (2006), afirman que la mayor parte de los frutos que resultó de autopolinización fueron abortados después de dos semanas de crecimiento. Stock *et al.* (2004) emprendieron investigaciones en el tema de la técnica de injertos y técnica de polinización controlada como parte del programa de mejoramiento genético de melina en Venezuela. Stock *et al.* (2004), investigaron dos técnicas de injertos, el terminal y el lateral, con los que obtuvieron un éxito aproximado del 75%. Con los injertos establecidos, Stock *et al.* (2004), lograron avanzar en los trabajos de polinización controlada, basando su trabajo en el método tradicional de polinización controlada en melina, desarrollado en el sur de Costa Rica por Zeaser (2001). Por otro lado, los mismos investigadores, han adaptado para melina, la técnica de cruce controlados desarrollada para eucaliptos, conocidos como One-Step Pollination (OSP). Esta técnica OSP, simplificó el método convencional empleado en la especie y fue más rentable. Se determinó que la OSP en melina es prometedora, con aproximadamente una tasa del 30% de éxito. Esta técnica es muy rápida, fácil de aplicar y más barata que los métodos de polinización convencionales.

Los trabajos realizados tanto en teca como en melina aportan información respecto a las horas adecuadas para coleccionar las anteras (polen), la receptividad de la estructura floral femenina, periodo de viabilidad del polen y de la posibilidad de

realizar polinización artificial de manera exitosa. Sin embargo, aún existe vacíos de conocimiento con respecto a la extracción y disposición de los granos de polen, determinación de su contenido de humedad para poder ser almacenado, determinación de una metodología de almacenamiento exitosa y operacional para los programas de mejoramiento genético, así como, la recuperación de los granos de polen del periodo de almacenamiento y, finalmente, la metodología apropiada de polinización.

### **Mejoramiento genético forestal y conservación de germoplasma**

Según Keogh (1980), se ha identificado alrededor de 19 introducciones de semillas de teca en América Latina. Las introducciones se iniciaron a fines del siglo XIX y se estima que provinieron de Burma y la India. Si bien el clima y, en general, los sitios de muchos lugares de la región son aptos para el cultivo de esta especie, a pesar de los años de establecida en Latinoamérica, la especie aparece con un potencial económico importante pero no plenamente consolidado en la región. Las plantaciones de teca no se terminan de consolidar a pesar del potencial que tiene la región y de las experiencias en tecnología de reproducción, silvicultura y mejoramiento genético (Murillo *et al.* 2013). En Latinoamérica, el primer programa de mejoramiento genético se dio, probablemente, en Trinidad y Tobago con la participación de científicos británicos (Keogh 2013). Como en todos los programas de mejoramiento de árboles, el crecimiento y el rendimiento se convirtieron en componentes esenciales de todos los programas de mejoramiento conocidos mundialmente (Murillo *et al.* 2013).

En el caso de melina, los primeros programas de mejoramiento genético en la región centroamericana se iniciaron en el Centro Agrícola Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) a finales de los años sesenta. Este programa de mejoramiento formó parte de un esfuerzo internacional para evaluar material originario de procedencias nativas del sudeste asiático y razas locales desarrolladas en África y Brasil. En Costa Rica, se había establecido un ensayo de procedencias en 1969, en

Manila de Siquirres, en la zona caribe del país (Lega 1988), se presume que la mayor parte del material genético de esta especie que existente en la región provino de estas plantaciones. A finales de los años ochenta el CATIE y el ITCR continuaron con el mejoramiento genético de la melina en el Centro Agrícola Cantonal de Hojancha (CACH) (Barquero 1987), que se posicionó como uno de los principales proveedores de semilla seleccionada en la región latinoamericana, en donde el material producido provenía de una red de rodales (Rojas *et al.* 2004). En los años noventa, la empresa privada de Costa Rica inició los primeros programas de mejoramiento formal con la especie (Murillo 1992, Zeazer 1998).

A pesar de la importancia económica de la teca y melina en el mundo forestal tropical y de la existencia de programas de mejoramiento genético desde antes de los años 60s y 70s, se reportan pocos avances hacia generaciones avanzadas de mejoramiento de ambas especies. Ninguna organización ha logrado avanzar hacia la segunda generación de mejoramiento genético de teca y melina a escala operativa, tal y como ha ocurrido en el mundo de los eucaliptos y pinos, donde se reportan incrementos en productividad sumamente altos. Para esto se requiere desarrollar un programa de cruzamientos controlados entre los genotipos de mejor desempeño, con el fin de continuar obteniendo ganancias genéticas de manera sostenida en las siguientes generaciones de mejoramiento (Tangmitcharoen y Owens 1997, Palupi y Owens 1997, Indira y Mohanadas 2002, Vasudeva *et al.* 2004, Rojas *et al.* 2004).

Con relación a la estimación de parámetros genéticos de melina y teca, los trabajos realizados a nivel nacional son escasos, sin embargo, existen algunos resultados para melina que registran una ganancia genética en volumen comercial de hasta un 40%, en condiciones de suelo ácidos en la zona sur, mientras que en la zona del Caribe (Siquirres), se registró una ganancia en volumen comercial de un 8%, ambas ganancias comparadas con el uso de la mejor semilla comercial. Otros resultados en la zona sur (Osa) reportan una ganancia genética de un 25% en el volumen

comercial. Los valores de heredabilidad y heredabilidad media del clon varían según los sitios y variables evaluadas, por ejemplo, para el caso del DAP se registran valores de  $h^2_{mc}=0.71$  en promedio, mientras que para el volumen comercial se reporta una  $h^2_g=0.34$  y una  $h^2_{mc}=0.66$  en promedio (Hernández et al., 2018). En teca, existen estudios donde se reportan ganancias genéticas de 25.8 % en DAP y de 68.6 % en volumen comercial, ambos comparados entre los mejores 10 individuos del ranking genético con el material testigo (Pérez, 2016).

Hasta la fecha, la mejora tradicional de los árboles mediante ensayos de campo, datos fenotípicos y modelos genéticos cuantitativos ha sido exacta, pero costosa y lenta. Las nuevas tecnologías, como los marcadores moleculares, pueden ayudar en acelerar el proceso de selección (Murillo *et al.* 2018). El genoma de teca se secuenció parcialmente hace algunos años (Thogthawee y Volkaert 2014) y se han realizado diferentes análisis de transcriptoma y proteoma (Diningrat *et al.* 2015; Galeano *et al.* 2014; Quiala *et al.* 2012), pero ha sido a nivel descriptivo. Recientemente Zhao *et al.* (2019), reportan haber logrado el ensamble y secuenciación completa del genoma de teca. Lo anterior, abre la posibilidad que, combinando información del genoma con la selección genómica y manejo de polen, se logre realizar de manera eficiente los cruces controlados, y lograr avanzar hacia las siguientes generaciones de mejoramiento genético.

Aunado a todo programa de mejoramiento genético es recomendable desarrollar programas de conservación, que permitan almacenar los materiales seleccionados y la variabilidad genética presente en la especie de interés, ya que éstos constituyen la materia prima para el mejoramiento. Como opciones de conservación de germoplasma se pueden citar la conservación *in situ* y la conservación *ex situ*. La primera, aunque ideal, no asegura la permanencia de recurso, debido a que está sujeta a desastres naturales y a cambios en las políticas gubernamentales o institucionales. Entre las opciones *ex situ*, las colecciones de campo son una alternativa, sin embargo, el área que se requiere para mantener el recurso forestal

en un estado etéreo es muy extensa y los costos muy elevados. También en esta categoría están los bancos de semillas convencionales, que permiten el almacenamiento de semillas ortodoxas por largos períodos sin que estas pierdan su viabilidad (Roca *et al.* 1991, FAO 2014).

Además, los programas de mejoramiento genético incluyen dentro de sus estrategias de conservación *ex situ* los bancos de polen, donde este material es conservado a corto y largo plazo, con lo que se facilita su disponibilidad para cualquier uso. Por último, los bancos de polen juegan un papel importante en la distribución e intercambio de material genético entre localidades, así como para estudios en fisiología, bioquímica, fertilidad, y la biotecnología básica que implica la expresión de genes, la transformación y la fertilización *in vitro*. El almacenamiento de polen viene a complementar la conservación de semillas y clones y no busca reemplazarlos (Ateyyeh 2009, Towill y Walters 2000).

Para lograr establecer un protocolo de conservación de polen se debe de tomar en cuenta los siguientes aspectos:

a. Estado fisiológico y colecta del polen

En la mayoría de las especies el efecto del genotipo, el estado del polen (madurez completa), el estado fisiológico de la planta, la metodología de conservación aplicada y los pasos dados de recuperación luego del almacenamiento, son los factores que influyen la supervivencia del polen post conservación. En especies tropicales, los granos de polen frescos, maduros y secos extraídos directamente de las anteras, están en condiciones fisiológicas ideales para ser conservados (Ganeshan *et al.* 2008). Se sugiere colectar las flores antes de la antesis y antes de que los estambres y anteras sean extirpados (Towill y Walters 2000).

b. Contenido de humedad y la deshidratación del polen

El contenido de humedad, la tasa de enfriamiento y la temperatura de almacenamiento afectan la longevidad del polen almacenado. Las condiciones de campo y la humedad relativa a la hora de la cosecha afectan a su vez el contenido de humedad del polen. Además, se ha visto que almacenar por largo tiempo en un ambiente de alta humedad relativa afecta y deteriora la germinabilidad del polen. Se ha observado que el polen envejece rápidamente cuando es mantenido a 24°C a 75% de humedad (Ganeshan *et al.* 2008 y Volk 2011).

La deshidratación del polen es un paso crítico del almacenamiento, es necesario determinar un contenido de humedad específico inmediatamente después de la cosecha al que el polen sea tolerante y permita el almacenamiento a bajas temperaturas sin afectar su viabilidad. Según la especie, para un almacenamiento a largo plazo exitoso, se requiere que el contenido de humedad sea reducido a 30% (Towill y Walters 2000, Ganeshan *et al.* 2008, Volk 2011).

Frecuentemente, muchas especies son deshidratadas a un contenido de agua de 0,05 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> peso seco (PS) sin pérdida de viabilidad. Esto se lleva a cabo deshidratando el polen durante toda la noche en un cuarto con un ambiente de baja humedad relativa o sobre campanas con sales que son mantenidas a una humedad relativa cerca del 30%. Frecuentemente, los granos de polen pueden ser deshidratados empleando frascos sellados con sílica gel en un cuarto a temperatura ambiente (Volk 2011).

#### c. Almacenamiento del polen.

Se conoce hoy día, el empleo de los bancos de polen como herramienta en los programas de mejora genética. Además, la transferencia internacional de germoplasma en forma de polen seco está menos restringida, ya que el polen se transporta generalmente bajo restricciones menos rigurosas de cuarentena (Towill y Walters 2000, Abdelnour 2003, Ganeshan *et al.* 2008).

#### d. Rehidratación del polen

El polen deshidratado es susceptible a lesiones por la absorción rápida del agua (imbibición) durante la rehidratación, afectando la germinación y resultando en baja viabilidad. Por otro lado, la baja temperatura a la que es sometido el polen puede agravar el daño por imbibición, que se cree surgen de daños mecánicos en la plasmalema al someter a los lípidos polares a cambios de fase con consecuente fluctuación de la temperatura, contenido de agua y azúcares. La rehidratación lenta evita los daños por imbibición de los granos de polen, que generalmente se logra colocando el polen en un ambiente húmedo antes de la exposición líquida. Además, esta rehidratación gradual es adecuada para la restauración de la integridad de la membrana celular. La rehidratación del polen puede ser tan sencilla como colocar los frascos abiertos de polen en ambientes con 100% de humedad durante 1 a 4 horas a temperatura ambiente (Shi y Yang 2010, Volk 2011, FAO 2014). Además, Shi y Yang (2010) mencionan que la hidratación provoca cambios en el contenido de agua y el volumen del grano de polen, que puede actuar como la señal inicial para desencadenar la germinación del polen. Con la rehidratación, se produce el influjo de  $Ca^{2+}$  e inicia la reorganización del citoesqueleto y también polariza el citoplasma de la célula vegetativa en el grano de polen.

#### e. Viabilidad del polen

Las muestras de polen que son viables en el momento de la dispersión pierden viabilidad en el tiempo, esto puede variar desde menos de una hora hasta varios meses. Lo anterior, provocado por condiciones ambientales como la temperatura y humedad. La viabilidad del polen se refiere a la capacidad del polen para completar eventos de post-polinización en un estigma receptivo y con un efecto de fertilización (Shivanna y Tandon 2014). La viabilidad del polen se puede medir mediante la tinción y la germinación de los granos de polen *in vitro* o mediante la demostración

de la fertilización y el desarrollo exitoso de semillas plantas (Towill y Walters 2000, Ganeshan *et al.* 2008, Volk 2011).

Según Towill y Walters (2000), la viabilidad de los granos de polen se puede evaluar al medir la actividad metabólica empleando tinciones como la Cloruro Trifenil-Tetrazolium (TTC) y la Diacetato de Fluoresceína (FDA). La prueba de TTC se basa en la demostración de la actividad de las deshidrogenasas, un importante grupo de enzimas que participa en la respiración celular. Cuando los granos de polen se colocan en una solución de sal incolora soluble de tetrazolio, si las deshidrogenasas están activas en el citoplasma, estas reducen la molécula de tetrazolio soluble incoloro a una sustancia insoluble rojiza llamado formazan (Shivanna y Rangaswamy 2010, Shivanna y Tandon 2014). Por otro lado, al colocar los granos de polen en una solución de FDA, la FDA no polar y no fluorescente ingresa fácilmente al citoplasma del polen ya que la membrana plasmática no actúa como una barrera, sí las esterasas citoplasmáticas están activas, hidrolizan la molécula de FDA y liberar fluoresceína. A diferencia de la FDA, la fluoresceína que es polar no atraviesa fácilmente la membrana citoplasmática, por lo tanto, se acumula en el citoplasma de los granos viables y da un verde brillante o fluorescencia verde amarillenta bajo la luz de un microscopio de fluorescencia (Shivanna y Rangaswamy 2010, Shivanna y Tandon 2014).

La viabilidad es también medida en términos de fertilidad. La fertilidad es la medición de la habilidad de los granos de polen para germinar y producir semilla (Towill y Walters 2000). La tinción de granos de polen con acetocarmín se usa comúnmente para la cuantificación de la fertilidad del polen. El acetocarmín permite identificar el polen fértil y turgente lleno de contenido citoplasmático (Shivanna y Tandon 2014). Lo anterior, se debe a que el acetocarmín tiñe los núcleos de un rojo intenso y brillante ya que las cromatinas muestran afinidad por el reactivo (Gupta y Holmstrm 2005). El núcleo del polen es rico en material cromosómico y el polen viable se tiñe de rosa a rojo intenso con acetocarmín, mientras que el polen estéril, en su mayoría

arrugado, no se tiñe y, por lo tanto, permanece casi blanco y transparente (Rathod *et al.* 2018, Titford 2009). Además, el acetocarmín es usado normalmente para detectar glicoproteínas, cromatina y ADN en estudios citoquímicos (Gupta y Holmström 2005). Según González *et al.*, (2002), este método se puede utilizar para la discriminación cuando se tienen muchos genotipos, pues tiene la ventaja de permitir hacer predicciones rápidas de la fertilidad masculina. También menciona que esta tinción sólo permite detectar diferencias entre granos de polen abortados y no abortados y su utilidad es fundamentalmente en los estudios de androesterilidad, para conocer el diámetro del polen y para conocer la dotación cromosómica. González *et al.* (2002), también menciona que el acetocarmín sobrestima la viabilidad del polen, pero da información adicional de la morfología nuclear. Para el éxito de la fertilización y cuajado de semillas, los granos de polen tienen que ser no sólo fértiles sino también viables al momento de la polinización y esta puede ser medida también con la germinación *in vitro* de los granos de polen (Shivanna y Tandon 2014).

La germinación *in vitro* es la prueba comúnmente empleada para evaluar la viabilidad. Varios medios han sido usados, sin embargo, la formulación Brewbaker and Kwack (1963) ha sido la más empleada hasta la actualidad (Towill y Walters 2000). Por último, el método más auténtico para probar la viabilidad del polen es usar una muestra de polen para llevar a cabo la germinación *in vivo* por ensayos de polinización controlada (Shi y Yang 2010).

Una variable más que se podía analizar a la hora de evaluar la viabilidad del polen es mecanismo de Muerte Celular Programada (MCP) o apoptosis. La MCP se refiere a una autodestrucción de la célula que se presenta en las plantas; este mecanismo se desencadena de manera organizada. Es requerida para un crecimiento y desarrollo normal y para la renovación de células dañadas o infectadas. La muerte celular programada puede iniciarse por una señal de desarrollo específica o por eventos letales, tales como el ataque de patógenos o errores en la replicación del

ADN durante la división celular. Durante la apoptosis, el núcleo celular se condensa y los cromosomas se fragmentan como resultado de la digestión del ADN por endonucleasas entre nucleosomas específicos. Además de las nucleasas, las caspasas se dirigen a las proteínas ocasionando rupturas simples al identificar en la proteína el residuo de aspartato. La digestión de las proteínas por parte de las caspasas conduce a la muerte controlada de la célula. Durante este proceso, la membrana plasmática forma protuberancias irregulares, o ampollas, y las células se fragmentan en numerosas vesículas llamadas cuerpos apoptóticos. (Taiz y Zeiger 2015). En polen, el mecanismo se presenta en la prevención de autofecundación por MCP de las células del estigma y/o del tubo de polen (Xu y Zhang 2009, Sanzón y Zavaleta 2011, Taiz y Zeiger 2015). Esta muerte celular programada de las células del estigma y del tubo polínico podría explicar la no germinación del polen tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*.

### **Técnicas de conservación a corto y largo plazo, como herramientas promisorias para la conservación de polen de teca y melina**

En América Latina, GENFORES, ha llegado a un nuevo desafío científico-tecnológico en relación con el salto hacia la segunda generación de mejoramiento genético tanto de teca como melina (Badilla y Murillo 2011a, Badilla y Murillo 2011, Murillo *et al.* 2016). Para esto se requiere poder desarrollar un programa de cruzamientos controlados entre los genotipos de mejor desempeño, para provocar el mayor progreso genético posible. Por lo anterior, la cooperativa ha desarrollado en forma conjunta con el equipo científico del ITCR y la UNA el proyecto denominado "Desarrollo de la segunda generación de mejoramiento genético de teca (*Tectona grandis* L.) y melina (*Gmelina arborea* Roxb.) en la cooperativa GENFORES (2015-2018)", siendo uno de sus componentes prioritarios el establecimiento de un banco de polen de teca y melina por la metodología de crioconservación (-196°C) y almacenamiento convencional a bajas temperaturas (5°C) y en medio oleoso (25°C).

Es posible almacenar el polen de muchas especies a temperaturas entre 4°C y -20°C para el corto plazo. El polen seco que se mantiene entre 4°C y -20°C permanece viable durante unos días hasta un año, que puede ser adecuado para su uso en programas de mejoramiento. En la presente investigación, y como parte de la conservación a corto plazo, se considera adaptar la técnica de almacenamiento de esporas de hongo como *Trichoderma sp* en un ambiente oleoso a células como el polen. En este ambiente, los cultivos pueden mantenerse por varios días o años a temperatura ambiente (Gato 2010, Rodríguez y Gato 2010). Por otro lado, la viabilidad a largo plazo del polen puede ser mantenida mediante el almacenamiento de polen a -80°C o en nitrógeno líquido (NL) a -196°C. Una vez desecado, el polen puede ser dispensado en crioviales para almacenamiento a largo plazo en NL o vapor NL (Wang 1993, Volk 2011).

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Forestal (LBF) del Instituto de Investigación y Servicios Forestales de la Universidad Nacional (UNA), como parte del proyecto " Desarrollo de la segunda generación de mejoramiento genético de teca (*Tectona grandis L.*) y melina (*Gmelina arborea Roxb.*) en la cooperativa GENFORES (2015-2018) ", desarrollando en forma conjunta con el equipo científico del ITCR y UNA.

Con el desarrollo de esta investigación se impactaría de manera positiva al sector forestal local, ya que se estarían produciendo materiales de mejor calidad (madera) y se posicionaría a las empresas nacionales con mejores precios en los mercados.

**Objetivo General**

Desarrollar la capacidad para manejar y conservar el polen de *Tectona grandis* y *Gmelina arborea*.

**Objetivos específicos**

1. Optimizar metodologías de colecta y procesamiento de polen de teca y melina.
2. Estandarizar metodologías de análisis de germinación y viabilidad de polen de teca y melina.
3. Adaptar metodologías de conservación a corto y largo plazo de polen de teca y melina.

## **Lieratura citada**

Abdelnour, EA. 2003. Conservación *in vitro* de los recursos fitogenéticos. Cartago, Costa Rica: Editorial Tecnológica. 27 p.

Alba, V; Bisignano, V; Alba, E; De Stradis, A; Polignano, GB. 20011. Effects of cryopreservation on germinability of olive (*Olea europaea* L.) pollen. Genetic Resources and Crop Evolution 58: 977-982

Alfaro, MM; De Camino, RV. 2002. Melina (*Gmelina arborea*) in Central América. Forest Plantations Working Paper 20. Forest Resources Development Service. Forest Resources Division. FAO. Roma. 18 p.

Arriagada, VL. 2011. Manual de inspección fitosanitaria. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), Roma, IT. pp74

Ateyyeh, AF. 2009. Storing Pollen of Two Olive Cultivars: Rasie and Nabali Baladi. International Journal of Fruit Science 9:282-293

Ávila, C; Murillo, R; Murillo, O. 2015. Selección de clones superiores de dos conjuntos genéticos de *Gmelina arborea* en el Pacífico sur de Costa Rica. Revista de Ciencias Ambientales Vol 49 (1): 17-35.)

Badilla, Y.; Murillo, O. 2017. Ganancia realizada en plantaciones clonales de teca en Costa Rica. En: I Simposio Internacional GENFORES. 26-27 enero, 2017. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.

Badilla, Y; Murillo, O. 2011a. Avances en el mejoramiento genético de la teca en GENFORES, Costa Rica. En: Conferencia Forestal Internacional: Bosques plantados de teca. Teaknet. 31 octubre al 3 de noviembre, 2011. San José, Costa Rica.

Badilla, Y; Murillo, O. 2011b. Estrategia y avances en mejoramiento genético de GENFORES. En: Seminario Fomento del cultivo eficiente de madera, mediante el manejo intensivo. 16-18 noviembre, 2011. Sede Universidad Nacional, Paso Canoas, La Cuesta, Puntarenas.

- Barquero, ME. 1987. Establecimiento de rodales semilleros de *Gmelina arborea* Roxb. Hojanca, Guanacaste. In Rojas, FE (ed.). Primer Taller Nacional de Semillas y Viveros Forestales. MEMORIA noviembre, 1985, San José, CR. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago. 141-153 pp
- Barrantes, AR.; Ugalde, S.A. 2013. Usos y aportes de la madera en Costa Rica. Oficina Nacional Forestal. Heredia, Costa Rica. 32 p.
- Brewbacker, JL; Kwack, BH. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. American Journal of Botany 50 (9):859-865
- CAB Internacional. 2000. Forestry Compendium Global Module: *Tectona grandis* L. f. (Disco compacto). Wallingford, UK, CABI.
- Chacón, P; Murillo, O. 2005. Análisis comparativo de la producción de minijardines clonales hidropónicos y jardines clonales en tierra de melina (*Gmelina arborea* Roxb.). Kurú: Revista Forestal (Costa Rica) 2(6):1-7.
- CIPF (Convención Internacional de Protección Fitosanitaria). 2016. 2007. Marco para el análisis de riesgo de plagas. Roma, CIPF, FAO. pp7
- Diningrat, D. S., Widiyanto, S. M., Pancoro, A., Shim, D., Panchangam, B., Zembower, N., & Carlson, J. E. (2015). Transcriptome of Teak (*Tectona grandis*, Lf) in Vegetative to Generative Stages Development. Journal of Plant Sciences, 10(1), 1.
- Di Rienzo, JA; Casanoves, F; Balzarini, MG; Gonzalez, L; Tablada, M; Robledo, CW. 2009. InfoStat versión 2009. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, IT). 2014. Normas para bancos de germoplasma de recursos filogenéticos para la alimentación y la agricultura. Roma. 162p
- Fonseca, W. 2004. Manual para productores de teca (*Tectona grandis* L.f) en Costa Rica (en línea). Costa Rica, SIREFOR. Consultado 20 de oct. 2015. Disponible en

[http://www.sirefor.go.cr/Documentos/Reforestacion/2004\\_Fonseca\\_ManualProductosTeca.pdf](http://www.sirefor.go.cr/Documentos/Reforestacion/2004_Fonseca_ManualProductosTeca.pdf)

Galeano, E., Vasconcelos, T. S., Ramiro, D. A., De Martin, V. D. F.; Carrer, H. (2014). Identification and validation of quantitative real-time reverse transcription PCR reference genes for gene expression analysis in teak (*Tectona grandis* Lf). BMC research notes, 7(1), 464.

Ganeshan, S; Rajasekharan, PE; Shashikumar, S; Decruz, W. 2008. Chapter 17: Cryopreservation of Pollen. B.M. Reed (ed.), Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer. 443-464

Gato, Y. 2010. Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum rifai*. FITOSANIDAD 14 (3):189-195

Gelo, O; Braakmann, D; Benetka, G. (2008). Quantitative and qualitative research: Beyond the debate. Integrative psychological and behavioral science, 42(3), 266-290.

González, ME; Estévez, A; Castillo, J; Salomón, J; Moré, O; Hernández, M. 2002. La Calidad de la papa: Requerimiento Indispensable del Mejoramiento Genético Tradicional de la papa en Cuba. Revista Latinoamericana de la Papa 13: 75-94

Gutiérrez, B; Quintero, P; Nieto, V; Murillo, O. 2003. Enfoques cooperativos para el mejoramiento genético y la conservación de recursos genéticos forestales en Chile, Colombia y Costa Rica. Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales 12(3): 111 – 122.

Gupta, P.K. and D. Holmstrom. 2005. Double staining technology for distinguishing embryogenic cultures. In Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Eds. J.S. Mohan and P.K. Gupta. Springer, Netherlands, pp 573–575.

Hernández, W; Murillo, O; Badilla, Y. 2018. Ganancia genética de Melina (*Gmelina arborea* ROXB.) en Costa Rica. En: VII Congreso Forestal Latinoamericano. Del 12 al 15 de junio. Ciudad de Vitoria, Espírito Santo, Brasil.

Yorleny Badilla Valverde<sup>3</sup>Indira, EP; Mohanadas, K. 2002. Intrinsic and extrinsic factors affecting pollination and fruit productivity in teak (*Tectona grandis* Linn.f.). Indian J. Genetics 62 (3): 208-2014.

Keogh, R. 1980. Teak (*Tectona grandis*) provenances of the Caribbean, Central America, Venezuela and Colombia. En: IUFRO Meeting, Working Group S1.07.09 (Rio Piedras, Puerto Rico, 8-12 Sept.). p. 343-358

Keogh, R. 2013. Capítulo 2: La teca y su importancia económica a nivel mundial. En: De Camino, R.; Morales, J.P. (eds). Las plantaciones de teca en América Latina: Mitos y realidades.

Ladrach, W. 2019. Manejo de plantaciones de la teca para productos sólidos. Actas de la Convención Nacional de la Society of American Foresters (SAF). Sección International Trade and Markets. Del 30 de setiembre al 4 de octubre. Orlando, Florida, USA. Pp27

Lega, F. 1988. Estudio de la Forma de *Gmelina arborea* Roxb. Análisis de las plantaciones de Manila, Siquirres. Tesis Mg.Sc. Universidad de Costa Rica y Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) 116 p.

Murillo, O. 1992. Diseño de un huerto semillero de *Gmelina arborea* para la producción de semilla certificada en la zona norte de Costa Rica. Tecnología en Marcha. Vol 11 (3): 51-58 p.

Murillo, O. 2011. Estrategia de mejoramiento genético para la cooperativa GENFORES. Ponencia magistral. En: XII Congreso Nacional Colombiano de Mejoramiento Genético de Cultivos. Montería, Córdoba, Colombia. 22-24 de junio, 2011.

Murillo, O; Badilla, Y. 2012. Estado del mejoramiento genético de teca. En: II Simposio OLAT, 12-13 noviembre, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

Murillo, O; Guevara, V. 2013. Estado de los Recursos Genéticos Forestales de Costa Rica. MINAET/FAO/CONAGEBIO, San José, Costa Rica. 159 pp.

- Murillo, O; Wright, J; Monteuis, O; Montenegro, F. 2013. Capítulo 6: Mejoramiento genético de la teca en América Latina. En: De Camino, R.; Morales, J.P. (eds). Las plantaciones de teca en América Latina: Mitos y realidades. Boletín Técnico 397. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 86-111 p
- Murillo, O; Badilla, Y; Rojas, F. 2016. Desarrollo del mejoramiento genético forestal en Costa Rica y liderazgo regional con especies tropicales. En: XIV Congreso Nacional Agropecuario, Forestal y Ambiental. (CONAFA), Belén, Costa Rica, 25–27 de octubre, 2016.
- Murillo, O; Rojas, F; Jiménez, P. 2018. Desarrollo de recursos genómicos en *Tectona grandis*. Fase II, Secuenciación del genoma y búsqueda de marcadores SNP's para su utilización en mejoramiento genético. Proyecto de investigación 2019-2021. Vicerrectoría de Investigación y Extensión. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. Pp 25
- Palupi, E; Owens, J; Sadjad, S; Sudarsono, S; Solihin, D. 2010. The importance of fruit set, fruit abortion, and pollination of teak (*Tectona grandis*). Can. J.For.Res. (40): 2204-2214.
- Palupi, E; Owens J. 1997. Pollination, fertilization and embryogenesis of teak (*Tectona grandis* Linn f). Int. J. Plant Science 158 (3): 259-273.
- Perez, R. 2016. Evaluación de ensayos genéticos de teca (*Tectona grandis* L.f.) en Costa Rica y Panamá, empresa Brinkman y Asociados Reforestadores de Centroamérica S.A. Tesis para optar por el grado académico de licenciatura en Ingeniería Forestal. Escuela de Ingeniería Forestal. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Pp 76.
- Quiala, E., Cañal, M. J., Rodríguez, R., Yagüe, N., Chávez, M., Barbón, R.; Valledor, L. (2012). Proteomic profiling of *Tectona grandis* L. leaf. Proteomics, 12(7), 1039-1044.

- Roca, M; Mroginski, LA; Kartha, KK. 1991. Crioconservación del Germoplasma. En: Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia. p. 719-729.
- Rodríguez, D; Gato, Y. 2010. Métodos alternativos en la conservación de *trichoderma harzianum rifai*. Fitosanidad 14 (4): 241-246
- Rojas, F; Arias, D; Moya, R; Meza, A; Murillo, O; Arguedas, M. 2004. Manual para productores de Melina. MANUAL PARA PRODUCTORES DE MELINA (*Gmelina arborea*) EN COSTA RICA. (En línea). Costa Rica, CATIE. Consultado el 20 de oct. 2015. Disponible en [http://www.sirefor.go.cr/Documentos/Especies\\_plantaciones/MELINA/Manual%20para%20los%20productores%20de%20melina.pdf](http://www.sirefor.go.cr/Documentos/Especies_plantaciones/MELINA/Manual%20para%20los%20productores%20de%20melina.pdf)
- Rathod, V; Behera, TK; Munshi, AD; Durgesh, K; Jat, GS; Krishnan, B and Sharma, N. 2018. Pollen viability and in vitro pollen germination studies in Momordica species and their intra and interspecific hybrids. International Journal of Chemical Studies 2018; 6(6): 32-40
- Sanzón, D & Zavaleta, E. 2011. Respuesta de Hipersensibilidad, una Muerte Celular Programada para Defenderse del Ataque por Fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología, 29(2), 154-164.
- Shivanna, KR; Rangaswamy, NS. 1992. Tests for Pollen Viability. In: Pollen Biology. Springer, Berlin, Heidelberg. Pp 33-38
- Shivanna, KR; Tandon, R. 2014. Reproductive Ecology of Flowering Plants: A Manual. New Delhi, India. Springer. Pp. 169
- Solomon, AJ; Purnachandra, RS. 2006. Pollination by bees and passerine birds and seed dispersal by monkeys in the white teak *Gmelina arborea* Roxb, a commercially important timber tree species in the Eastern Ghats. Current Science 90 (2): 232-236
- STATSOFT INC. 2005. Stadiística (data analysis software system), version 7.1. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com). Tulsa, OK, USA.

- Steel, RG; Torrie, JH. 1992. Bioestadística: principios y procedimientos, McGRAW HILL, México 622 p.
- Stock, J; Vargas, M; Angarita, K; González, R. 2004. Seed production of *Gmelina arborea* by controlled pollination. *New Forest* (28): 167–177.
- Suárez, L; Castilla, Y; Hernández, M; Salomón, J; Estévez, A; Céspedes, O; Araujo, B. 2010. Efecto del Pectimorf® en la germinación in vitro del polen de papa (*Solanum tuberosum*). *Temas de Ciencia y Tecnología*. 14 (40):43-46.
- Tangmitcharoen, S; Owens, JO. 1997a. Floral Biology, Pollinization, pistil Receptivity, and Pollen-tube growth of teak (*Tectona grandis* Linn f). *Annals of Botanical* 79: 401-410
- Tangmitcharoen, S; Owens, JO. 1997b. Pollen viability and pollen-tube growth following controlled pollination and their relation to low fruit production in teak (*Tectona grandis* Linn f). *Annals of Botanical* 80: 401-420
- Taiz, L; Zeiger, E; Møller, I; Murphy, A. 2015. *Plant Physiology*. 6<sup>th</sup> ed. Sunderland, Massachusetts, USA. Sinauer Associates. Inc. 705p
- Thongthawee, S; Volkaert, H. 2014. Analysis of teak (*Tectona grandis*) genome and its diversity. In *The 26th annual meeting of the Thai Society for Biotechnology and international conference* (pp. 508-514).
- Titford, M. 2009. Progress in the development of microscopical techniques for diagnostic pathology. *The Journal of Histotechnology* 32(1):9-10
- Towill, LE; Walters, C. 2000. Cryopreservation of pollen. *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: current research progress and application*. Eds. F Engelmann; H Takigi. Tsukuba, JP, JIRCAS / Rome, IT, IPGRI. p. 115
- Vasudeva, R; Hanumantha, M; Gunaga, RP. 2004. Genetic variation for floral traits among teak (*Tectona grandis* Linn.f.) clones: implications to seed orchard fertility. *Current Science* Vol 87 (3): 358-362.

Volk, GM. 2011. Collecting plant genetic diversity: Technical guidelines: Chapter 25 Collecting pollen for genetic resources conservation. National Center for Genetic Resource Preservation, USDA-ARS. Pp 10

Shi, DQ; Yang, WC. 2010. Plant Developmental Biology—Biotechnological Perspectives: Chapter 13: Pollen Germination and Tube Growth; Chong Pua, Eng.; Michael, R.D., Eds.; Springer: Heidelberg, Germany, 2010; p. 249

Wang, B.S.P; Charest, PJ; Downie, B. 1993. Ex Situ Storage of Seeds, Pollen and in Vitro Cultures of Perennial Woody plant species. FAO, Rome, Italy. Pp 83

Xu, Q; Zhang, L. 2009. Plant caspase-like proteases in plant programmed cell death. Plant signaling & behavior, 4(9), 902–904.

Zeaser, D. 1998. Programa de mejoramiento genético de la Ston Forestal en la zona sur de Costa Rica. En: Seminario. Aumento de la rentabilidad de las plantaciones forestales: un reto ligado al uso de semilla de alta calidad. San José, Costa Rica. 19 de mayo de 1998. Sp.

Zhao, D, Hamilton JP, Bhat W, Johnson SR, Godden GT, Kinser TJ, Boachon B, Dudareva N, Soltis DE, Soltis PS, Hamberger B 2 and Buell CR. 2019. A chromosomal-scale genome assembly of *Tectona grandis* reveals the importance of tandem gene duplication and enables discovery of genes in natural product biosynthetic pathways. GigaScience, 8, 2019, 1–10

# MARCO METODOLÓGICO

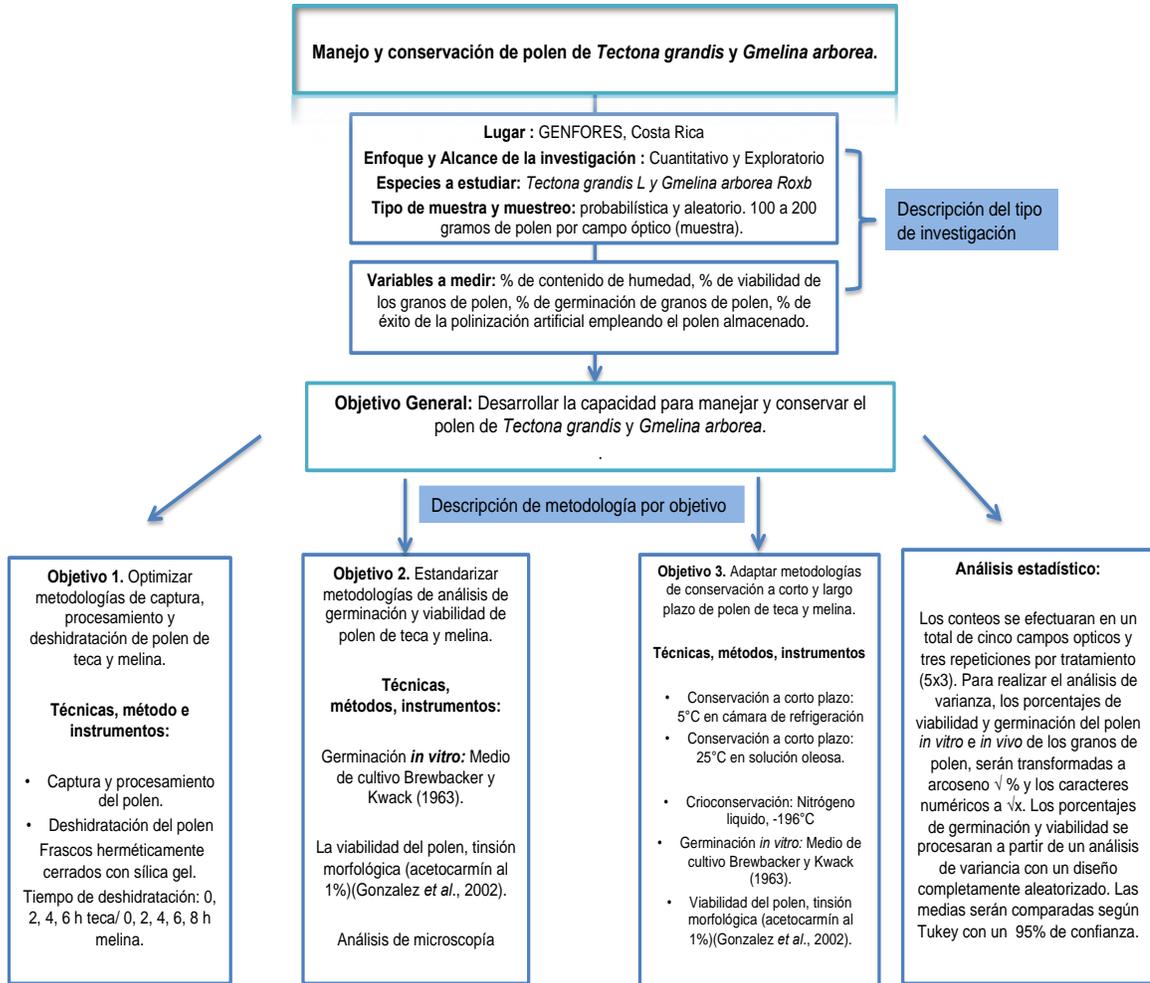


Figura 3. Mapa conceptual de la metodología que se siguió para el desarrollo de la investigación en manejo y conservación de polen de teca y melina.

## **CAPÍTULO I**

# **OPTIMIZACIÓN DE LA GERMINACIÓN DE POLEN DE TECA (*TECTONA GRANDIS*) PARA PROGRAMAS DE MEJORAMIENTO GENÉTICO**

## Resumen

La teca se ha convertido en una de las especies más plantadas en las regiones tropicales del mundo debido al alto precio de su madera en los mercados internacionales. Esto ha motivado el desarrollo de programas de mejoramiento genético forestal en la región de América Latina y en el mundo tropical en general. Con los avances de dichos programas, se ha logrado la silvicultura clonal a escala operativa. Recientemente, se están haciendo importantes esfuerzos para avanzar hacia la próxima generación de mejoramiento, ya que el conocimiento sobre la biología floral y el manejo del polen se han convertido en temas importantes. Actualmente, se está desarrollando un programa de mejoramiento a través de la Cooperativa de Mejoramiento Forestal GENFORES, la cual es un modelo de vinculación entre la academia y las empresas forestales que se inició en Costa Rica y ahora involucra a seis países latinoamericanos. Para avanzar a las próximas generaciones de mejoramiento, se requiere del desarrollo de capacidades en temas como los bancos de polen, que requieren a su vez polen de calidad, lo que permitirá el intercambio de polen entre los miembros de la cooperativa. Los estudios de fertilidad del polen tienen un valor considerable en los programas de mejoramiento genético, con el fin de determinar la viabilidad y la germinación del polen en colecciones de genotipos, antes de realizar actividades operativas de cruces controlados. En este estudio, se optimizó los protocolos de análisis de calidad del polen en términos de viabilidad y germinación del polen fresco de teca. Los resultados de esta investigación muestran que se puede lograr un 90% de viabilidad y un 28% de germinación en granos de polen frescos, tanto dentro como fuera de la antera, previamente deshidratados en gel de sílice durante 2 a 4 h. El medio Brewbacker y Kwack (BK) al 10% de sus sales + 10% de sacarosa y a un pH de 7 debe usarse como medio de germinación. Es posible evaluar la calidad del polen de teca utilizando los parámetros definidos en este estudio, lo que a su vez permitirá el manejo y la purificación del polen, brindando la oportunidad de realizar cruces controlados a escala operativa como parte de los programas de mejoramiento de la teca.

**Palabras clave:** *Tectona grandis*, polen, germinación, viabilidad, tensión.

## **Abstract**

Teak has become one of the most widely planted species in tropical regions of the world, given its high price for its timber in international markets. This has motivated the development of tree improvement programs in the Latin American region and in the tropical world in general. The latest advances have achieved clonal forestry at an operational scale. Recently, important efforts are being made to advance towards the next breeding generation, since knowledge about floral biology and pollen management have become important issues. A breeding program is being developed through the Tree Improvement Cooperative GENFORES—a vinculation model between the academy and forestry companies that was initiated in Costa Rica and now involves six Latin American countries. In order to advance into the next breeding generations, building capacities in topics such as pollen banks requires pollen quality, thus enabling the exchange of pollen among cooperative members. Pollen fertility studies are of considerable value in breeding programs, in order to determine pollen viability and germination in collections of genotypes, before going into mating operational activities. In this study, we optimized pollen quality analysis protocols in terms of the viability and germination of fresh teak pollen. Results of this research show that 90% viability and 28% germination can be achieved in fresh pollen grains, both inside and outside the anther, previously dehydrated in silica gel for 2 to 4 h. Brewbacker and Kwack (BK) medium at 10% of its salts + 10% sucrose and at a pH of 7 must be used as the germination medium. It is possible to evaluate teak pollen quality using the parameters defined in this study, which will in turn allow pollen management and purification, providing an opportunity for carrying out controlled crosses at an operational scale as part of teak breeding programs.

**Keywords:** forest plantations; tree improvement; teak; pollen management

## Introducción

La teca (*Tectona grandis* L. f.), es un árbol originario del sureste asiático, el cual puede alcanzar 45 a 50 m de altura y de 2 a 2,5 m de diámetro a altura de pecho (dap) en su lugar de origen. La madera de teca por su solidez, resistencia, trabajabilidad y calidades estéticas es considerada una de las más valiosas para el mercado de la mueblería, construcciones navales, muelles o atracaderos, puentes y compuertas en agua dulce, durmientes de ferrocarril, piso de parket, postes de líneas de transmisión eléctrica y de cercas; instrumentos musicales y juguetes (Fonseca 2004, Keogh 2013).

La gran importancia económica que tiene actualmente la teca como resultado de los diferentes usos de su madera, ha impulsado el desarrollo de programas de mejoramiento genético. En Latinoamérica, el primer programa de mejoramiento genético se dio, probablemente, en Trinidad y Tobago con la participación de científicos británicos (Keogh 1980). Como en todos los programas de mejoramiento de árboles, el crecimiento y el rendimiento para la producción de madera, se convirtieron en componentes esenciales de todos los programas de mejoramiento conocidos mundialmente (Murillo *et al.* 2013).

Existe en la actualidad y a nivel mundial, mucho interés por realizar cruces controladas de genotipos seleccionados e incrementar la eficiencia del mejoramiento genético en teca en todo el mundo, actualmente existe un gran interés en lograr avances hacia la segunda generación de teca, lo que requiere el desarrollo de técnicas de polinización controladas y la capacidad de gestión del polen en general (Murillo *et al.* 2013, Murillo *et al.* 2016). Nuevos desafíos han aparecido en los últimos años, muchos de ellos pueden abordarse a través del mejoramiento genético, tales como resistencia a enfermedades, resistencia a la sequía y control del color del duramen, entre otros temas relacionados con la productividad, la adaptabilidad y la aceptación del mercado (Murillo *et al.* 2013, Moya *et al.* 2013,

Guzmán *et al.* 2017, Resende *et al.* 2018). Por lo tanto, existe una necesidad urgente de avanzar en la mejora genética de la teca.

Por su parte, investigadores asiáticos han logrado polinizar la teca en forma controlada empleando polen fresco, sin embargo, solo han sido reportes a nivel científico. Lo anterior, no corresponde a programas estructurados de mejoramiento genético o de generaciones avanzadas de mejora a escala operativa y mucho menos al componente de manejo y conservación del polen para tal fin (Tangmitcharoen y Owens 1997ab, Palupi y Owens 1997, Indira y Mohanadas 2002, Vasudeva *et al.* 2004).

Palupi y Owens (1997), realizaron investigaciones en el tema de la polinización, fertilización y producción de embriones. Para ese mismo tiempo Tangmitcharoen y Owens (1997ab), desarrollaron dos trabajos; uno relacionado con el estudio de la biología floral, la polinización, la receptibilidad del pistilo y el crecimiento del tubo polínico del polen de teca. Mientras que el otro estudio estuvo relacionado más específicamente con la viabilidad del polen, crecimiento del tubo polínico y polinización controlada, estos relacionados a la baja producción de frutos en teca.

Palupi *et al.* (2010) investigaron sobre la importancia de la fructificación, el aborto de los frutos y el éxito de la polinización tanto abierta como cruzada en la producción de frutos de teca. Los trabajos se basaron en observaciones de la polinización y producción de frutos en campo y en la observación de la elongación del tubo polínico por microscopía electrónica, esta última considerada como polinización controlada.

Sin embargo, y a pesar de los antecedentes anteriormente citados, no se evidencia el establecimiento de un protocolo eficiente para determinación de la calidad del polen de teca. Según Rejón *et al.* (2010), la calidad del polen es un parámetro fundamental para los estudios en la biología de la polinización, concretamente en la

selección de variedades polinizadoras, reconocimiento polen-pistilo, germinación, crecimiento del tubo polínico y fertilización.

Con el fin de estimar la calidad del polen de teca en términos de viabilidad y la capacidad de germinación de los granos de polen, se determinó varios parámetros como: método de deshidratación, medio de cultivo y pH del medio. La prueba de germinación *in vitro* ha sido una prueba de rutina utilizada para medir la viabilidad del polen. Esta prueba requiere algunos estudios preliminares para estandarizar el medio de cultivo que permite la germinación óptima y el período de incubación. (Shivanna y Tandon 2014). El presente estudio tuvo como objetivo principal optimizar el proceso de germinación de polen de teca con el fin de apoyar el avance hacia nuevas generaciones de mejoramiento genético.

## **Materiales y métodos**

**Colecta del polen.** Como material experimental se utilizó polen proveniente de panículas de la empresa Novelteak situados en La Cruz, Guanacaste. Se seleccionaron arboles establecidos en ensayos clonales, con presencia de inflorescencias al momento de la colecta (5:00 am y las 7:00 am), según lo sugiere Tangmitcharoen y Owens 1997b, Ganeshan *et al.* 2008, Volk 2011. De estas inflorescencias se colectaron flores sin abrir, las cuales fueron colocadas en bolsas plásticas con cierre hermético durante una hora para inducir la apertura de estas. Una vez abiertas las flores se procedió a la extracción mecánica de las anteras con ayuda de unas pinzas.

**Efecto de la deshidratación sobre la viabilidad y germinación del polen.** Para evaluar el efecto de la deshidratación (0, 2, 3, 4 h en sílica gel) del polen de teca contenido dentro y fuera de la antera, se empleó el método de tinción morfológica y de germinación *in vitro* (González 2002). Para determinar el porcentaje de viabilidad del polen, se empleó como colorante el acetocarmín al 1%. Los granos de polen

redondeados y coloreados de rojo se consideraron viables (Figura 4a) y no viables los constreñidos y sin teñir (Figura 4b). La tinción de los granos de polen con acetocarmín, se usa comúnmente para evaluar la fertilidad del polen. A medida que los granos de polen fértiles se llenan del tinte, toman una coloración profunda y uniforme. Por otro lado, los granos de polen estériles o muertos están marchitos, con poco contenido celular o vacíos (Shivanna y Tandon 2014).

Para determinar el porcentaje de germinación, se utilizó el método de germinación *in vitro*, empleando el medio Brewbacker and Kwack (BK) (1963) al 10% de sales (g/100 mL) + 10% de sacarosa (g/100 mL) en solución acuosa pH=7. Solo se consideraron germinados aquellos granos con un tubo polínico de longitud mayor o igual al diámetro del grano de polen (Figura 4c) (González 2002). Un tubo de polínico se define como una proyección del grano de polen, que es al menos la mitad del ancho de un grano de polen (Johnson y Kost 2010). El porcentaje de viabilidad y germinación se determinó teniendo en cuenta el número de granos viables y germinados en relación con los granos totales encontrados en cada campo microscópico. Los conteos de polen se realizaron utilizando un microscopio Nikon ALPHAPHOT-2 YS2 con el lente 10x en un número de 100 a 200 granos de polen por campo óptico (10x). El efecto de la deshidratación sobre la viabilidad y la germinación *in vitro* se analizó mediante un diseño de bloques completos al azar, con 4 tratamientos (horas de deshidratación). Cada tratamiento tuvo 3 repeticiones, con 5 lecturas por repetición.

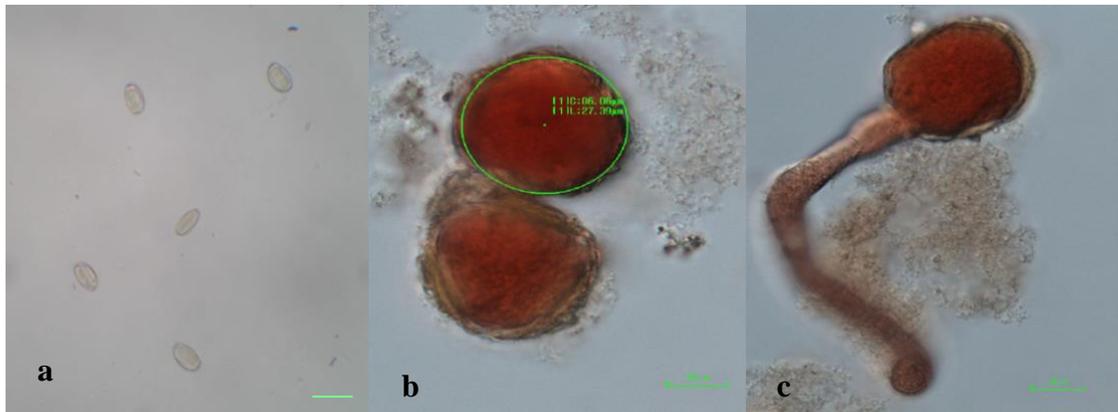


Figura 4. Polen de teca (*Tectona grandis*) no viable (A) Barra= 100  $\mu\text{m}$ , viable (B) y germinado (C) Barra= 10  $\mu\text{m}$ , empleando la tinción con acetocarmín.

**Efecto del pH en la germinación del polen deshidratado.** Las anteras se deshidrataron en recipientes con gel de sílice (50 g por recipiente) durante 0, 2, 4 y 6 h. El polen extraído de cada período de deshidratación se utilizó para visualizar la viabilidad y la germinación del polen. Para la viabilidad, se usó tinción morfológica con acetocarmín al 1%, mientras que para la germinación se usó medio BK (1962) como medio de control al 10% de sus sales + 10% de sacarosa con rangos de pH de 6,0; 6,3; 6,5; 6,8 y 7,0; respectivamente. Los efectos del pH sobre la germinación *in vitro* se analizaron mediante un diseño de bloques completos al azar, con 5 tratamientos (pH). Cada tratamiento tuvo 3 repeticiones, con 5 lecturas por repetición.

**Efecto de diferentes medios de germinación sobre la viabilidad y germinación de polen fresco de teca, extraído de la antera.** Para medir el efecto del tipo de medio de germinación en el porcentaje de viabilidad y germinación del polen de teca, las anteras se deshidrataron durante 2 h en sílica gel. Posteriormente, se aisló el polen de la antera en un procedimiento similar al anterior y finalmente se germinó en los medios descritos en el Cuadro 1. El efecto del tipo de medio de germinación se analizó mediante un diseño de bloques completos al azar, con 3 tratamientos (medio). Cada tratamiento tuvo 3 repeticiones, con 5 lecturas por repetición.

Cuadro 1. Medios de cultivo empleados en la germinación *in vitro* de granos de polen de teca (*Tectona grandis*), deshidratados previamente en sílica gel durante 2h.

Medios	Formulación
Medio 1	10% de sacarosa (g/100 mL) en solución acuosa pH=7
Medio 2	14% de sacarosa (g/100 mL) en solución acuosa pH=7
Medio 3	BK (1963) al 10% de sus sales + 10% de sacarosa (g/100 mL) en solución acuosa pH=7

**Análisis estadístico.** Para realizar el análisis estadístico los valores en porcentajes de viabilidad y germinación *in vitro* fueron previamente transformados. Se utilizó la transformación del  $\arcsen\sqrt{\% \text{ germinación/viabilidad}}$ . Los datos transformados y no transformados fueron procesados a partir de un análisis de varianza. Se empleó un diseño de bloques completos al azar. En todos los ensayos cada tratamiento conto con 3 repeticiones, con 5 lecturas por repetición. Las diferencias entre los tratamientos se determinaron con la prueba de comparación múltiple de Tukey con una confianza del 95%, y mediante el programa InfoStat y Statistica (Di Rienzo et al. 2009, Statsoft, Inc. 2013).

## Resultados

**Efecto de la deshidratación sobre la viabilidad y germinación del polen.** Al evaluar el efecto de la deshidratación durante 0, 2, 4 y 6 horas, sobre la viabilidad del polen de teca; se determinó diferencia estadística significativa entre los tratamientos (periodos de deshidratación) analizados tanto dentro ( $p \leq 0,001$ ) como fuera de la antera ( $p \leq 0,006$ ) (Figura. 5) (Cuadro 2). Los mayores porcentajes de viabilidad (90% y 88%, respectivamente) se obtuvieron a las 2 de deshidratación para ambos tratamientos. Es importante resaltar que para todos los periodos de deshidratación los porcentajes de viabilidad se mantuvieron arriba del 70%. Por otro lado, al evaluar el efecto de la deshidratación sobre la germinación *in vitro* de polen

de teca; dentro y fuera de la antera (Figura 5) (Cuadro 2); y germinado en un medio BK (1963) al 10% de sales + 10% de sacarosa, se determinó diferencia estadística significativa entre los periodos de deshidratación (0, 2, 4, 6 h), tanto para polen dentro de la antera como para polen extraído de la antera ( $p \leq 0,001$ ). En el caso de la germinación de los granos de polen deshidratados y germinado dentro de la antera, se observó una reducción progresiva del mismo desde un 43% al momento de anthesis (0h) y hasta un 10% a las 6 h. Un patrón similar se observó al evaluar el efecto de la deshidratación sobre el porcentaje de germinación de los granos de polen extraídos de la antera, en el cual se observó la reducción del porcentaje de germinación de un 53% a las 0h hasta 22% a las 6h de deshidratación, no obstante, no se logró diferenciar el efecto de la deshidratación sobre el porcentaje de germinación entre las 2 y 4 h, el cual en promedio fue de 28%. Además, fue posible observar que conforme aumenta la deshidratación de las anteras, estas se vuelven más dehiscentes y se obtiene más polen disperso.

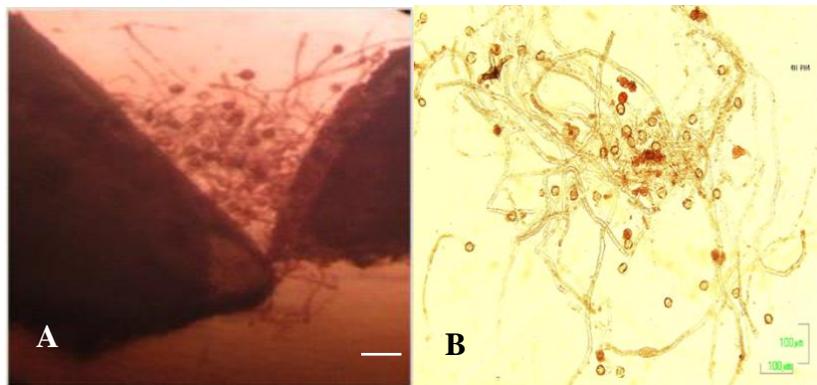


Figura 5. Polen de teca (*Tectona grandis*) viable y germinado: dentro de la antera (A) y fuera de la antera (B). Barra= 100  $\mu$ m, empleando la tinción con acetocarmín.

Cuadro 2. Efecto de la deshidratación en sílica gel sobre el porcentaje de viabilidad y germinación de granos de polen de teca (*Tectona grandis*), analizados dentro y fuera de la antera; y germinados en el medio BK (1963) al 10% de sus sales + 10% de sacarosa (g/100 mL) en solución acuosa a pH=7.

Deshidratación (h)	Viabilidad (%)		Germinación (%)	
	Dentro	Fuera	Dentro	Fuera
0	75,47±10,29c	86,45±1,38a	43,22±2,18a	52,72±2,01 <sup>a</sup>
2	90,00±0,00a	87,96±0,85a	20,77±3,71b	23,28±1,74bc
4	89,00±3,47a	84,83±2,07b	4,68±1,3c	32,73±4,33ab
6	83,20±13,87b	70,46±7,24c	10,07±1,95c	21,69±2,57c

Columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $P \leq 0,05$ ).

**Efecto del pH sobre la viabilidad y germinación del polen deshidratado.** Al evaluar el efecto del pH sobre la viabilidad y germinación de granos de polen deshidratados y extraídos de la antera (Cuadro 3), se determinó que el tratamiento con 2 h de deshidratación y pH entre 6,3 y 7,0 produjo el mayor porcentaje de viabilidad (90%). Con respecto al porcentaje de germinación, se encontró que el tratamiento con 2 h de deshidratación y un pH 7,0 produjo el porcentaje más alto de germinación en comparación con otros períodos de deshidratación.

Cuadro 3. Efecto del pH sobre el porcentaje de viabilidad y germinación de granos de polen de teca (*Tectona grandis*), deshidratados durante 0h, 2h, 4h, extraídos y analizados fuera de la antera; y germinados en el medio BK (1963) al 10% de sus sales + 10% de sacarosa (g/100 mL) en solución acuosa a pH=7.

Tiempo				
(h)	pH	Variabilidad (%)	Germinación (%)	
0	6	74,72 ± 1,91 abcd	19,61 ± 2,59abc	
	6,3	72,25 ± 6,01 bcd	16,35 ± 2,36bc	
	6,5	77,95 ± 4,92 abcd	29,44 ± 3,87abc	
	6,8	68,33 ± 1,62 cd	19,48 ± 5,05abc	
	7	65,54 ± 6,30 d	29,96 ± 2,66abc	
2	6	73,60 ± 1,73 bcd	32,23 ± 2,97 abc	
	6.3	83,58 ± 2,76 abc	36,28 ± 10,55 abc	
	6.5	86,11 ± 3,89ab	41,15 ± 7,69 ab	
	6.8	90,00 ± 0,00 a	29,00 ± 8,50 abc	
	7	83,88±3,78 abc	45,78 ± 9,99 a	
4	6	74,44±2,12 abcd	13,62±1,56c	
	6,3	77,67±0,83 abcd	42,36±5,29ab	
	6,5	81,42±0,5 abcd	12,81±1,9c	
	6,8	79,74±2,58 abcd	15,57±2,77bc	
	7	78,14±0,77 abcd	12,81±1,12c	

Columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, P≤0,05).

**Efecto de diferentes medios de germinación sobre la viabilidad y germinación de polen deshidratado.** Al evaluar el efecto de medio de cultivo, sobre la viabilidad del polen de teca extraído de la antera; y teñido con acetocarmín al 1%, no se determinó diferencia estadística significativa entre los tratamientos (Cuadro 4), obteniéndose un 90% en el porcentaje de viabilidad en los tres medios de cultivo empleado. En el caso del porcentaje de germinación se determinó diferencia estadística significativa entre los tratamientos ( $p \leq 0,001$ ) (Cuadro 4), obteniéndose el mayor porcentaje de germinación (28,99%) en el medio 3, BK (1963) al 10% de sus sales + 10 % sacarosa, pH 7,0.

Cuadro 4. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el porcentaje de viabilidad y germinación de polen de teca (*Tectona grandis*), deshidratados previamente en sílica gel durante 2 h; y germinados en el medio BK (1963) al 10% de sus sales + 10% de sacarosa (g/100 mL) en solución acuosa a pH=7.

Medios	Viabilidad (%)	Germinación (%)
Medio 1	90	5,14±1,33b
Medio 2	90	5,35±1,26b
Medio 3	90	28,99±1,53 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Tukey,  $P \leq 0,05$ )

## Discusión

Durante el establecimiento de una metodología para evaluar la calidad del polen, es necesario establecer distintas etapas que permitan estimar la calidad en términos de viabilidad y germinación, a través de la optimización de la germinación *in vitro* de polen (Rejón *et al.* 2010). Al evaluar el efecto de la deshidratación sobre la viabilidad de granos de polen de teca, ubicados dentro y fuera de la antera, se evidenció que la ubicación del polen no afecta el porcentaje de viabilidad, ya que para ambas muestras se obtuvo un 90% de viabilidad luego de 2 y 4 horas de deshidratación. Estos resultados obtenidos en el estudio concuerdan con los obtenidos por

Tangmitcharoen y Owens (1997b) en sus estudios con polen de teca, quienes obtuvieron 92,2% de viabilidad del polen colectado 4 horas después de la antesis. En el presente estudio se midió la viabilidad de los granos de polen en términos de fertilidad. La fertilidad es la medición de la habilidad de los granos de polen para germinar y producir semilla (Towill y Walters 2000). La tinción de granos de polen con acetocarmín se usa comúnmente para cuantificar la fertilidad del polen. El acetocarmín permite identificar el polen fértil y turgente lleno de contenido citoplasmático (Shivanna y Tandon 2014). Lo anterior, se debe a que el acetocarmín tiñe los núcleos de un rojo intenso y brillante ya que las cromatinas muestran afinidad por el reactivo (Gupta y Holmstrm 2005). Según González *et al.*, (2002), este método se puede utilizar para la discriminación cuando se tienen muchos genotipos, pues tiene la ventaja de permitir hacer predicciones rápidas de la fertilidad masculina.

Por otro lado, Tangmitcharoen y Owens (1997b), solo reportaron haber observado germinación de los granos de polen una hora después de colocados en el medio BK (1963) al 10% de sus sales + 10% de sacarosa. En el presente estudio, se observó que este mismo medio, favoreció la germinación del polen extraído de la antera luego de ser deshidratado durante 2 y 4 horas, obteniéndose en promedio 29% de germinación. Este bajo porcentaje de germinación puede deberse a que al inducir la dehiscencia de las anteras artificialmente por la deshidratación en sílica gel, se liberó y empleó tanto polen inmaduro como maduro en los ensayos. Los resultados de germinación indican que solo el 28 % de los granos de polen empleados habían alcanzado el estado binuclear y por ende su estado de madures. Taiz *et al.* (2015) mencionan que, durante la maduración del polen, este además de alcanzar un estado bicelular debe acumular reservas de carbohidratos y lípidos que garanticen la actividad metabólica requerida para la rápida germinación del tubo polínico. Además, mencionan que en este estado el polen es usualmente liberado y que es hasta que el polen es adherido al estigma, que se inicia la formación del tubo polínico y este entra el estado tricelular.

La prueba de germinación *in vitro* se basa en la capacidad de los granos de polen de germinar en un medio nutritivo óptimo. Esta es una prueba rutinaria rápida y simple, que ha sido utilizada para medir la viabilidad y germinación del polen (Shivanna y Tandon 2014). Según Johnson y Kost (2010), es posible inducir el crecimiento de los tubos polínicos de la mayoría de las especies, cultivando los granos de polen en medios simples que contienen solo carbohidratos, borato y calcio. Además, estos mismos autores mencionan que en condiciones *in vitro*, los tubos de polen generalmente se alargan a tasas más bajas comparadas con la germinación de los mismos granos de polen en condiciones *in situ*. Por otro lado, los resultados obtenidos en el ensayo de medios de germinación sugieren que el adicionar únicamente sacarosa al medio no fue suficiente para inducir la germinación del polen de teca. Dichos resultados, sugieren que macroelementos como el calcio, potasio y magnesio; así como el microelemento boro; son esenciales para inducir la germinación del tubo polínico. El medio BK (1963) empleado en la investigación incluye los siguientes nutrientes en solución:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$ ; los cuales han sido ampliamente empleados en la formulación de medios de cultivo para la germinación de polen en muchas especies. Lo anterior se debe a que en el proceso de la elongación del tubo polínico se da la conformación de paredes celulares, proceso en el cual el  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel fundamental, ya que este es un constituyente de la lámina media de las paredes celulares. Además, el  $\text{Ca}^{2+}$  es requerido como cofactor por algunas enzimas involucradas en la hidrólisis de ATP y fosfolípidos; y actúa como un segundo mensajero en la regulación metabólica. Por otra parte, se ha observado el requerimiento de los iones  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$  para la elongación del tubo polínico, ya que juegan un papel de reguladores de la asociación del  $\text{Ca}^{2+}$  a la pared celular (Brewbaker y Kwack 1963, Taiz *et al.* 2015).

Además, Shi y Yang (2010) y Taiz *et al.* (2015) mencionan que, durante la rehidratación, la fisiología del polen se activa, observándose un incremento en los niveles de calcio en el citosol. Este calcio desencadena la reorganización del

citoesqueleto del polen y es el responsable de la polarización fisiológica y estructural del grano de polen. Estos autores mencionan que este crecimiento polarizado puede deberse a un gradiente de iones, refiriéndose específicamente al ion  $\text{Ca}^{2+}$  y a un gradiente de pH que oscila entre 6,8 y 7,5 en la zona apical y subapical del tubo polínico. Los cambios eléctricos y químicos debido a la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  y pH, juegan un rol importante en la señalización celular, dinámica citoesquelética, tráfico en la membrana y en la exocitosis. Lo anterior confirma los datos obtenidos en el ensayo para medir el efecto del pH sobre la germinación de polen de teca. En el cual, se observó que los mejores porcentajes de germinación se encontraron en un rango de 6,5 a 7 en polen extraído de la antera luego de 2 y 4 horas deshidratación.

Finalmente, Rejón *et al.* (2010), mencionan que se debe considerar que los factores óptimos de la germinación en un medio *in vitro* nunca van a ser iguales a los de la germinación en el pistilo y por tanto el porcentaje que se obtenga siempre será diferente al que en realidad se tiene en la flor *in situ*.

## **Conclusiones**

Con base a la aplicación del estudio se concluye que evaluar la calidad del polen de teca es posible bajo los parámetros definidos durante el estudio, los cuales a su vez permitirán el manejo y purificación del polen. Dicho manejo y purificación del polen de teca, abre la posibilidad de realizar los ensayos de cruces controlados a una escala operativa dentro de los planes de mejoramiento genético de teca en Costa Rica. Lo que no era posible, ya que los estudios existentes no se enfocaban en el manejo de polen, ni en determinar un porcentaje de viabilidad y germinación inicial necesarios para determinar una carga eficiente de polen a la hora de realizar los cruzamientos controlados. Los resultados en este estudio demostraron que deshidratar polen de teca dentro o fuera de la antera con sílica gel entre 2 y 4h; y germinarlo en un medio BK (1963) al 10% de sus sales + 10% de sacarosa a pH 7, permite alcanzar 90% de granos viables con una capacidad de germinación del 28%. Estos resultados confirman que el polen deshidratado y extraído de la antera,

no solamente puede ser germinado *in vitro*, si no que permite a los programas de mejora genética partir de un porcentaje de germinación inicial, clave en el diseño de los futuros ensayos de cruces controlados.

## Literatura citada

Abdelnour, A; Rojas, G; Alfaro, U. 2007. Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. *Tecnología en marcha*. 20(1):98-103.

Brewbacker, JL; Kwack, BH. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany* 50 (9): 859-865

Di Rienzo, JA; Casanoves, F; Balzarini, MG; Gonzalez, L; Tablada, M; Robledo CW. 2009. InfoStat versión 2009. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Fonseca, W. 2004. Manual para productores de teca (*Tectona grandis* L.f) en Costa Rica. Costa Rica, SIREFOR (Sistema de Información de Recursos Forestales). Consultado 20 de oct. 2017. Disponible en [http://www.sirefor.go.cr/Documentos/Reforestacion/2004\\_Fonseca\\_ManualProductoresTeca.pdf](http://www.sirefor.go.cr/Documentos/Reforestacion/2004_Fonseca_ManualProductoresTeca.pdf)

Gupta, P.K. and D. Holmstrom. 2005. Double staining technology for distinguishing embryogenic cultures. In *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Eds. J.S. Mohan and P.K. Gupta. Springer, Netherlands, pp 573–575.

González, ME; Estévez, A; Castillo, J; Salomón, J; Moré, O; Hernández, M. 2002. La Calidad de la papa: Requerimiento Indispensable del Mejoramiento Genético Tradicional de la papa en Cuba. *Revista Latinoamericana de la Papa* 13: 75-94

Guzmán, N; Moya, R.; Murillo, O. Evaluation of bent trees in juvenile teak (*Tectona grandis* L.f.) plantations in Costa Rica: effects on tree morphology and wood properties. *Forests* 2017, 8, 1–16.

Indira, EP; Mohanadas, K. 2002. Intrinsic and extrinsic factors affecting pollination and fruit productivity in teak (*Tectona grandis* Linn.f.). *Indian Journal Genetics and plant breeding* 62 (3): 208-2014.

Johnson, MA; Kost, B. 2010. Pollen Tube Development. Hennig L, Köhler C (eds.). Plant Developmental Biology, Methods in Molecular Biology. Springer, New York, USA. p. 155

Keogh, R. Teak (*Tectona grandis*) provenances of the Caribbean, Central America, Venezuela and Colombia. 1980. In Proceedings of the Rio Piedras IUFRO Meeting, Working Group S1.07.09 Rio Piedras, Puerto Rico, USA, 8–12 September. pp. 343–358.

Keogh R. 2013. Capítulo 2: La teca y su importancia económica a nivel mundial. En: De Camino (ed). Las plantaciones de teca en América Latina: Mitos y realidades. Boletín Técnico 397. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 8-28 p

Moya, R; Marín, JD; Murillo, O; Leandro, L. 2013. Wood physical properties, color, decay resistance and stiffness in *Tectona grandis* clones with evidence of genetic control. *Silvae Genet*: 62, 142–152.

Murillo, O; Wright, J; Monteuis, O; Montenegro, F. 2013. Capítulo 6: Mejoramiento genético de la teca en América Latina. En: De Camino, R (ed). Las plantaciones de teca en América Latina: Mitos y realidades. Boletín Técnico 397. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 86-111 p

Murillo, O; Badilla, Y; Rojas, F. 2016. Desarrollo del mejoramiento genético forestal en Costa Rica y liderazgo regional con especies tropicales. En: XIV Congreso Nacional Agropecuario, Forestal y Ambiental. (CONAFA), Belén, Costa Rica, 25–27 de Octubre, 2016.

Palupi, E; Owens, J; Sadjad, S; Sudarsono, S; Solihin, D. 2010. The importance of fruit set, fruit abortion, and pollination of teak (*Tectona grandis*). *Canadian Journal Forestry Research*. (40): 2204-2214.

Palupi, E; Owens J. 1997. Pollination, fertilization and embryogenesis of teak (*Tectona grandis* Linn f). *International Journal of Plant Science* 158 (3): 259-273.

- Rejón, JD; Suárez, CG; Alché, JD; Castro, AJ; Rodríguez, MI. 2010. Evaluación de diferentes métodos para estimar la calidad del polen en distintos cultivares de olivo (*Olea Europaea L*). *Polen* 20: 61-72
- Resende, M; Murillo, O; Badilla, Y. 2018. Genética Cuantitativa y Selección en el Mejoramiento Forestal; Cartago, Costa Rica. p. 302
- Shi DQ, WC Yang. 2010. Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives: Pollen Germination and Tube Growth. Eds. Eng-Chong Pua; Michael R. Davey. Heidelberg, Germany. Springer. p 249.
- Shivanna, KR; Tandon, R. 2014. *Reproductive Ecology of Flowering Plants: A Manual*. New Delhi, India. Springer. p. 46
- Taiz, L; Zeiger, E; Møller, I; Murphy, A. 2015. Plant Physiology. 6<sup>th</sup> ed. Sunderland, Massachusetts, USA. Sinauer Associates. Inc. 705p
- Tangmitcharoen, S; Owens, JO. 1997a. Floral Biology, Pollinization, pistil Receptivity, and Pollen-tube growth of teak (*Tectona grandis Linn f*). *Annals of Botanical* 79: 401-410.
- Tangmitcharoen, S; Owens, JO. 1997b. Pollen viability and pollen-tube growth following controlled pollination and their relation to low fruit production in teak (*Tectona grandis Linn f*). *Annals of Botanical* 80: 401-420
- Towill, LE; Walters, C. 2000. Cryopreservation of pollen. Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: current research progress and application. Eds. F Engelmann; H Takigi. Tsukuba, JP, JIRCAS / Rome, IT, IPGRI. p. 115
- Volk, GM. 2011. Collecting plant genetic diversity: Technical guidelines: Chapter 25 Collecting pollen for genetic resources conservation. National Center for Genetic Resource Preservation, USDA-ARS. 10 p
- Shi, DQ; Yang, WC. 2010. Plant Developmental Biology—Biotechnological Perspectives: Chapter 13: Pollen Germination and Tube Growth; Chong Pua, Eng.; Michael, R.D., Eds.; Springer: Heidelberg, Germany, 2010; p. 249

## **CAPÍTULO II**

# **CRIOCONSERVACIÓN DE POLEN DE TECA (*TECTONA GRANDIS*) PARA UN PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO**

## **Resumen**

Con el desarrollo de esta investigación se buscó adaptar una metodología de conservación a largo plazo de polen de *Tectona grandis* (teca). Se planteó estandarizar y adaptar las metodologías de recolección; deshidratación del polen empleando sílica gel; pruebas para determinar los porcentajes de viabilidad y germinación del polen pre y post congelamiento; y por último la técnica de deshidratación y congelamiento rápido en nitrógeno líquido. Además, se evaluó la viabilidad y germinación de cuatro clones de la empresa Novalteak durante 18 meses de almacenamiento en nitrógeno líquido. Lo anterior con el fin de ofrecer a los programas de mejoramiento genético de teca; una opción de almacenamiento del polen, que garantice su disponibilidad en cualquier momento y para cualquier uso; principalmente para la realización de cruces controlados. Los resultados indican que el polen deshidratado hasta el 39,5% de contenido de humedad y almacenado por 2 años en nitrógeno líquido (NL+), se comporta como el polen solamente deshidratado (39,5% CH) (NL-), obteniéndose porcentajes de viabilidad y germinación de 80% y 40% respectivamente, en ambos tipos de muestra.

**Palabras claves:** Teca, polen, crioconservación, mejoramiento genético.

## **Abstract**

With the development of this research, we sought to adapt a pollen conservation methodology of *Tectona grandis* (teak). The present study was aimed at standardizing the technique of cryopreservation for teak pollen, as an option to maintain its long-term viability. It was proposed to standardize and adapt collection methodologies; pollen dehydration using silica gel; tests to determine the percentages of viability and germination of pollen before and after freezing; and finally, the technique of dehydration and rapid freezing in liquid nitrogen. Also, the viability and germination of four clones were evaluated during 18 months of storage in liquid nitrogen. The results indicated that pollen dehydrates up to 39.5% moisture content when stored for 2 year in liquid nitrogen (+LN), behaves like pollen only dehydrated (39.5% MC) (-LN), obtaining percentages of viability and germination of 80% and 40% respectively, in both types of sample.

**Keywords:** forest plantations; tree improvement; teak; pollen; liquid nitrogen.

## Introducción

La teca (*Tectona grandis* Linn F.) originaria de la India y Birmania, Tailandia e Indochina, en el continente asiático, ha sido plantada fuera de su distribución natural en otros países de Asia, África y América Latina. En América tropical se encuentran plantaciones en algunos países, como las islas del Caribe, Centroamérica, México y en varios países suramericanos (Murillo *et al.* 2013). Es una especie arbórea de gran interés económico, que representa el 4% de toda la madera que se comercializa en todo el mundo y conocida principalmente por su calidad en el mobiliario y la industria naval (Alcântara *et al.* 2016).

A pesar de la importancia económica de la teca y de la existencia de programas de mejoramiento genético desde antes de los años 70, se reportan avances modestos hacia las generaciones avanzadas de mejoramiento (CAB Internacional, 2000). Existe en la actualidad un gran interés por lograr avanzar hacia la segunda generación de mejoramiento genético con teca, que implica el desarrollo de técnicas de polinización controlada y de manejo de polen en general (Murillo *et al.* 2016). Sin embargo, esto no será posible sin el desarrollo de capacidades para el procesamiento y conservación a corto y largo plazo del polen de los materiales seleccionados. Por lo tanto, se considera de vital importancia el desarrollo de la capacidad de procesamiento y conservación de polen, a través de un concepto de banco de polen.

El polen tiene un papel vital en el cruce controlado de material seleccionado, ya que se traduce en la producción de semillas mejorada. El gametofito macho maduro de la mayoría de las especies de plantas es tolerante a la desecación, lo que los hace ideales para el almacenamiento, especialmente bajo condiciones criogénicas. Un aporte importante de los protocolos de crioconservación de polen es el aumento de la vida útil del polen y la posibilidad de mantener accesiones genéticamente diversas de polen para su futuro uso, una estrategia que también puede lograr la

conservación de la Diversidad Genética Nuclear (DGN) para conservar la variación genética expresada a través del polen (Rajasekharan *et al.* 2013).

El objetivo de desarrollar un protocolo de crioconservación de polen útil es recolectar polen maduro de la especie deseada y conservarlo a  $-196^{\circ}\text{C}$ , utilizando métodos que permitan la retención de su función normal; y finalmente evaluar su capacidad para germinar *in vivo* y una efectiva fertilización (Ganeshan *et al.* 2008). En el caso de especies arbóreas, la crioconservación permite que el polen esté disponible a solicitud de los investigadores y mejoradores durante todo el año; reduce la coordinación necesaria para sincronizar la floración con la disponibilidad de polen para su uso en cruces; además, con suficiente polen disponible se puede cargar polen en los estigmas para aumentar la polinización y productividad; finalmente, el germoplasma puede ser recibido fácilmente e intercambiarse a través del polen, lo que también favorece el traslado internacional, reduciendo la amenaza de la transferencia de la enfermedad (Xu *et al.* 2014, Rajasekharan 2015, Popova *et al.* 2015). El presente estudio fue dirigido a estandarizar la técnica de crioconservación para el polen de teca, como una opción de mantenimiento de su viabilidad a largo plazo.

### **Materiales y métodos**

***Colecta y procesamiento del polen.*** Como material experimental se utilizó polen proveniente de panículas de la empresa Novelteak situados en La Cruz, Guanacaste. Se seleccionaron árboles establecidos en ensayos clonales, con presencia de inflorescencias al momento de la colecta (5:00 am y las 7:00 am), según lo sugiere Tangmitcharoen y Owens 1997b, Ganeshan *et al.* 2008, Volk 2011. De estas inflorescencias se colectaron flores sin abrir, las cuales fueron colocadas en bolsas plásticas con cierre hermético durante una hora para inducir la apertura de estas. Una vez abiertas las flores se procedió a la extracción mecánica de las anteras con ayuda de unas pinzas.

**Efecto de la deshidratación y el nitrógeno líquido sobre la viabilidad y germinación del polen.** Inicialmente, las anteras fueron deshidratadas en recipientes con sílica gel durante 0, 2, 4, 6 h. Seguidamente, se determinó el porcentaje de contenido de humedad luego de cada periodo de deshidratación. Para lo cual, se determinó el peso fresco (Pf), y finalmente se determinó el peso seco (Ps), calculándose el porcentaje de contenido de humedad (% CH) empleando la fórmula:  $\left[\left(\frac{Pf-Ps}{Pf}\right) \times 100\right]$  (Abdelnour 2007, Volk 2011, Hine *et al* 2019).

Una vez deshidratadas las anteras y calculado en contenido de humedad, las anteras se separaron en dos grupos: uno para evaluar el efecto de la deshidratación sobre la viabilidad y germinación del polen y como testigo del congelamiento (NL-); y el otro, para evaluar el efecto del nitrógeno líquido para sobre la viabilidad y germinación del polen deshidratado (NL+).

Para determinar efecto del nitrógeno líquido sobre la viabilidad y germinación del polen deshidratado (NL+), las anteras deshidratadas fueron colocado en criotubos de polipropileno de 2 ml. El congelamiento se efectuó por inmersión directa de los criotubos en el nitrógeno líquido durante 1h. Después del periodo de congelamiento, las anteras fueron descongelados a temperatura ambiente por 5 minutos.

Una vez descongeladas las muestras, el polen de estas (NL+) y el polen de las muestras testigo (NL-) se separó de la antera agitando los crioviales con un vortex a baja intensidad durante 3 minutos. Seguidamente, el polen de ambas muestras fue rehidratado en un cámara de humedad durante una hora para su posterior germinación *in vitro* y determinación de la viabilidad según Hine *et al.* 2019. Para lo cual, se empleó el medio de germinación Brewbacker y Kwack (BK) (1963) al 10% de sales + 10% de sacarosa en solución acuosa pH=7 (1963) y la tinción morfológica con acetocarmín al 1%.

Una vez germinado el polen, el porcentaje de germinación y viabilidad de las muestras se determinó tomando en cuenta el número de granos viables (teñidos) y germinados en relación con los granos totales encontrados en cada campo óptico. Los conteos de polen se realizaron utilizando un microscopio Nikon ALPHAPHOT-2 YS2 con el lente 10x en un número de 100 a 200 granos de polen por campo óptico, de cada replica se realizaron cinco conteos (Maryam *et al.* 2011, Hine *et al.* 2019). El contenido de humedad (CH%), la viabilidad y la germinación del polen se analizaron mediante un diseño de bloques completos al azar, con 4 tratamientos (horas de deshidratación), cada tratamiento tuvo 3 repeticiones, con 5 lecturas por repetición.

**Crioconservación** Para determinar la sobrevivencia del polen almacenado en nitrógeno líquido durante 18 meses, se empleó polen con un contenido de humedad del 39,5%, según el primer experimento y datos reportados por Hine *et al.* (2019). El congelamiento se efectuó por inmersión directa de los criotubos en nitrógeno líquido (NL+), el tiempo 0 meses solamente fue deshidratado y no fue expuesto al nitrógeno líquido, de esta manera el ensayo fue evaluado a los 0, 9 y 18 meses de almacenado en nitrógeno líquido (NL+). En cada evaluación los materiales fueron descongelados a temperatura ambiente por 5 minutos.

Una vez descongelado el polen fue rehidratado en un cámara de humedad durante una hora para su posterior germinación *in vitro* y determinación de viabilidad según Hine *et al.* (2019) y como se describe anteriormente. Este ensayo se analizó por un diseño de bloques completos al azar, con un arreglo factorial de 4 clones deshidratados y crioconservados (tratamientos) y 3 tiempos de evaluación por variable (viabilidad o germinación). Cada tratamiento tuvo 3 repeticiones, con 5 lecturas por repetición.

## **Análisis histológico**

***Evaluación del crecimiento in vivo del tubo polínico.*** Por otra parte, para el ensayo de crecimiento *in vivo* del tubo polínico, se empleó polen deshidratado (39,5% CH). Las flores colectadas fueron emasculadas y los pistilos colocadas en un sustrato de espuma floral, en grupos según tratamiento. Una vez polinizados manualmente los pistilos con ayuda de un pincel, estos fueron incubados a 25 °C y el crecimiento del tubo polínico fue evaluación durante 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 48 horas. Finalizado el tiempo de incubación establecido para cada tratamiento, se procedió a extraer los pistilos y fijarlos en una solución de formaldehído (FAA). Para su observación al microscopio, los pistilos fijados se colocaron en una solución de NaOH 1M durante 40 min. Pasado este tiempo, se realizó tres lavados con agua destilada. Seguidamente, fueron colocados sobre un portaobjetos con una gota de azul de anilina y fueron aplastados con ayuda del cubre objetos. Finalmente, se colocaron en oscuridad y luego de 10 minutos se visualizó la fluorescencia de los tejidos al microscopio (Lora *et al.* 2011). El conteo de los tubos polínicos se realizó en 3 diferentes posiciones a lo largo del pistilo, con el fin de evaluar el crecimiento de estos. Los datos obtenidos se analizaron por un diseño completo al azar. Cada tratamiento (tiempo de germinación) contó con 3 repeticiones, realizándose 5 lecturas por repetición.

***Evaluación de la receptividad del estigma, empleando polen fresco y polen crioconservado.*** Para el ensayo de receptividad, se empleó polen fresco (39,5% CH) (NL-) y polen crioconservado (39,5% CH) (NL+) por 2 años. Las flores colectadas fueron emasculadas y los pistilos colocadas en un sustrato de espuma floral, en grupos según tratamiento. Una vez polinizados los pistilos, estos fueron incubados a 25 °C por 12 horas. Finalizado el tiempo de incubación establecido para cada tratamiento, se procedió a extraer los pistilos y fijarlos en una solución de formaldehído (FAA). Para su observación al microscopio, los pistilos fijados se colocaron en una solución de NaOH 1M durante 40 min. Pasado este tiempo, se realizó tres lavados con agua destilada. Seguidamente, fueron colocados sobre un

portaobjetos con una gota de azul de anilina y fueron aplastados con ayuda del cubre objetos. Finalmente, se colocaron en oscuridad y luego de 10 minutos se visualizó la fluorescencia de los tejidos al microscopio (Lora *et al.* 2011). La receptibilidad de los granos de polen fue medida en el estigma y el crecimiento de los tubos polínicos en cuatro diferentes posiciones a lo largo del pistilo. Los datos obtenidos se analizaron por un diseño completo al azar, cada tratamiento (polen (NL-) y polen (NL+)) contó con 3 repeticiones, realizándose 5 lecturas por repetición (Palupi *et al.* 2010, Lora *et al.* 2011).

### ***Evaluación de la estructura del polen fresco y polen crioconservado.***

Finalmente, para la evaluación de la estructura del polen deshidratado (39,5% CH) y polen deshidratado (39,5% CH) y crioconservado por 2 años; ambos tratamientos se fijaron de la siguiente manera: se colocaron en una solución de formaldehído (FAA) durante 24 h, seguido se realizó una deshidratación secuencial con diferentes concentraciones de Etanol (30%, 50% y al 70% durante una hora en cada concentración). Finalmente, los granos de polen, según tratamiento, se incrustaron en Technovit 7100 (Kulzer & Co, Wehrheim, Alemania) y se seccionaron a 2  $\mu\text{m}$  con ayuda de un ultramicrotomo marca Leica EM UC7. Los cortes histológicos de polen se tiñeron con PAS (Ácido Periódico de Schiff) /TBO (Azul de Toluidina) (Lora *et al.* 2011). La documentación de las imágenes se realizó empleando un microscopio de luz y fluorescencia, marca Leica modelo DM LB2.

**Análisis estadístico.** Para realizar el análisis estadístico los valores en porcentajes de viabilidad y germinación *in vitro* fueron previamente transformados. Se utilizó la transformación del  $\arcsen\sqrt{\% \text{ germinación/viabilidad}}$ . Los datos transformados y no transformados fueron procesados a partir de un análisis de varianza. Se empleó un diseño de bloques completos al azar. En todos los ensayos cada tratamiento conto con 3 repeticiones, con 5 lecturas por repetición. Las diferencias entre los tratamientos se determinaron con la prueba de comparación múltiple de Tukey con

una confianza del 95%, y mediante el programa InfoStat y Statistica (Di Rienzo *et al.* 2009, Statsoft, Inc. 2013).

## **Resultados**

***Efecto de la deshidratación y el nitrógeno líquido sobre la viabilidad y germinación del polen.*** Al evaluar la sobrevivencia del polen fresco deshidratado (0, 2, 4 y 6 h) no congelado (NL-), se observó que, al avanzar en el tiempo, el porcentaje de viabilidad se mantuvo constante (86%) y sin mostrar diferencia estadística significativa durante las primeras 2h ( $p \leq 0,006$ ). Con respecto al porcentaje de germinación, se encontró diferencia estadística significativa entre las horas de deshidratación ( $p \leq 0,001$ ), obteniéndose en promedio 28% de granos de polen germinados entre las 2 y 4 h (Cuadro 5). Con base a lo anterior, se determinó que el porcentaje de humedad (CH) mínimo al cual los granos de polen toleran la deshidratación se encuentra entre el 39,5% y 33%, los cuales se alcanzan entre las 2 y 4 horas de deshidratación, respectivamente (Cuadro 5). Además, se determinó visualmente con el análisis al microscopio, que conforme avanzaba el tiempo de deshidratación, el polen se desprende de la antera con mayor facilidad, observándose menos polen disperso en el medio de germinación a las 0 h de deshidratación y más polen disperso luego de 2 h de deshidratación.

Al evaluar la sobrevivencia del polen deshidratado durante 0, 2, 4 y 6 h y expuesto 1 hora en nitrógeno líquido (-196 °C) (NL+), se determinó diferencia estadística significativa ( $p = 0,0001$ ) entre los periodos de deshidratación para ambas variables. Obteniéndose un porcentaje de viabilidad y de germinación de 87 % y 1% respectivamente, las 0 horas de deshidratación (70% CH), y un porcentaje de viabilidad y germinación de 68% y 12% respectivamente a las 6 horas de deshidratación (28% CH). Estos resultados evidencian que la deshidratación previa al congelamiento mejora la germinación de los granos de polen congelados. Unido a los resultados anteriores, se observó una disminución de la germinación a partir de las 4 horas y conforme aumentó el periodo de deshidratación, obteniéndose un

40 % a las 2 horas (39,5 % CH), hasta llegar a un 12% de germinación las 6 horas de deshidratación (30,5% CH) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Contenido de humedad luego 0, 2, 4 y 6 h de deshidratación en sílica gel y porcentaje de viabilidad y germinación de los granos de polen fresco (NL-) y granos de polen congelados (NL+); germinados en el medio BK (1963) al 10% de sus sales + 10% de sacarosa (g/100 mL) en solución acuosa a pH=7.

Tiempo de deshidratación (h)	Contenido humedad (%)	Viabilidad (%)	Germinación (%)	
			NL-	NL+
0	70,00±1,41a	86,45±1,38a	52,72±2,01a	87,44±1,25a
2	39,5±0,65b	87,96±0,85a	23,28±1,74bc	79,99±1,80b
4	32,75±1,03c	84,83±2,07b	32,73±4,33ab	73,38±2,14c
6	28,25±0,48c	70,46±7,24c	21,69±2,57c	67,81±1,06c

Columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $P \leq 0,05$ ).

**Crioconservación.** Al evaluar en cuatro diferentes clones de teca, el porcentaje de viabilidad y germinación de granos de polen crioconservado (39,5% CH) hasta 18 meses (NL+), se observó diferencia estadística significativa ( $P < 0,05$ ) en el porcentaje de viabilidad. Sin embargo, en todas las muestras se obtuvo un promedio superior al 80%. En el caso del porcentaje de germinación, se obtuvo diferencia estadística significativa ( $P < 0,05$ ) entre los clones y el tiempo de almacenamiento, obteniéndose en promedio en los cuatro clones, un 9% de germinación del polen no congelado (0 meses) y observándose un incremento del porcentaje de germinación superior al 40% en las muestras congeladas durante 9 y 18 meses (Cuadro 6). Lo anterior evidencia que el congelamiento mejora el porcentaje de germinación.

## **Análisis histológico**

***Evaluación del crecimiento in vivo del tubo polínico.*** Al evaluar el crecimiento *in vivo* del tubo polínico de los granos de polen fresco (39,5% CH), en cuatro diferentes posiciones en el estilo, solamente se determinó diferencia estadística significativa ( $p < 0,0051$ ) en el número de tubos polínicos germinados en la posición 5 (Cuadro 7), correspondiente al ovario de la flor. Los eventos post-polinización, inician justamente luego de que los granos de polen son depositados en el estigma. Los tubos de polen crecen posteriormente en el pistilo, conforme avanza el tiempo de incubación a 25° C; y convergen en el tejido transmisor del estilo desde el momento de la polinización y hasta la posición 4 (Cuadro 7, Figura 6). En el presente estudio se determinó que, en interacciones compatibles, en promedio dos tubos polínicos llegan al ovario 12 h después de iniciada la polinización (Cuadro 7 -Posición 5, Figura 6).

***Evaluación de la receptividad del estigma, empleando polen fresco y polen crioconservado.*** Al evaluar la receptividad del estigma, empleando polen fresco (39,5% CH) (NL-) y polen crioconservado (39,5% CH) durante 2 años (NL+), luego de 12 horas de incubación a 25°C. No se encontró diferencias estadísticas significativas, ni en el número de granos adheridos al estigma (receptibilidad), ni en el número de tubos polínicos germinados en cada una de las posiciones evaluadas a lo largo el pistilo (Cuadro 8). Obteniéndose en promedio 17 granos adheridos al estigma (Cuadro 8-Posición1, Figura 1) y dos tubos polínicos alcanzando el ovario a las 12 horas (Cuadro 8- Posición 5, Figura 6).

Cuadro 6. Porcentaje de viabilidad y germinación de gramos de polen crioconservado (39,5% CH) durante 18 meses, y germinados en el medio BK (1963) al 10% de sus sales + 10% de sacarosa (g/100 mL) en solución acuosa a pH=7.

Meses	Viabilidad (%)				Germinación (%)			
	Clones				Clones			
	1	5	83	115	1	5	83	115
0	84,36±1,02b	88,09±0,72a	89,23±0,52a	88,47±0,68a	10,47±0,87d	9,08±0,78d	7,92±0,77d	9,76±0,7d
9	79,69±0,69c	83,66±0,77b	84,16±0,74b	84,30±0,72b	45,23±0,46bc	44,92±0,44bc	42,24±0,54c	43,28±0,36c
18	87,91±0,78a	87,91±0,63a	89,35±0,45a	86,99±1,04ab	51,18±1,05a	48,31±1,18ab	41,38±1,54c	42,41±1,88c

Columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $P \leq 0,05$ ).

Cuadro 7. Crecimiento *in vivo* del tubo polínico de granos de polen fresco (39,5% CH) e incubados a 25 °C.

Tiempo de germinación	Estilo P2 **	Estilo P3**	Entrada Ovario P4**	Ovario P5**
2h	4,67±1,70	3,67 ±0,33	1,33 ± 0,67	0,00±0,00 b
4h	3,79±1,68	2,67 ±1,45	0,67±0,67	0,00±0,00b
8h	7,04±2,98	5,33±0,67	4,67±0,67	1,67 ±0,88ab
12h	4,54±1,58	5,33±0,88	4,33±1,45	1,33±0,33ab
24h	4,79±1,59	3,67±0,33	3,33±0,33	2,00±0,00a
48h	4,42±1,42	6,33±1,45	5,33±1,86	2.33±0,33a

\*\*Número de tubo polínico germinados según posición en el estilo, P: posición en el pistilo.

Columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $P \leq 0,05$ ).

Cuadro 8. Receptividad del estigma, empleando polen fresco (39,5% CH) y polen crioconservado (39,5% CH) durante 2 años, luego de 12 horas de incubación a 25 °C.

Muestra	Tiempo de germinación	Estigma P1*	Estilo P2**	Estilo P3**	Entrada Ovario P4**	Ovario P 5**
LN-	12h	18,33±4,48	12,33±3,93	11,67±4,41	10,67±4,70	2,33±0,33
LN+	12h	15,67±2,91	12,00±3,51	11,67±3,67	11,67±3,67	2,00±1,20

\*Número de granos adheridos al estigma, \*\*Número de tubo polínico germinados según posición en el estilo, P: posición en el pistilo.

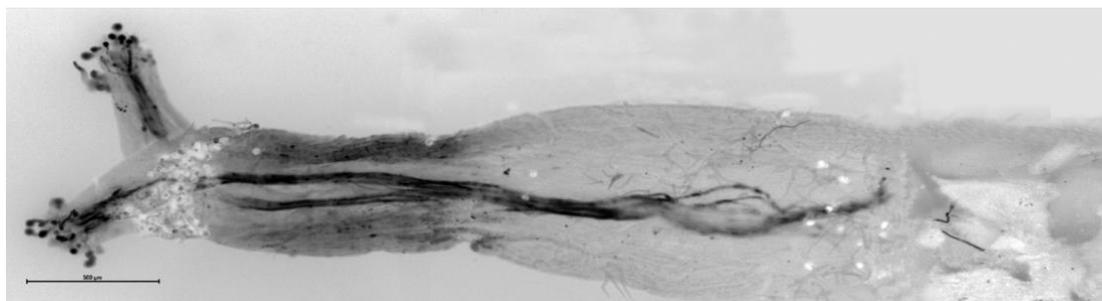
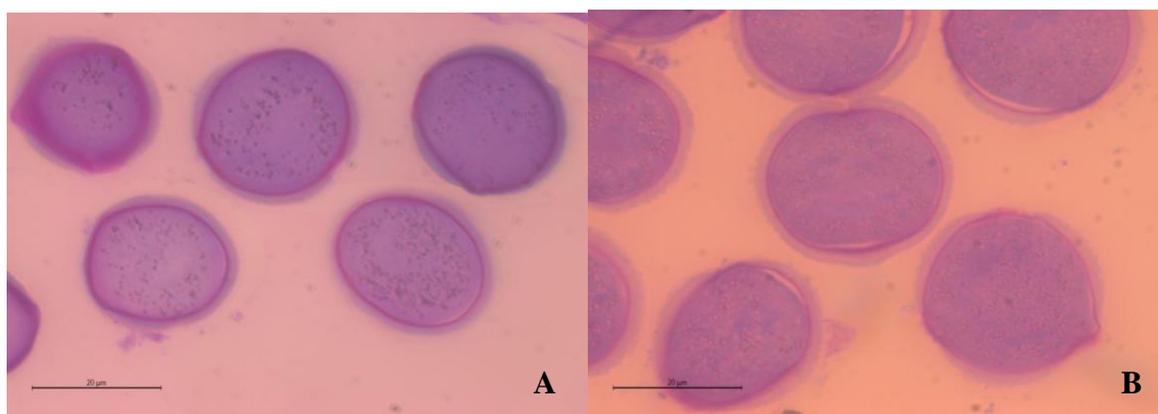


Figura 6. Receptividad de granos de polen en el estigma; y crecimiento in vivo del tubo polínico de granos de polen fresco a lo largo del pistilo de la flor de teca. Barra = 50 μm. P= Posición del pistilo

**Evaluación de la estructura de polen fresco y polen crioconservado.** Al evaluar la estructura de los granos de polen fresco (39,5% CH) (Figura 7A) y polen crioconservado (39,5% CH) (NL+) durante 2 años (Figura 3B), se logró observar abundante y similar contenido de almidón en ambas muestras, confirmando un estado binuclear de maduración. Por otro lado, únicamente en la muestra B, se observó la separación de la membrana con respecto a la pared celular. Lo anterior sugiere la ocurrencia de una plasmólisis de las células por efecto del congelamiento. Sin embargo, no se evidenció daño estructural del polen deshidratado, ni del polen deshidratado y congelado 2 años.



*Figura 7.* Polen fresco (39,5% CH) (A), polen crioconservado (39,5% CH) (B) de teca. Barra = 20  $\mu\text{m}$ , empleando la tinción PAS /TBO.

## Discusión

Al evaluar el efecto de la deshidratación sobre la viabilidad y germinación del polen (NL-), se determinó que el contenido de humedad al que los granos de polen de teca toleran la deshidratación con sílica gel, se encuentra entre el 33% y 39,5%. Dichos porcentajes de contenido de humedad pueden considerarse altos para una metodología de crioconservación. Sin embargo, con estos mismos porcentajes se obtuvo los mejores resultados al evaluar la viabilidad y germinación del polen deshidratado y congelado en nitrógeno líquido (NL+). Por su parte, Towill (2002), menciona que polen tolerante a la desecación pueden ser deshidratados a bajos contenidos de humedad entre el 5% y el 10% de deshidratación. Popova *et al.* (2015), Ganeshan *et al.* (2008) y Volk 2011, recomiendan determinar inmediatamente después de la cosecha un porcentaje de contenido de humedad menor o cercano al 30% al que el grano de polen sea tolerante y permita su manejo y almacenamiento. Además, Popova *et al.* (2015) menciona que en general, el contenido de humedad del polen por debajo del 35% es adecuado para la crioconservación, aunque estos parámetros pueden variar de una especie a otra.

Sin embargo, según lo reportado por Hine *et al.* (2019) y comprobado en el primer ensayo de esta investigación, un contenido de humedad cercano o menor al 30% afecta significativamente el porcentaje de germinación del polen teca. Estos resultados evidencian que el polen de teca se puede considerar altamente susceptible a desecación. El polen de teca ha sido reportado como un polen binucleado, lo que le conferiría más tolerancia a la desecación y al almacenamiento debido a que posee paredes más gruesas (Tangmitcharoen y Owens 1997a, Popova *et al.* 2015). Sin embargo, Towill and Walters (2000) mencionan que hay excepciones, como es el caso del polen bicelular de cucurbitáceas, liberado a un alto contenido de humedad y muy sensible a la desecación.

El bajo porcentaje de germinación obtenido con polen congelado puede estar relacionado al alto contenido de humedad (39,5%) presente en las muestras. Otro

factor que considerar con respecto al bajo porcentaje de germinación, puede ser que al inducir la dehiscencia de las anteras artificialmente por la deshidratación en sílica gel, se liberó y empleó tanto polen inmaduro como maduro en los ensayos. Ganeshan *et al.* (2008), afirma que la colecta de polen maduro y seco, con un contenido de humedad al cual el polen soporte el congelamiento, es uno de los pasos determinantes para el éxito de un protocolo de crioconservación. Vendrame (2018), afirma que las temperaturas más bajas proporcionan mayor longevidad para el polen, siempre que el contenido de agua intracelular se mantenga bajo. Lo anterior es muy importante para el establecimiento de una metodología de crioconservación, ya que la presencia de exceso de humedad en el polen puede formar cristales de hielo y causar daños irreversibles a las membranas, afectando la viabilidad de las células (Engelmann 2010, Rajasekharan *et al.* 2013).

Respecto al efecto el almacenamiento a largo plazo en nitrógeno líquido sobre la viabilidad y germinación del polen de cuatro diferentes genotipos de teca se logró determinar que los resultados se mantienen en el tiempo y entre los genotipos. Además, se observó que el congelamiento aumenta la germinación del polen en comparación con el polen no congelado. Silva *et al.* (2017), reportaron un efecto similar en polen de piña silvestre crioconservado con un 30% CH, atribuyendo el aumento en el porcentaje de germinación a la deshidratación y a la temperatura ultra baja, permitido romper la latencia de los granos y, en consecuencia, aumentar la tasa de germinación. Wang *et al.* (2012), mencionan que luego de la maduración, los granos de polen sufren deshidratación y posteriormente son liberado de la antera en un estado parcialmente deshidratado y latente, afirmando que, la deshidratación es considerada como uno de los factores determinantes para controlar la latencia de los granos de polen. Además, Wang *et al.* (2012) en su estudio con *Arabidopsis*, revelaron que, independientemente de la deshidratación, el control de los niveles de Ins (1,4,5) P3 / Ca<sup>2+</sup> (PI) por la enzima Inositol polifosfato 5-fosfatasa es crucial para mantener la latencia del polen. Dicha enzima es clave en la vía de señalización de fosfatidilinositol (PI), la cual funciona en el crecimiento, el desarrollo y las respuestas

al estrés en plantas, levaduras y mamíferos. En su investigación mostraron que un aumento de Inositol polifosfato 5-fosfatasa que controla a su vez los niveles de Ins (1,4,5) P<sub>3</sub> / Ca<sup>2+</sup> es suficiente para romper la latencia del polen y desencadenar una germinación temprana.

Por su parte, Popova *et al.* (2015) afirma que microesporas, polen y anteras, se pueden almacenar en sistemas criogénicos. En el caso de especies forestales, el efecto del nitrógeno líquido sobre la viabilidad y germinación del polen ha sido evaluado en pocas especies. Sousa (1990), midió el efecto del congelamiento sobre la viabilidad del polen en tres especies de *Eucalyptus* (*E. urophylla*, *E. Robusta* y *E. Dunnii*). No se observándose un efecto negativo de la congelación sobre el polen de las especies estudiadas. Obteniéndose un 10% de germinación para la especie *E. urophylla* y entre el 25 y el 35% de germinación para las otras dos. Determinando que un contenido de humedad igual o superior 5,61%, favorece la crioconservación de la especie. En un estudio similar en *Actinidia chinensis var. deliciosa*, no se reportó diferencias significativas en la germinación del polen crioconservado, manteniendo un porcentaje constante de 70% durante un año de almacenamiento (Borghezan *et al.* 2011).

Con el ensayo de crecimiento *in vivo* del tubo polínico y receptividad del estigma, se comprobó la aplicación del protocolo de crioconservación propuesto en esta investigación al no encontrarse diferencias estadísticas significativa entre la receptibilidad del estigma, empleando polen fresco y polen crioconservado. Tangmitcharoen y Owens (1997a), en su estudio empleando polen fresco, determinaron que la receptividad del estigma en campo aumenta gradualmente durante el día, alcanzando un número máximo de seis granos entre las 0900h y las 1300h, sin incremento significativo luego de las 1300h. Dentro de sus hallazgos, determinaron diferencia altamente significativa en el número de granos de polen adheridos al estigma entre árboles. Además Tangmitcharoen y Owens (1997a), estudiaron el crecimiento del tubo polínico hacia el saco embrionario en flores de

polinización abierta, registrando que después del comienzo del período receptivo (1100 h), hay poco crecimiento del tubo polínico entre 2 y 6 h después de la polinización, a las 8 horas los tubos polínicos aparecen en los sacos embrionarios, ya a las 12 horas aproximadamente el 62% de los tubos polínicos alcanzan un óvulo, observando que solo 1-2 tubos de polen por flor llegan a un saco embrionario.

Por otro lado, al realizarse comparaciones estructura entre el polen fresco y el polen crioconservado por dos años, se observó una separación de la membrana de la pared celular en el polen congelado, siendo este un síntoma de plasmólisis. Sin embargo, con este análisis histológico, no se evidenció daño estructural de la pared (exina-entina) o en la membrana del polen a la cual atribuir un efecto negativo en la germinación del polen.

### **Conclusiones**

Los resultados de esta investigación indican que la técnica de crioconservación puede ser considerada como una estrategia complementaria para el almacenamiento a largo plazo de polen de teca, para mantener duplicados de materiales valiosos, lo que asegura la existencia del recurso.

Los resultados indican que el polen deshidratado hasta el 39,5% de contenido de humedad y almacenado por 2 años en nitrógeno líquido (NL+), se comporta como el polen solamente deshidratado hasta el 39,5% de contenido de humedad (NL-), siendo apto para utilizarlo en polinizaciones controladas. Obteniéndose en promedio porcentajes de viabilidad y germinación de 80% y 40% respectivamente.

## Literatura citada

Abdelnour, A; Rojas, G; Alfaro, U. 2007. Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. *Tecnología en marcha*. 20(1):98-103.

Alcântara, BK; Ortega, EM; Souza VC. 2016. Identification of morphological (Tectona grandis L. f.). *Advances in Forestry Science* 3 (1):1-5

Borghezan, M; Clauman, AD; Steinmacher, DA; Guerra, MP; Orth AI. 2011. *In vitro* viability and preservation of pollen grain of kiwi (Actinidia chinensis var. deliciosa (A. Chev.) A. Chev). *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 11: 338-344

Brewbacker, JL; Kwack BH. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany* 50 (9): 859-865  
CAB Internacional. 2000. Forestry Compendium Global Module: Tectona grandis L. f. Wallingford, UK, CABI. 1 cd.

Di Rienzo JA; Casanoves F; Balzarini MG; Gonzalez L; Tablada, M; Robledo, CW. 2008. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Engelmann, F. 2010. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell Development Biology—Plant* (2011) 47:5–16

Ganeshan, S; Rajasekharan, PE; Shashikumar, S; Decruz, W. 2008. Chapter 17: Cryopreservation of Pollen. B.M. Reed (ed.), *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer. 443-464

Hine, A; Rojas, A; Suarez, L; Murillo, O; Espinoza, M. 2019. Optimization of pollen Germination in Tectona grandis (Teak) for Breeding programs. *Forests* 10, 908, 1-10.

Hine, A; Vargas, P; Abdelnour, A. 2013. Crioconservación de semillas de teca (*Tectona grandis L.f.*). *Agronomía Costarricense* 37(1): 51-60.

Lora, J; Herrero, M; Hormaza JI. 2011. Stigmatic receptivity in a dichogamous early-divergent angiosperm species, *Annona cherimola* (Annonaceae): Influence of temperature and humidity. *American Journal of Botany* 98(2): 265–274.

Maryam; Jaskani MJ; Naqvi SA. 2017. In: Chapter 1. Storage and Viability Assessment of Date Palm Pollen. In: Al-Khayri J., Jain S., Johnson D. (eds) *Date Palm Biotechnology Protocols Volume II. Methods in Molecular Biology*, vol 1638. Humana Press, New York, NY

Murillo, O; Wright, J; Monteuis, O; Montenegro, F. 2013. Capítulo 6 Mejoramiento genético de la teca en América Latina. En: De Camino (ed). *Las plantaciones de teca en América Latina: Mitos y realidades. Boletín Técnico 397. CATIE. Turrialba, Costa Rica.* 8-28 p

Murillo, O; Badilla, Y; Rojas, F. 2016. Desarrollo del mejoramiento genético forestal en Costa Rica y liderazgo regional con especies tropicales En: XIV CONAFA, 25-27 de octubre, Belén, Costa Rica.

Palupi, E; Owens, J; Sadjad, S; Sudarsono, S; Solihin D. 2010. The importance of fruit set, fruit abortion, and pollination of teak (*Tectona grandis*). *Canadian Journal Forestry Research.* (40): 2204-2214.

Pérez, J; Araya, E; Garro, G; Abdelnour, A. 2017. Analysis of stress indicators during cryopreservation of seeds of landrace maize (*Zea mays*). *Cryoletter* 38(6): 445-454

Popova, E; Shukla, M; Haeng, HK; Saxena, PK. 2015. Chapter 3. Plant Cryopreservation for Biotechnology and Breeding. IN: J.M. Al-Khayri, S.M. Jain and D.V. Johnson (eds.), *Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular Tools.* Springer International Publishing, Switzerland. 63-93

Rajasekharan, PE. 2015. Charter 23. Gene Banking for *Ex Situ* Conservation of Plant Genetic Resources. In: Bahadur B., Venkat Rajam M., Sahijram L., Krishnamurthy K (eds). *Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology.* Springer India. 445-459

- Rajasekharan PE, Ravish BS, Vasantha Kumar T, Ganeshan S. 2013. Chapter 4. Pollen cryobanking for tropical plant species. In: Conservation of tropical plant species. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, pp 65–75
- Silva, RLD; Souza, EHD; Vieira, LDJ; Pelacani, CR; Souza, FVD. 2017. Cryopreservation of pollen of wild pineapple accessions. *Scientia Horticulturae* (219):326-334.
- Sousa, VA. 1990. Criopreservação de pólen de *Eucalyptus* SPP. *Boletim de Pesquisa Florestal*, Colombo, n. 21, p.15-19
- Shivanna, KR; Tandon, R. 2014. *Reproductive Ecology of Flowering Plants: A Manual*. New Delhi, India. Springer. p. 46
- STATSOFT INC. 2013. Statistica (data analysis software system), version 13.1. [www.statsoft.com/textbook/](http://www.statsoft.com/textbook/). Tulsa, OK, USA.
- Souza, FVD; de Souza, EH; da Silva, RL. 2018. Cryopreservation of Pollen Grains of Pineapple and Other Bromeliads. In: Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N. (eds) *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology* (1815): 279-288
- Tangmitcharoen, S; Owens, JO. 1997a. Floral Biology, Pollinization, pistil Receptivity, and Pollen-tube growth of teak (*Tectonagrandis* Linn f). *Annals of Botanical* 79: 401-410
- Tangmitcharoen, S; Owens, JO. 1997b. Pollen viability and pollen-tube growth following controlled pollination and their relation to low fruit production in teak (*Tectona grandis* Linn f). *Annals of Botanical* 80: 401-420
- Towill, LE; Walters, C. 2000. Cryopreservation of pollen In: Engelmann F, Takagi H (eds) *Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and applications*. JIRCAS, Tsukuba, pp 8–20
- Towill, LE. 2002. Cryopreservation of plant germplasm. In: Towill LE, Bajaj YPS (eds) *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Cryopreservation of Plant Germplasm II*. Springer-Verlag, Berlin, pp 3-21

Vendrame, WA. 2018. Cryopreservation. In: Lee YI., Yeung ET. (eds) *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses—Methods and Protocols*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, New York, NY. pp 283-302.

Volk, GM. 2011. Collecting plant genetic diversity: Technical guidelines: Chapter 25 Collecting pollen for genetic resources conservation. National Center for Genetic Resource Preservation, USDA-ARS. Pp 10

Wang, Y; Chu, YJ; Xue, HW. 2012. Inositol polyphosphate 5-phosphatase-controlled Ins (1, 4, 5)P<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup> is crucial for maintaining pollen dormancy and regulating early germination of pollen. *Development* 139, 2221–2233.

## **CAPÍTULO III**

# **EFFECTO DE PRODUCTOS BIOACTIVOS SOBRE LA GERMINACIÓN DE GRANOS DE POLEN DE TECA CRIOCONSERVADOS**

## Resumen

La teca (*Tectona grandis* L. f.), es un árbol originario del sureste asiático, considerado de gran valor económico principalmente por su madera. Como parte de los esfuerzos por el mejoramiento genético de esta especie, se han desarrollado protocolos para la crioconservación de polen, sin embargo, es indispensable asegurar la viabilidad y germinación eficiente del mismo para futuros cruzamientos de material seleccionado. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de un análogo espirostánico de brasinoesteriode (Biobras-16<sup>®</sup>) y una mezcla de oligogalacturónidos (Pectimorf<sup>®</sup>) sobre la germinación *in vitro* de polen de teca crioconservado, el tamaño del polen y longitud del tubo polínico. Los experimentos consistieron en evaluar la germinación de polen crioconservado en nitrógeno líquido durante tres períodos diferentes (0, 4 y 8 meses) en cinco medios de cultivo, para un total de 15 tratamientos. Los medios evaluados constaron de 10% de concentración de sales de Brewbaker y Kwak, 10g L<sup>-1</sup> de sacarosa y pH 6,5; sin suplementos (M1), suplementado con 0,001 y 0,050 mg L<sup>-1</sup> de Biobras-16<sup>®</sup> (M2 y M3 respectivamente), 5 mg L<sup>-1</sup> y 10 mg L<sup>-1</sup> de Pectimorf<sup>®</sup> (M5 y M6). Los datos de germinación fueron analizados mediante un Modelo Lineal General, mientras que la longitud del tubo polínico y el área del polen fueron analizadas mediante análisis de varianza (ANOVA) y análisis de correlación. Se demostró que ambos productos bioactivos favorecieron la germinación *in vitro* de los granos de polen crioconservados durante 4 y 8 meses, siendo el efecto del Biobras-16<sup>®</sup> en concentración de 0,001 mg L<sup>-1</sup> más consistente. A la vez, el Pectimorf<sup>®</sup> estimuló la elongación del tubo polínico, lo cual puede favorecer los procesos de fecundación.

**Palabras clave:** *Tectona grandis*, forestales, brasinoesteroides, oligogalacturónido,

## **Abstract**

Teak (*Tectona grandis* L. f.) is a tree native to Southeast Asia considered of great economic value, mainly for its wood is which has driven the development of breeding programs. As part of efforts for the genetic improvement of this species, cryopreservation protocols have been developed; however, it is essential to ensure its viability and efficient germination for future selected material crosses. The objective of the present work was to evaluate the effect of Spiroscopic analogue of Brassinoesteriode (Biobras-16<sup>®</sup>) and a mixture of oligogalacturonides (Pectimorf<sup>®</sup>) on the *in vitro* germination of cryopreserved teak pollen and in size of pollen and pollen tube. The experiments consisted of evaluating the germination of liquid nitrogen cryopreserved pollen for three different periods (0, 4 and 8 months) in five culture media, for 15 treatments. Evaluated media consisted of 10% salt concentration Brewbaker and Kwak, 10g L<sup>-1</sup> of sucrose and pH 6.5; unsupplemented (M1), supplemented with 0,001 and 0,050 mg L<sup>-1</sup> Biobras-16<sup>®</sup> (M2 and M3 respectively), 5 mg L<sup>-1</sup> and 10 mg L<sup>-1</sup> Pectimorf<sup>®</sup> (M5 and M6). Germination data were analyzed using a General Linear Model, while pollen tube length and pollen area were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and correlation analysis. It was demonstrated that both bioactive products stimulated *in vitro* germination of cryopreserved pollen grains for 4 and 8 months, the effect of Biobras-16<sup>®</sup> at a concentration of 0.001 mg L<sup>-1</sup> being more consistent. At the same time, Pectimorf<sup>®</sup> stimulated the elongation of the pollen tube, which can favor fertilization processes.

**Key words:** *Tectona grandis*, forestry, brassinosteroid, oligogalacturonides

## Introducción

La teca (*Tectona grandis*) es una especie forestal originaria del Sudeste de Asia, cuya madera es una de las mejor valoradas y más conocidas en el mundo, lo cual ha impulsado el desarrollo de programas de mejoramiento genético para esta planta (Santos *et al.* 2014). En la primera etapa de dichos programas, se ha seleccionado material élite, con características comerciales de alto valor, sin embargo, es necesario avanzar hacia el desarrollo de cruzamientos controlados entre genotipos para lograr un mayor progreso en la calidad y rendimiento de esta especie. Tanto para el proceso reproductivo como para el mejoramiento genético basado en cruces controlados, es necesario garantizar la disponibilidad de polen viable, para asegurar el éxito de las polinizaciones y la eficiencia del mejoramiento. Por ello, es indispensable conocer la capacidad de germinación del grano de polen y de esta manera brindar un estimado de posibles progenitores femeninos y masculinos (Santos *et al.* 2014, Rajasekharan 2015).

Las pruebas de germinación *in vitro* permiten determinar la cantidad de polen viable y el crecimiento del tubo polínico bajo condiciones controladas. Como parte de esta técnica, en los últimos años, se han estudiado las aplicaciones de sustancias bioactivas que influyen en el crecimiento y la diferenciación celular de diversas especies vegetales, entre ellas los brasinoesteroides (Br) y las oligosacarinas (OG) (Martínez 200, Rodríguez 2015).

Los brasinoesteroides son hormonas esteroidales de las plantas, que se han encontrado principalmente en polen, hojas, yemas, flores y semillas, en proporciones y formas diferentes (Ali 2019). Estos compuestos han demostrado tener un efecto positivo en la morfogénesis tanto *in vitro* como *ex vitro*, su respuesta depende del tipo y la concentración que se utilice, así como de su interacción con las hormonas de la planta. Dentro de estas sustancias el Biobras-16<sup>®</sup> ha sido ampliamente utilizado, y ha demostrado ser activo a concentraciones extremadamente bajas, generalmente soluciones de  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$  mgL<sup>-1</sup> (Ali 2019).

Los oligogalacturónidos se generan por hidrólisis enzimática de la pared celular de plantas y hongos que en concentraciones bajas tienen actividad biológica. Estos compuestos forman parte de las oligosacarinas más estudiadas, son consideradas bioestimulantes por ser moléculas bioactivas cuya función es mejorar las propiedades fisicoquímicas de las plantas, los rendimientos y la calidad de los cultivos (Lara *et al.* 2018). El Pectimorf® es un biopreparado cuyo principio activo es una mezcla de oligosacáridos pécticos y moléculas señalizadoras importantes en los procesos fisiológicos de las plantas, relacionados con el crecimiento y la estimulación de los mecanismos de defensa. Las concentraciones óptimas del producto para obtener una respuesta biológica satisfactoria oscilan entre los 10 y 20 mgL<sup>-1</sup> (Ramos *et al.* 2013). El empleo de sustancias bioactivas como las mencionadas pueden aumentar la eficiencia germinativa de los granos de polen y con ello, su fertilidad.

El presente estudio se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de dos compuestos bioactivos, el Biobras-16® y Pectimorf® sobre la germinación *in vitro*, el tamaño del polen y la longitud del tubo polínico de polen crioconservado de teca, con el fin de estimar la calidad del polen.

### **Materiales y métodos**

***Colecta y procesamiento del polen.*** Se seleccionaron árboles establecidos en ensayos clonales de la empresa Novelteak, Guanacaste, Costa Rica. De las inflorescencias se colectaron flores sin abrir y se colocaron en bolsas plásticas con cierre hermético durante una hora, para inducir la apertura de estas. Una vez abiertas las flores y con ayuda de pinzas de disección, se procedió a la extracción mecánica de las anteras, seguido de su deshidratación según metodología descrita por Hine *et al.* 2019.

**Crioconservación.** Las anteras con un contenido de humedad de 39,5%, fueron congeladas mediante inmersión directa de los criotubos en nitrógeno líquido a -196°C durante 4 y 8 meses. La muestra correspondiente a 0 meses no fue sometida a nitrógeno líquido. Una vez transcurrido el tiempo de almacenamiento respectivo, las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente por cinco minutos y rehidratadas en cámara de humedad durante una hora (Hine *et al.* 2018). Seguidamente, los granos de polen se desprendieron de las anteras mediante vibración, empleando un vortex a baja intensidad durante 3 minutos, y se colocaron en crioviales de 2 mL para la germinación. A cada vial se añadieron 250 µL del medio de cultivo líquido correspondiente. Todos los medios tuvieron las sales de Brewbaker y Kwack (BK) (1963) diluidas al 10%, así como 10g L<sup>-1</sup> de sacarosa y pH 6,5; además de los suplementos especificados en el Cuadro 9. El medio BK (1963) está compuesto por: Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 300 mg L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 200 mg L<sup>-1</sup>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 100 mg L<sup>-1</sup>, KNO<sub>3</sub> 100 mg L<sup>-1</sup>, pH=6.5 (Cuadro 9).

Cuadro 9. Tratamientos empleados para la germinación los granos de polen de teca a los 0, 4 y 8 meses de crioconservación (-196 °C).

Medios de germinación	Suplementos
M1	Ninguno
M2	0,001 mg L <sup>-1</sup> Biobras-16®
M3	0,05 mgL <sup>-1</sup> Biobras-16®
M4	5 mgL <sup>-1</sup> Pectimorf®
M5	10 mgL <sup>-1</sup> Pectimorf®

Todas las muestras se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente y luego se les añadió 250 µL de acetocarmín (1%) como colorante. El porcentaje de germinación se determinó mediante el cociente del número de granos germinados entre los totales encontrados en cada campo microscópico, considerando germinados, únicamente los granos con un tubo polínico de longitud mayor o igual al diámetro del grano de polen (Aramendiz *et al.* 2012). Dichos conteos se

realizaron empleando muestras de 100 granos de polen por campo óptico, y en un microscopio Nikon ALPHAPHOT-2 YS2 (10x).

Las mediciones del área del polen ( $\text{mm}^2$ ) y longitud del tubo polínico ( $\mu\text{m}$ ), se realizaron empleando un microscopio Nikon eclipse 80i con aumento 20x, acoplado a una cámara fotográfica con visualización en la computadora a través del programa Nikon Ds-Fi-L2. Para todos los tratamientos se realizaron tres repeticiones y cinco lecturas por repetición.

**Análisis estadístico.** Se comprobó el cumplimiento de los supuestos estadísticos para análisis paramétricos y se evaluó la germinación mediante un Modelo Lineal General, con el fin de calcular el efecto de cada factor y la interacción de ambos. Por su parte, los datos de área y longitud de tubo polínico se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) con comparaciones múltiples de Tukey, así como a un análisis de correlación lineal mediante el cálculo del coeficiente de Pearson.

El ensayo para la evaluación de la germinación de polen se realizó mediante un diseño de bloques completos al azar, con un arreglo factorial de dos factores, uno con cinco niveles y el otro con tres niveles. En todos los tratamientos se realizaron tres repeticiones y cinco lecturas por repetición. En el caso del ensayo para determinar del área del grano de polen y longitud del tubo polínico, se analizaron por un diseño completo al azar y se realizaron cinco repeticiones por tratamiento. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con 95 % de confianza y mediante el programa estadístico Minab 19®.

## Resultados

Al analizar los datos mediante Modelo Lineal General, se evidenció con un 95% de confianza que tanto el medio de cultivo como el tiempo de crioconservación y la interacción entre ambos factores ejercen un efecto significativo sobre la germinación del polen de teca. Además, el modelo explica el 56,97% de la varianza del ensayo según el valor de R-cuadrado.

El medio de cultivo suplementados 0,001 mg L<sup>-1</sup> Biobras-16<sup>®</sup> (M2) mostró tener un efecto positivo sobre la germinación de polen de teca independientemente del tiempo de crioconservación (Cuadro 10).

Cuadro 10. Efecto del medio de cultivo y el tiempo de crioconservación en la germinación de polen de teca.

<b>Compuestos bioactivos</b>	
Valor del estadístico p= 0,000	
<b>Medio de cultivo</b>	<b>Germinación (%)</b>
M1	24,1±9,0 c
M2	31,3±7,3 a
M3	25,8±8,2 bc
M4	27,7±6,4 b
M5	23,8±4,6 c

<b>Crioconservación</b>	
Valor del estadístico p= 0,000	
<b>Tiempo (meses)</b>	<b>Germinación (%)</b>
T0	28,3±6,2 a
T4	28,0±8,3 a
T8	23,3±7,6 b

Columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, P≤0,05).

Al evaluar la germinación de polen, existe diferencia significativa entre los tratamientos con sustancias estimuladoras en diferentes concentraciones respecto al control (M1), mostrando este último un porcentaje de germinación superior (33,5%) (0 meses). Esto indica que, en polen fresco las sustancias en las concentraciones empleadas no provocan un efecto positivo en la germinación.

En el polen conservado en nitrógeno líquido por un lapso de 4 meses, se observó un efecto estimulador del brasinoesteroide en ambas concentraciones evaluadas (M2 y M3), las cuales presentaron diferencias significativas con los otros tratamientos; sin embargo, al transcurrir los ocho meses, la menor concentración 0,001 mg L<sup>-1</sup> de brasinoesteroide (M2) evidenció mayor estímulo en la germinación de los granos de polen de teca (Figura 8).

Además, se evidenció una disminución del porcentaje de germinación de polen conforme avanza el tiempo de crioconservación en medios suplementados con Pectimorf® (M4 y M5) y en el control (M1); en este último se pasa de un 33,5% de germinación a los 0 meses hasta 17% a los 8 meses (Figura 8).

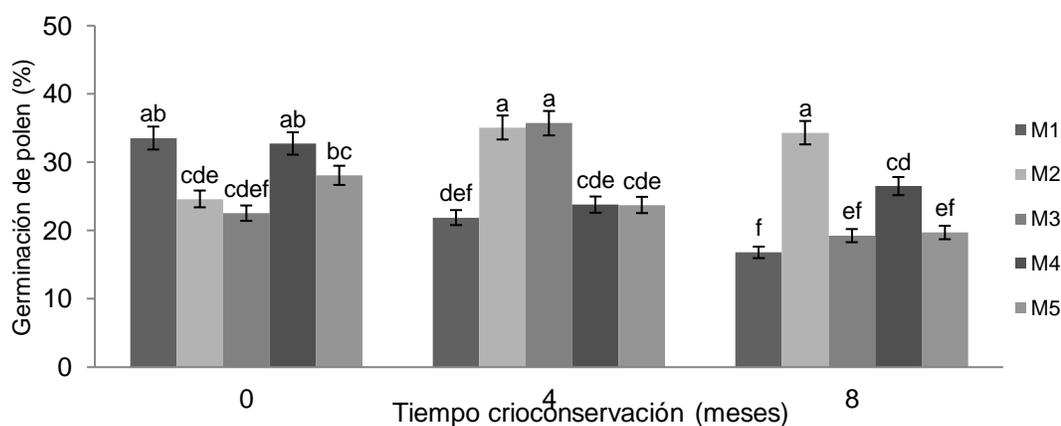


Figura 8. Efecto del Biobras-16® y Pectimorf® sobre la germinación de polen crioconservado de teca durante 0, 4, 8 meses. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, P≤0,05)

Con respecto al área del polen, se determinó diferencias significativas entre los medios de cultivo empleados ( $p= 0,007$ ). Observándose que al tratamiento control (M1), le corresponde el mayor valor de la media ( $1551\pm 47$ ) para este carácter, sin diferencias significativas con los dos tratamientos que emplearon Biobras-16<sup>®</sup> (M2 y M3), ni con  $10 \text{ mgL}^{-1}$  Pectimorf<sup>®</sup> (M5). El medio de cultivo suplementado con la menor concentración de Pectimorf<sup>®</sup> (M4), mostró diferencia significativa con los otros medios evaluados, obteniéndose el menor valor para el área de polen ( $629\pm 76$ ) (Cuadro 11, Figura 9).

En cuanto a la longitud del tubo polínico de los granos de polen, se determinó que existen diferencias significativas entre los medios de cultivo empleados ( $p= 0,002$ ). Mostraron mayor elongación del tubo polínico en los medios suplementados con  $0,001 \text{ mg L}^{-1}$  Biobras-16<sup>®</sup> (M2) y con Pectimorf<sup>®</sup> (M4 y M5); sin embargo, los medios suplementados con  $0,001 \text{ mg L}^{-1}$  Biobras-16<sup>®</sup> (M2) y  $10 \text{ mgL}^{-1}$  Pectimorf<sup>®</sup> (M5) no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al medio control (M1) (Cuadro 11, Figura 9).

Cuadro 11. Mediciones de área y longitud del tubo polínico en granos de polen de teca crioconservado y germinado en diferentes medios complementados con Biobras-16<sup>®</sup> y Pectimorf<sup>®</sup>.

<b>Medio de germinación</b>	<b>Suplementos (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Área del polen (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Longitud del tubo polínico (µm)</b>
M1	Ninguno	$1551\pm 47$ a	$200\pm 47$ b
M2	$0,001$ Biobras-16 <sup>®</sup>	$1354\pm 112$ a	$311\pm 19$ ab
M3	$0,05$ Biobras-16 <sup>®</sup>	$1269\pm 129$ ab	$151\pm 18$ b
M4	$5 \text{ mgL}^{-1}$ Pectimorf <sup>®</sup>	$629\pm 76$ b	$397\pm 76$ a
M5	$10 \text{ mgL}^{-1}$ Pectimorf <sup>®</sup>	$1334\pm 51$ a	$302\pm 52$ ab

Medias con una letra común no son significativamente diferentes según prueba Tukey ( $p > 0,05$ ).

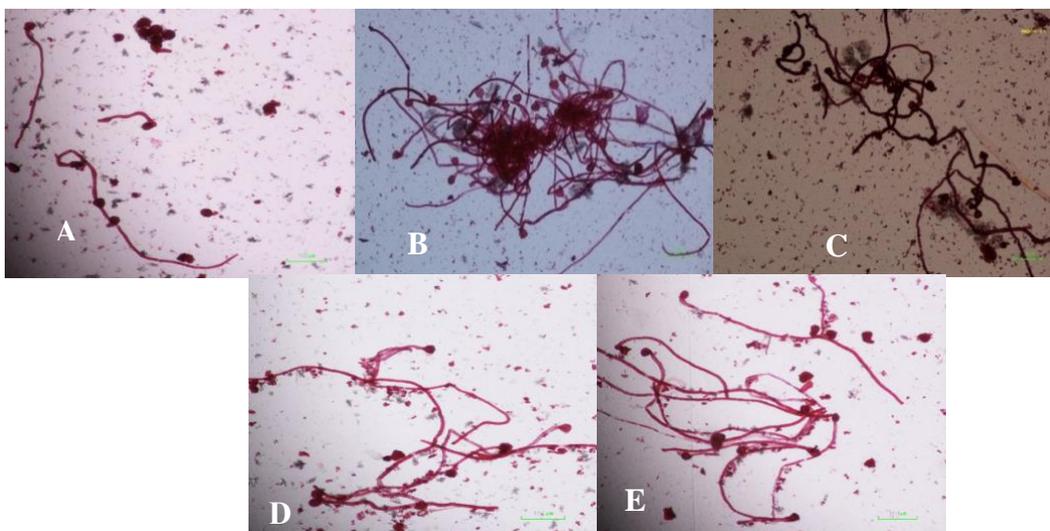


Figura 9. Germinaciones de granos de polen de teca crioconservados. Control BK (A), BK+0,001 mgL<sup>-1</sup> Biobras-16<sup>®</sup> (B), BK+0,05 mgL<sup>-1</sup> Biobras-16<sup>®</sup> (C), BK+5 mgL<sup>-1</sup> Pectimorf<sup>®</sup> (D), BK+10 mgL<sup>-1</sup> Pectimorf<sup>®</sup> (E), Barra= 100  $\mu$ m

Al realizar el análisis de correlación entre el tamaño del polen y la elongación del tubo polínico se determinó que no existe correlación de tipo lineal entre las variables. El análisis mostró aleatoriedad al evaluar el efecto de Biobras-16<sup>®</sup> en los cuales se obtuvo un coeficiente de Pearson de 0,097 (Figura 10A).

Al analizar el efecto de Pectimorf<sup>®</sup>, se obtuvo un coeficiente de Pearson de -0,441 por lo que se puede afirmar la existencia de una correlación lineal negativa moderada. Esto significa que existe una tendencia a que los granos de polen de menor tamaño presenten mayor longitud del tubo polínico (Figura 10B).

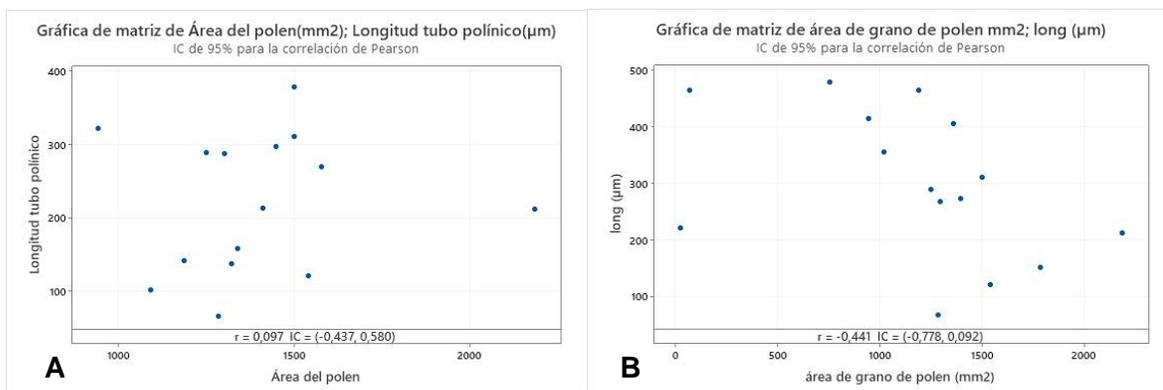


Figura 10. Análisis de correlación. entre las variables área del grano de polen y longitud de tubo polínico. Tratamientos suplementados con Biobras-16<sup>®</sup> (A). Tratamientos suplementados con Pectimorf<sup>®</sup> (B).

## Discusión

Los procesos de germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico son muy sensibles a factores de estrés, provocando la muerte del polen, la cual se traduce en una reducción de los valores de polinización y fertilización (Singh y Shono 2015). En el presente estudio se evaluó el efecto estimulador de sustancias bioactivas, como el Biobras-16<sup>®</sup> y Pectimorf<sup>®</sup> sobre la germinación *in vitro* del polen crioconservado durante ocho meses. Como resultado se evidenció que los brasinoesteroides en bajas concentraciones estimulan la germinación de los granos de polen de teca crioconservados. Estos resultados concuerdan con lo afirmado por Izquierdo (2011), quien menciona que estas sustancias son activas en concentraciones extremadamente bajas, generalmente en soluciones de 0,1-0,001 mg L<sup>-1</sup>, rango 100 veces menor que el de otros reguladores del crecimiento.

Además, los brasinoesteroides aplicados exógenamente, en dosis bajas, presentan un efecto antiestrés (Izquierdo 2011, Ali 2019). Dicho efecto antiestrés, puede ser el responsable de la obtención de los mejores porcentajes de germinación de polen crioconservado obtenidos al ser evaluados a partir de 4 y hasta 8 meses de almacenamiento en nitrógeno líquido. Ali (2019), menciona que los brasinoesteroides afectan positivamente la fertilización, modificando las

propiedades del polen a través de la estimulación del crecimiento y elongación de los tubos polínicos. Lo anterior ha sido atribuido a su acción sobre la división y elongación celular. En estudios similares evaluando la germinación *in vitro* de polen de *Oryza sativa* L. (Thussagunpaint *et al.* 2013) y polen de *Arabidopsis thaliana* (Vogler 2014), se demostró que con la aplicación de 24-epibrasinólida se mejoró la germinación *in vitro* de granos de polen cuando estos fueron sometidos a condiciones de estrés por calor.

Por otro lado, la disminución del porcentaje de germinación de polen conforme aumenta el tiempo de crioconservación en medios suplementados con Pectimorf® y en el control, puede deberse a varios factores como: el genotipo, la calidad del polen y la cantidad de reservas de nutrientes del grano de polen, propiciadas por las condiciones ambientales donde se produjo y colectó el material genético utilizado en la investigación (Hine *et al.* 2019). Además, se conoce que la crioconservación puede provocar estrés por baja temperatura, el cual crea una desorganización del metabolismo de la planta y de sus estructuras, ocasionando alteraciones en la estabilidad de las proteínas, reacciones enzimáticas y actividad respiratoria de las células (Rajasekharan 2015; Hernández y García 2016).

Con respecto a la evaluación del efecto del Biobras-16® y Pectimorf® sobre la elongación del tubo polínico, los resultados obtenidos mostraron un efecto positivo principalmente en la concentración de 5mg L<sup>-1</sup> Pectimorf®, el cual fue el único tratamiento que se diferenció del control. Los resultados obtenidos en esta variable concuerdan con los resultados en trabajos de germinación *in vitro* de granos de polen de *Solanum tuberosum*, en los cuales el Pectimorf® favoreció notablemente el crecimiento de los tubos polínicos en la menor concentración del producto y su respuesta dependió del genotipo y las concentraciones a emplear de dicha sustancia (Suárez y Hernández 2010). No obstante, en la presente investigación también se evidenció que el empleo de brasinoesteroides en una baja concentración, tiene un efecto positivo sobre la elongación de los tubos polínicos de

los granos de polen de teca crio conservado. Según Hernández y García (2016) y Núñez *et al.* (2014), los brasinoesteroides inducen respuestas de elongación y división celular, promoviendo el crecimiento del tubo polínico. También, se le atribuyen a los brasinoesteroides otros efectos fisiológicos como: germinación, rizogénesis, floración, diferenciación vascular, crecimiento de raíces, inducción de biosíntesis de etileno y otros (Ali 2019, Hernández y García 2016, Taiz *et al.* 2015). Los brasinoesteroides han sido empleados para mejorar el crecimiento del tubo polínico en *Prunus avium* (Hewitt, 1985), *Solanum lycopersicum* (Sing y Shono 2003), *Solanum tuberosum* (Thussagunpaint *et al.* 2013) y *Arabidopsis* (Vogler 2014). Por otra parte, el Pectimorf® ha sido evaluado en *Solanum tuberosum*, mostrando resultados satisfactorios al aumentar la longitud del tubo polínico. También, se ha demostrada su importancia en los procesos fisiológicos de diferentes cultivos, relacionados con el crecimiento y la estimulación de los mecanismos de defensa (Suárez y Hernández 2010).

Con la correlación entre el tamaño del polen y la elongación del tubo polínico se determinó que existe una tendencia a que los granos de polen de menor tamaño presenten mayor longitud del tubo polínico al emplear 5 mgL<sup>-1</sup> Pectimorf®, lo que podría significar, una mejor habilidad de los granos de polen para crecer a lo largo del pistilo y ser más efectivos en la fecundación del estigma. Este comportamiento puede responder a que los oligogalacturónidos son mensajeros químicos encargados de modular las enzimas que realizan procesos específicos en plantas, no solo están involucrados en mecanismos de defensas sino también en aspectos de crecimiento, morfogénesis y reproducción (Suárez y Álvarez 2015). Este hallazgo, sugiere que las sustancias bioactivas pueden ser empleadas en la evaluación de la calidad del polen crioconservado y, además, en los cruces controlados para obtener mejores rendimientos en la polinización.

## **Conclusiones**

Las sustancias bioactivas evaluadas demostraron no son efectivas para la germinación de polen fresco, sin embargo, si tienen efecto en polen crioconservado.

El Biobras-16® en concentración de 0,001 mg L<sup>-1</sup> adicionado al medio de cultivo, mejora la germinación del polen de teca crioconservado.

Se recomienda evaluar la viabilidad del polen a plazos mayores de crioconservación y con más concentraciones diferentes de compuestos bioactivos para realizar modelos predictivos. Además, es recomendable analizar las variables longitud de tubo polínico y área de polen con mayor cantidad de muestras para determinar con mayor exactitud correlaciones entre estos factores.

## Literatura citada

- Ali, B. 2019. Brassinosteroids: The Promising Plant Growth Regulators in Horticulture. In: Hayat et al. editors. Brassinosteroids: Plant Growth and Development. Springer Nature Singapore Pte Ltd. p. 349-365.
- Aramendiz, H; Cardona, C; Lugo, EA. 2012. Germinación del polen de Berenjena (*Solanum melongena* L. en condiciones *in vitro*. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 65(2):6637-6643.
- Brewbaker, J; Kwack B. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. American Journal of Botany 50(9): 859-865.
- Hernández, E; García, I. 2014. Brasinoesteroides en la agricultura II. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 2016;7(2):451-462.
- Hewitt, FR; Hough, T; O'Neill, P; Sasse, JM; Williams, EG; Rowan, KS. 1985. Effect of Brassinolide and other Growth Regulators on the Germination and Growth of Pollen Tubes of *Prunus avium* using a Multiple Hanging-drop Assay. Australian Journal of Plant Physiology 12(2):201-211.
- Hine A, Rojas, A, Suarez, L, Murillo, O, Espinoza M. 2019. Optimization of pollen Germination in *Tectona grandis* (Teak) for Breeding programs. Forests 10(908):1-10.
- Hine; A; Rojas, A; Murillo O. 2018. Effect of liquid nitrogen on the viability and germination of teak pollen. In: 5th International Conference of the IUFRO Working Party 2-09.02 Somatic embryogenesis and Other Vegetative Propagation Technologies. Coimbra, Portugal; 2018. p 112.
- Izquierdo, H. 2011. Actividad biológica de los *brasinoesteroides* y sus análogos en las plantas. Temas de Ciencia y Tecnología 15(43):45-50.
- Lara, D; Costales, D; Falcón, A. 2018. Los oligogalacturónidos en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Cultivos Tropicales. 39(2):127-134.
- Martínez, P; Gradziel, TM; Ortega, E; Dicenta, F. 2000. Short-term storage of almond pollen. HortScience. 35(6):1151-1152.

- Núñez, M; Mazorra, CL; Martínez L. 2010. Los brasinoesteroides y las respuestas de las plantas a estrés abióticos: Una visión actualizada. *Cultivos tropicales* 31(2):56-65.
- Núñez, M; Reyes, Y; Rosabal, L; Martínez, L. 2014. Análogos espiroestánicos de brasinoesteroides y sus potencialidades de uso en la agricultura. *Cultivos Tropicales* 35(2):34-42.
- Rajasekharan PE2. 2015. Charter 23. Gene Banking for *Ex Situ* Conservation of Plant Genetic Resources. In: Bahadur B, Venkat Rajam M, Sahijram L, Krishnamurthy K, editors. *Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology*. Springer India. p. 445-459.
- Ramos, L; Arozarena, NJ; Lescaille, J; García, F; Tamayo, Y; Castañeda, E. 2013. Dosis de pectimorf® para enraizamiento de esquejes de guayaba var. Enana Roja Cubana. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* (6):1093-1105.
- Rodríguez, TJ; Rodríguez, MA; Canul-Ku, J; Castillo, A; Martínez, E; Guillén D. 2015. Viabilidad de polen, receptividad del estigma y tipo de polinización en cinco especies *Echeveria* en condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6 (1):111-123.
- Santos AFA; Almeida, BC; Gava, FH; Favare, HG; Filho JB; Costa; RB. 2014. Clones production of *Tectona grandis*. *Advances in Forestry Science*. 1(2):75-82.
- Sing, I; Shono, M. 2003. Effect of 24-epibrassinolide on pollen viability during heat-stress in tomato. *Indian Journal of Experimental Biology* 41:174-176.
- Singh, I; Shono, M. 2015. Physiological and molecular effects of 24-epibrassinolide, a brassinosteroid on thermotolerance of tomato, *Plant Growth Regulation*. 2015;47(2):111–119.
- Suárez, L; Álvarez, I. Effect of Pectimorf® - A traditional growth regulator on the development and distribution in clones 'CMC-40' and 'Señorita' of Cassava (*Manihot esculenta Crantz*) stomata. *Journal of Research in Biology* 5(6):1820-1828.
- Suárez, L; Hernández, M. 2010. Efecto de Pectimorf en la germinación *in vitro* del polen de papa (*Solanum tuberosum*). *Temas de Ciencia y Tecnología* 14(40):43-46.

Taiz, L; Zeiger, E; Mølle, I; Murphy, A. 2015. Plant Physiology. 6<sup>th</sup> ed. Sunderland, Massachusetts, USA. Sinauer Associates Inc. 705 p.

Thussagunpanit J, Jutamanee K, Kaveeta L, Chai-arree W, Pankean P, Suksamrarn A. Effects of a brassinosteroid and an ecdysone analogue on pollen germination of rice under heat stress. Journal of Pesticide Science. 2013;38(3):105-111.

Vogler, F; Schmalzl, C; Enghart, M; Bircheneder, M; Sprunck S. 2014. Brassinosteroids promote *Arabidopsis* pollen germination and growth. Plant Reproduction 27(3):153-167.

## **CAPÍTULO IV**

# **CRIOCONSERVACIÓN DE POLEN DE MELINA (*GMELINA ARBOREA*) PARA UN PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO**

## **Resumen**

Con el desarrollo de esta investigación se buscó adaptar una metodología de conservación a largo plazo de polen de *Gmelina arborea* (melina). Se planteó estandarizar y adaptar las metodologías de recolección; deshidratación del polen empleando sílica gel; pruebas para determinar los porcentajes de viabilidad y germinación del polen pre y post congelamiento; y por último la técnica de deshidratación y congelamiento rápido en nitrógeno líquido. Además, se evaluó la viabilidad y germinación de tres clones del Jardín clonal del CATIE, durante 12 meses de almacenamiento en nitrógeno líquido. Lo anterior con el fin de ofrecer a los programas de mejoramiento genético de melina; una opción de almacenamiento del polen, que garantice su disponibilidad en cualquier momento y para cualquier uso; principalmente para realización de cruces controlados. Los resultados indican que el polen deshidratado hasta el 35% de contenido de humedad y almacenado por 12 meses en nitrógeno líquido (NL+), se comporta como el polen solamente deshidratado (35% CH) (NL-), obteniéndose porcentajes de viabilidad y germinación de 75% y 25% respectivamente, en ambos tipos de muestra.

**Palabras claves:** Melina, polen, crioconservación, mejoramiento genético.

## **Abstract**

With the development of this research, we sought to adapt a long-term conservation methodology for pollen of *Gmelina arborea* (melina). It was proposed to standardize and adapt the collection methodologies; dehydration of pollen using silica gel; tests to determine the percentages of viability and germination of pollen before and after freezing; and lastly, the technique of dehydration and quick freezing in liquid nitrogen. In addition, the viability and germination of three clones from the CATIE Clonal Garden were evaluated during 12 months of storage in liquid nitrogen. The foregoing in order to offer melina genetic improvement programs; a pollen storage option, which guarantees its availability at any time and for any use; mainly for carrying out controlled crossings. The results indicate that pollen dehydrated up to 35% moisture content and stored for 12 months in liquid nitrogen (NL +), behaves like pollen only dehydrated (35% CH) (NL-), obtaining percentages of viability and germination of 75% and 25% respectively, in both types of sample.

**Keywords:** Melina, pollen, cryopreservation, tree improvement.

## Introducción

Melina (*Gmelina arborea*), fue introducida en Costa Rica a finales de la década de los 60. En la actualidad, es la especie forestal más utilizada para la reforestación comercial. Además, su importancia radica en su tasa extraordinaria de crecimiento y rendimiento en plantación, considerándose como la principal especie para la producción de tarimas para la exportación agrícola de piña y banano (Rojas *et al.* 2004, Moya 2004, ONF 2018, Khanduri *et al.* 2019). Por su acelerado crecimiento en los primeros seis años, turnos cortos de aprovechamiento (14 años) y alta producción de biomasa, se ha empleado en diferentes procesos industriales y en programas de reforestación, agroforestales y silvopastoriles (Camacho *et al.* 2015).

La melina pertenece a la familia Verbenaceae. Es un árbol caducifolio de tamaño mediano, de hasta 40 m de largo y 140 cm de diámetro. Puede mostrarse en una amplia gama de zonas con diámetro que van desde 50 a 4500 m.s.n.m y en regiones de lluvia anual que van desde 50 mm a 9500 mm. El área de distribución natural de melina incluye Nepal, India, Pakistán, Bangladesh, Sri Lanka, Myanmar, Tailandia, Laos, Camboya, Vietnam y el sur de China (Stock *et al.*, 2004; Madhan *et al.* 2014). La floración en melina inicia entre el año tres y cuatro de edad de los árboles en muchos sitios, su floración temprana permitiría ciclos cortos de mejoramiento genético. sin embargo, aunque melina produce flores y frutos todo el año, la intensidad de la floración y de la producción de granos de polen varía grandemente entre los años, presentando un patrón interanual de variación. Actualmente, existe un vacío de conocimiento en la comprensión de los ciclos de floración y la ecología de la polinización de la especie, dificultando el avance de los programas de mejoramiento genético y de reproducción en la especie (Khanduri *et al.* 2019).

A inicios de los años 90, algunas empresas reforestadoras de América latina principalmente en Costa Rica, desarrollaron programas de mejoramiento genético a escala comercial, estableciendo los primeros huertos semilleros en la región (Zeaser 1998, Morales 2004, Murillo y Badilla 2011). En los últimos años, la

cooperativa de mejoramiento genético Forestal (GENFORES), retomó los programas de mejoramiento genético de melina en Costa Rica, basado en una estrategia clonal (Chacón y Murillo 2005, Ávila *et al.* 2015). Por los resultados obtenidos de dichos programas de mejoramiento genético, existe en la actualidad un gran interés por lograr avanzar hacia la segunda generación de mejoramiento genético de melina, que implica el desarrollo de técnicas de polinización controlada y de manejo y conservación de polen (Murillo *et al.* 2016).

El presente estudio tuvo como objetivo principal desarrollar metodologías para el procesamiento, manejo y crioconservación de polen de melina, como una opción de mantenimiento de su viabilidad a largo plazo.

### **Materiales y métodos**

***Colecta y procesamiento del polen.*** Las inflorescencias fueron colectas de árboles establecidos en el jardín clonal de melina ubicado en el CATIE, Turrialba (5:00 am y las 7:00 am), de las cuales se seleccionaron flores sin abrir, las cuales fueron colocadas en bolsas plásticas con cierre hermético durante una hora para inducir la apertura. Una vez abiertas las flores se procedió a la extracción mecánica de las anteras con ayuda de unas pinzas (Ganeshan *et al.* 2008, Volk 2011, Maryam *et al.* 2017, Khanduri *et al.* 2019).

***Efecto de la deshidratación y el nitrógeno líquido sobre la viabilidad y germinación del polen.*** Inicialmente, las anteras fueron deshidratadas en recipientes con sílica gel durante 0, 2, 4, 6 h. Seguidamente, se determinó el porcentaje de contenido de humedad luego de cada periodo de deshidratación. Para lo cual, se determinó el peso fresco (Pf), y finalmente se determinó el peso seco (Ps), calculándose el porcentaje de contenido de humedad (% CH) empleando la fórmula:  $:\left[\left(\frac{Pf-Ps}{Pf}\right) \times 100\right]$  (Abdelnour 2007, Volk 2011, Hine *et al.* 2019).

Una vez deshidratadas las anteras y calculado en contenido de humedad, las anteras se separaron en dos grupos: uno para evaluar el efecto de la deshidratación sobre la viabilidad y germinación del polen y como testigo del congelamiento (NL-); y el otro, para evaluar el efecto del nitrógeno líquido sobre la viabilidad y germinación del polen deshidratado (NL+).

Para determinar efecto del nitrógeno líquido sobre la viabilidad y germinación del polen deshidratado (NL+), las anteras deshidratadas fueron colocadas en criotubos de polipropileno de 2 ml. El congelamiento se efectuó por inmersión directa de los criotubos en el nitrógeno líquido durante 1h. Después del periodo de congelamiento, las anteras fueron descongeladas a temperatura ambiente por 5 minutos.

Una vez descongeladas las muestras, el polen de estas (NL+) y el polen de las muestras testigo (NL-) se separó de la antera agitando los crioviales con un vortex a baja intensidad durante 3 minutos. Seguidamente, el polen de ambas muestras fue rehidratado en una cámara de humedad durante una hora para su posterior germinación *in vitro* y determinación de la viabilidad según Hine *et al.* 2019. Para lo cual, se empleó el medio de germinación Brewbacker y Kwack (BK) (1963) al 10% de sales + 10% de sacarosa en solución acuosa pH=7; y la tinción morfológica con acetocarmín al 1%.

Una vez germinado el polen, el porcentaje de germinación y viabilidad de las muestras se determinó tomando en cuenta el número de granos viables (teñidos) y germinados en relación con los granos totales encontrados en cada campo óptico. Los conteos de polen se realizaron utilizando un microscopio Nikon ALPHAPHOT-2 YS2 con el lente 10x en un número de 100 a 200 granos de polen por campo óptico, de cada réplica se realizaron cinco conteos (Maryam *et al.* 2017, Hine *et al.* 2019). El contenido de humedad (CH%), la viabilidad y la germinación del polen se analizaron mediante un diseño de bloques completos al azar, con 4 tratamientos

(horas de deshidratación), cada tratamiento tuvo 3 repeticiones, con 5 lecturas por repetición.

**Crioconservación.** Para determinar la sobrevivencia del polen almacenado en nitrógeno líquido durante 12 meses, se empleó polen deshidratado con un contenido de humedad del 35%, según resultado del primer experimento. El congelamiento se efectuó por inmersión directa de los criotubos en nitrógeno líquido (NL+), el tiempo 0 meses solamente fue deshidratado y no fue expuesto al nitrógeno líquido, de esta manera el ensayo fue evaluado luego de 12 meses de almacenado en nitrógeno líquido (NL+). Para su evaluación, las muestras fueron descongelados a temperatura ambiente por 5 minutos.

Una vez descongelado, el polen fue rehidratado en un cámara de humedad durante una hora para su posterior germinación *in vitro* y determinación de viabilidad según Hine *et al.* (2019). Este ensayo se analizó por un diseño de bloques completos al azar, con un arreglo factorial de 3 clones deshidratados y crioconservados (tratamientos) y 2 tiempos de evaluación por variable (viabilidad o germinación). Cada tratamiento tuvo 3 repeticiones, con 5 lecturas por repetición.

### **Análisis histológico**

**Evaluación del crecimiento *in vivo* del tubo polínico.** Para el ensayo de crecimiento *in vivo* del tubo polínico, se empleó polen fresco (35% CH). Las flores colectadas fueron emasculadas y los pistilos colocadas en un sustrato de espuma floral, en grupos según tratamiento. Una vez polinizados manualmente los pistilos con ayuda de un pincel, estos fueron incubados a 25 °C y el crecimiento del tubo polínico fue evaluado durante 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas. Finalizado el tiempo de incubación establecido para cada tratamiento, se procedió a extraer los pistilos y fijarlos en una solución de formaldehído (FAA). Para su observación al microscopio, los pistilos fijados se colocaron en una solución de NaOH 1M durante 40 min. Pasado este tiempo, se realizaron tres lavados con agua destilada. Seguidamente,

fueron colocaron sobre un portaobjetos con una gota de azul de anilina y fueron aplastados con ayuda del cubre objetos. Finalmente, se colocaron en oscuridad y luego de 10 minutos se visualizó la fluorescencia de los tejidos al microscopio (Lora *et al.* 2011). El conteo de los tubos polínicos se realizó en 3 diferentes posiciones a lo largo del pistilo, con el fin de evaluar el crecimiento de estos. Los datos obtenidos se analizaron por un diseño completo al azar. Cada tratamiento (tiempo de germinación) contó con 3 repeticiones, realizándose 5 lecturas por repetición.

***Evaluación de la receptividad del estigma empleando polen fresco (35% CH) y polen crioconservado (35% CH).*** Para el ensayo de receptividad, se empleó polen fresco (35% CH) (NL-) y crioconservado polen (35% CH) (NL+) por 1 hora. Las flores colectadas fueron emasculadas y colocadas en un sustrato de espuma floral, en grupos según tratamiento. Una vez polinizados manualmente los pistilos con ayuda de un pincel, estos fueron incubados a 25 °C por 12 horas. Finalizado el tiempo de incubación establecido para cada tratamiento, se procedió a extraer los pistilos y fijarlos en una solución de formaldehído (FAA). Seguidamente, los pistilos fijados fueron colocados en una solución de NaOH 1M durante 40 minutos, pasado este tiempo, se realizó tres lavados con agua destilada. Posteriormente, fueron colocados sobre un portaobjetos con una gota de azul de anilina y fueron aplastados con ayuda del cubre objetos. Finalmente, se colocaron en oscuridad y luego de 10 minutos se visualizó la fluorescencia de los tejidos al microscopio (Lora *et al.* 2011). La receptibilidad de los granos de polen fue medida en el estigma y el crecimiento de los tubos polínicos 4 diferentes posiciones a lo largo del pistilo. Los datos obtenidos se analizaron por un diseño completo al azar, cada tratamiento (polen (NL-) y polen (NL+)) contó con 3 repeticiones, realizándose 5 lecturas por repetición.

***Estructura del polen fresco y polen crioconservado.*** Para la evaluación de la estructura del polen fresco (35% CH) y polen crioconservado (35% CH) por 1 hora; ambos tratamientos se fijaron de la siguiente manera: se colocaron en una solución de formaldehído (FAA) durante 24 h, seguido se realizó una deshidratación

secuencial con diferentes concentraciones de Etanol (30%, 50% y al 70% durante una hora en cada concentración). Finalmente, los granos de polen, según tratamiento, se incrustaron en bloques de parafina, empleando el equipo Laica HistoCore Acacia H y C. Una vez realizada la inclusión de los granos de polen en la parafina, se procedió a realizar los cortes histológicos con un micrótopo rotatorio marca Leica RM2125 RTS. Los cortes histológicos de polen se tiñeron con PAS (Ácido Periódico de Schiff) /TBO (Azul de Toluidina) (Lora *et al.* 2011). La documentación de las imágenes se realizó empleando un microscopio de luz y fluorescencia, marca ZEISS, modelo AxionScope. A1.

**Análisis estadístico.** Para realizar el análisis estadístico los valores en porcentajes de viabilidad y germinación *in vitro* fueron previamente transformados. Se utilizó la transformación del  $\arcsen \sqrt{\% \text{ germinación/viabilidad}}$ . Los datos transformados y no transformados fueron procesados a partir de un análisis de varianza. Se empleó un diseño de bloques completos al azar. En todos los ensayos cada tratamiento conto con 3 repeticiones, con 5 lecturas por repetición. Las diferencias entre los tratamientos se determinaron con la prueba de comparación múltiple de Tukey con una confianza del 95%, y mediante el programa InfoStat y Statistica (Di Rienzo *et al.* 2009, Statsoft, Inc. 2013).

## Resultados

**Efecto de la deshidratación y el nitrógeno líquido sobre la viabilidad y germinación del polen.** Al evaluar la sobrevivencia del polen fresco deshidratado (0, 2, 4 y 6 h) no congelado (NL-), se observó que, al avanzar el tiempo, el porcentaje de viabilidad se mantuvo arriba del 78%, mostrando diferencia estadística significativa entre los tratamientos ( $p \leq 0,0001$ ). Con respecto al porcentaje de germinación, no se encontró diferencia estadística significativa entre las horas de deshidratación ( $p=0,1614$ ), obteniéndose en promedio 24% de los granos germinados (Cuadro 12).

Al evaluar la sobrevivencia del polen deshidratado durante 0, 2, 4 y 6 h y congelados durante 1 hora al nitrógeno líquido (-196 °C) (NL+), se determinó diferencia estadística significativa ( $p=0,0001$ ) entre los tratamientos para ambas variables. Obteniéndose un porcentaje de viabilidad y de germinación de 53 % y 10% respectivamente, las 0 horas de deshidratación (75% CH), hasta llegar a porcentaje de viabilidad y germinación de 74% y 22% respectivamente a las 6 horas de deshidratación (27% CH). Estos resultados evidencian que la deshidratación previa al congelamiento mejora la variabilidad y germinación de los granos de polen congelados. Unido a los resultados anteriores, se observó un aumento de la germinación a partir de las 2 horas y conforme aumentó el periodo de deshidratación, obteniéndose un 16% a las 2 horas (45 % CH), hasta alcanzar a un valor máximo de 25% de germinación a las 4 horas de deshidratación (35% CH) (Cuadro 12).

Con base a lo anterior, se determinó que el porcentaje de humedad (CH) mínimo al cual los granos de polen toleran la deshidratación es 35%, los cuales se alcanzan entre las 4 horas de deshidratación, (Cuadro 12). Además, se determinó visualmente con el análisis al microscopio, que conforme avanzaba el tiempo de deshidratación, el polen se desprende de la antera con mayor facilidad, observándose menos polen disperso en el medio de germinación a las 0 h de deshidratación y más polen disperso luego de 2 h de deshidratación.

Cuadro 12. Contenido de humedad luego 0, 2, 4 y 6 h de deshidratación en sílica gel y porcentaje de viabilidad y germinación de los granos de polen fresco (NL-) y granos de polen congelados (NL+); y germinados en el medio BK (1963) al 10% de sus sales + 10% de sacarosa (g/100 mL) en solución acuosa a pH=7.

Tiempo de deshidratación (h)	Contenido				
	humedad (CH)(%)	Viabilidad (%)	Germinación (%)	Viabilidad (%)	Germinación (%)
		NL-		NL+	
0	75,40±1,47a	78,69±1,25b	25,60±2,39	53,45±1,33b	9,8d±0,82d
2	44,80±5,20b	88,13±0,65a	19,94±1,06	67,93±0,84a	15,94±0,67c
4	35±3,54bc	78,94±1,26b	25,60±2,39	71,03±3,48a	25,46±1,23a
6	26,6±2,44c	88,25±1,21a	23,46±1,86	74,14±0,76a	22,00±0,39b

Columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $P \leq 0,05$ ).

**Crioconservación** Al evaluar en tres diferentes clones de melina, el porcentaje de viabilidad y germinación de granos polen crioconservado (35% CH) durante 12 meses (NL+), se observó diferencia estadística significativa ( $P < 0,05$ ) en el porcentaje de viabilidad. Sin embargo, en todas las muestras se obtuvo un promedio superior al 72%. En el caso del porcentaje de germinación, se obtuvo diferencia estadística significativa ( $P < 0,05$ ) entre los clones y en el tiempo de almacenamiento, sin embargo, al evaluar la germinación de cada clon a los 0 y 12 meses de almacenamiento, solo el clon 7 evidenció diferencia estadística obteniéndose un 50% de germinación en las muestras no congelados (0 meses) y un porcentaje menor (39%) a los 12 meses de almacenamiento. Lo anterior puede atribuirse a un error humano en el conteo de granos germinados (Cuadro 13).

## **Análisis histológico**

***Evaluación del crecimiento in vivo del tubo polínico.*** Al evaluar el crecimiento *in vivo* del tubo polínico de los granos polen fresco (35% CH), se determinó diferencia estadística significativa ( $P \leq 0,05$ ) en el número de tubos polínicos germinados en cada una de las posiciones evaluadas a lo largo el pistilo (Cuadro 14). Los eventos post-polinización, inician justamente luego de que los granos de polen son depositados en el estigma. Los tubos de polen crecen posteriormente en el pistilo, conforme avanza el tiempo de incubación a 25° C; y convergen en el tejido transmisor del estilo desde el momento de la polinización y hasta la posición 4 (Cuadro 14, Figura 11). En el presente estudio se determinó que, en interacciones compatibles, en promedio dos tubos polínicos llegan a la entrada del ovario, 4 h después de iniciada la polinización (Cuadro 14 -Posición 4, Figura 11).

***Evaluación de la receptividad del estigma empleando polen fresco y polen crioconservado.*** Al evaluar la receptividad del estigma, empleando polen fresco (35% CH) (NL-) y polen crioconservado (35% CH) durante 1 hora (NL+), luego de 12 horas de incubación a 25°C. No se encontró diferencias estadísticas significativas, ni en el número de granos adheridos al estigma (receptibilidad), ni en el número de tubos polínicos germinados en cada una de las posiciones evaluadas a lo largo el pistilo (Cuadro 15). Obteniéndose en promedio 23 granos adheridos al estigma (Cuadro 15-Posición 1, Figura 11) y en promedio 14 tubos polínicos alcanzando la entrada del ovario a las 12 horas (Cuadro 15- Posición 4, Figura 11).

Cuadro 13. Porcentaje de viabilidad y germinación de granos de polen crioconservados (35% CH) durante 12 meses, germinados en el medio BK (1963) al 10% de sus sales + 10% de sacarosa (g/100 mL) en solución acuosa a pH=7.

Meses	Viabilidad (%)			Germinación (%)		
	Clones			Clones		
	6	7	38	6	7	38
0	78,98±1,52ab	82,39±0,55a	81,17±0,68a	58,08±1,19a	50,02±1,44a	44,29±1,13c
12	72,76±1,02c	79,74±0,85ab	76,21±0,92bc	55,30±0,90a	38,99±1,11d	42,85±0,89cd

Columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $P \leq 0,05$ ).

Cuadro 14. Crecimiento *in vivo* del tubo polínico de granos de polen fresco (35% CH) e incubados a 25° C.

Tiempo de germinación	Estilo P2 **	Estilo P3**	Entrada Ovario P4**
2h	0,00±0,00b	0,00±0,00b	0,00±0,00b
4h	3,67±0,88b	2,67±0,67b	2,00±0,00ab
8h	6,67±4,67b	4,67±2,67b	2,00±0,00a
12h	24,33±5,7a	22,67±6,01a	18,00±7,51ab

\*\*Número de tubo polínico germinados según posición en el estilo, P: posición en el pistilo.

Columnas con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $P \leq 0,05$ ).

Cuadro 15. Receptividad del estigma, empleando polen fresco (35% CH) y polen crioconservado (35% CH) durante 1 hora, luego de 12 horas de incubación a 25 °C.

Muestra	Tiempo de germinación	Estigma P1*	Estilo P2**	Estilo P3**	Entrada Ovario P4**
NL-	12h	21,33±4,63	24,33±5,70	22,67±6,01	18,00±7,51
NL+	12h	24,33±3,38	15,33±0,88	11,33±0,88	10,00±1,00

\*Número de granos adheridos al estigma, \*\*Número de tubo polínico germinados según posición en el estilo, P: posición en el pistilo.

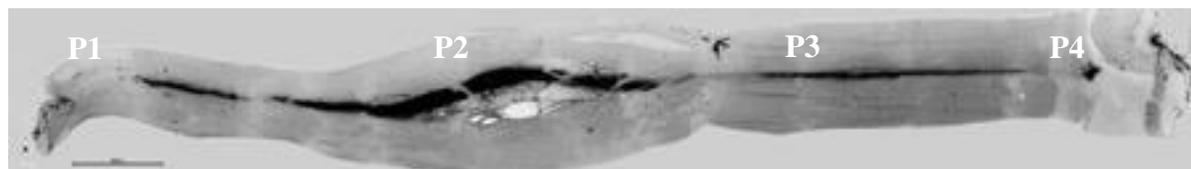


Figura 11. Receptividad de granos de polen en el estigma; y crecimiento *in vivo* de tubo polínico de granos de polen fresco a lo largo del pistilo de la flor de melina. Barra = 500 µm. P= Posición en el pistilo

**Estructura del polen fresco y polen crioconservado.** Al evaluar la estructura de los granos de polen frescos (35% CH) (Figura 12A) y polen crioconservado (35% CH) (NL+) durante 1 hora (Figura 12B), se logró observar abundante y similar contenido de almidón en ambas muestras, confirmando un estado binuclear de la maduración. No se evidenció daño estructural en polen frescos, ni del polen crioconservado.

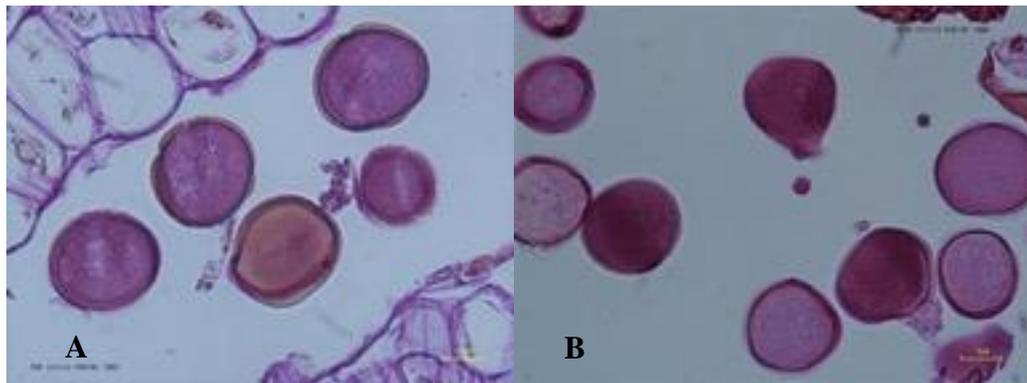


Figura 12. Polen fresco (35% CH) (A), polen crioconservado (35% CH) (B) de melina. Barra = 10  $\mu$ m, empleando la tinción PAS /TBO.

## Discusión

Con el ensayo de deshidratación, se determinó que el contenido de humedad al que los granos de polen frescos y crioconservados de melina toleran la deshidratación es al 35 %; es porcentaje de contenido de humedad se alcanza a las 4 horas de deshidratación en sílica gel. La deshidratación está muy relacionada con la viabilidad del polen y la composición de las reservas dentro de los mismos. Popova *et al.* (2015), Ganeshan *et al.* (2008) y Volk 2011, recomiendan determinar inmediatamente después de la cosecha un porcentaje de contenido de humedad menor o cercano al 30% al que el grano de polen sea tolerante y permita su manejo y almacenamiento. Además, Popova *et al.* (2015) menciona que en general, el contenido de humedad del polen por debajo del 35% es adecuado para la crioconservación, aunque estos parámetros pueden variar de una especie a otra. Este contenido de humedad debe haber sido probado previamente al

congelamiento, con el fin de verificar la viabilidad del material vegetal antes de la crioconservación (Popova *et al.* 2015).

En este mismo ensayo se logró determinar que para el polen de melina fresco o crioconservado, 35% de contenido de humedad permite obtener porcentajes de viabilidad y germinación promedio correspondientes al 75% y 25% respectivamente. El bajo porcentaje de germinación puede estar relacionado al alto contenido de humedad (35%) presente en las muestras. Otro factor que considerar con respecto al bajo porcentaje de germinación, puede ser que al inducir la dehiscencia de las anteras artificialmente por la deshidratación en sílica gel, se liberó y empleó tanto polen inmaduro como maduro en los ensayos. Ganeshan *et al.* (2008) comenta que la colecta de polen maduro y seco, con un contenido de humedad al cual el polen soporte el congelamiento, es uno de los pasos determinantes para el éxito de un protocolo de crioconservación. Por otra parte, se debe considerar que la mayoría de los sistemas experimentales empleados en la crioconservación, tales como el polen, contienen cantidades de agua celular y, por lo tanto, son extremadamente sensibles al congelamiento. Por lo tanto, las células deben deshidratarse artificialmente para protegerlas de los daños causados por la cristalización del agua intracelular en el hielo. Otro de los pasos crítico de la técnica es la recuperación del material una vez descongelado. Esta recuperación debe ser lo más rápido posible para evitar el fenómeno de recristalización, en el que el hielo se derrite y se reforma a un tamaño de cristal termodinámicamente favorable, más grande y dañino (Engelmann 2010). Al evaluar en el tiempo el efecto del nitrógeno líquido sobre la viabilidad y germinación del polen de melina deshidratado al 35% de CH, se logró determinar que los resultados se mantienen en el tiempo en cada uno de los genotipos. Popova *et al.* (2015), afirma que microesporas, polen y anteras enteras, se pueden almacenar en sistemas criogénicos. La viabilidad del polen almacenado se puede determinar mediante el uso de tintes como el acetocarmín o germinación *in vitro*. Siendo, la fertilización y la obtención de semillas, los métodos de prueba de viabilidad más efectivos y confiables. Afirma, además, que aparte del

almacenamiento de las semillas y el cultivo de tejidos, la crioconservación de polen es otra herramienta de considerable importancia para la conservación de los recursos genéticos. Por lo tanto, menciona que el establecimiento de criobancos de polen, facilitará un suministro regular de polen, lo que puede reducir el mantenimiento de huertos y viveros y permitir el almacenamiento de germoplasma y el intercambio internacional con restricciones mínimas.

Según Engelmann (2010), la técnica de crioconservación ha sido evaluada tanto en especies herbáceas como en especies leñosas. Xu *et al.* (2014), evaluaron el efecto de la crioconservación durante un año en 71 diferentes especies o cultivares de plantas ornamentales, determinando que el 85% de las especies o cultivares ensayados pueden ser crioconservados exitosamente durante un año, empleando el mismo protocolo, el cual incluía una deshidratación del polen hasta un 20% de CH y un congelamiento rápido en nitrógeno líquido.

En el caso de especies forestales, el efecto del nitrógeno líquido sobre la viabilidad y germinación del polen ha sido evaluado en pocas especies. Sousa (1990), midió el efecto del congelamiento sobre la viabilidad del polen en tres especies de *Eucalyptus* (*E. urophylla*, *E. Robusta* y *E. Dunnii*). No se observó el efecto negativo de la congelación sobre el polen de las especies estudiadas. Obteniéndose un 10% de germinación para la especie *E. urophylla* y entre el 25 y el 35% de germinación para las otras dos. Determinando que un contenido de humedad igual o superior 5,61%, favorece la crioconservación de la especie. Además, Alba *et al.* (2001), estudiaron durante un año, el efecto de la crioconservación sobre la germinación de 12 cultivares de *Olea europea L.*, determinando que el congelamiento en nitrógeno líquido provoca una disminución del porcentaje de germinación sin importar el cultivar. En todos los cultivares, la germinación promedio observada en los granos de polen frescos y crioconservado fue de 57,7 y 20,8%, respectivamente.

Con el ensayo el crecimiento *in vivo* del tubo polínico y receptividad del estigma, se comprobó la aplicación del protocolo de crioconservación propuesto en esta investigación al no encontrarse diferencias estadísticas significativa entre la receptibilidad del estigma empleando polen fresco y polen crioconservado. Además, se logra determinar el crecimiento del tubo a lo largo del pistilo, desde el estigma receptivo hasta el ovario dura alrededor de 12 horas. Lo anterior se confirma con lo descrito por Khanduri *et al.* (2019), quienes reportan que la receptibilidad del estigma en campo tiene una duración entre 12 y 18 horas.

Finalmente, Al realizarse comparaciones estructura entre el polen fresco y el polen crioconservado por una hora, no se evidenció en el análisis histológico, daño estructural de la pared (exina-entina) o en la membrana del polen a la cual atribuir un efecto negativo en la germinación del polen.

### **Conclusiones**

Los resultados de esta investigación indican que la técnica de crioconservación puede ser considerada como una estrategia complementaria para el almacenamiento a largo plazo de polen de melina, para mantener duplicados de materiales valiosos, lo que asegura la existencia del recurso.

Los resultados indican que el polen deshidratado hasta el 35% de contenido de humedad y almacenado por una hora en nitrógeno líquido (NL+), se comporta como el polen solamente deshidratado hasta el 35% de contenido de humedad (NL-), siendo apto para utilizarlo en polinizaciones controladas. Obteniéndose en promedio porcentajes de viabilidad y germinación del 75% y el 25%, respectivamente.

## Literatura citada

Abdelnour, A; Rojas G; Alfaro U. 2007. Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. *Tecnología en marcha*. 20(1):98-103.

Alba V, Bisignano V, Alba E, De Stradis A, Polignano GB. 2011. Effects of cryopreservation on germinability of olive (*Olea europaea L.*) pollen. *Genetic Resources and Crop Evolution* 58:977–982

Ávila, C; Murillo, R; Murillo, O. 2015. Selección de clones superiores de dos conjuntos genéticos de *Gmelina arborea* en el Pacífico sur de Costa Rica. *Revista de Ciencias Ambientales Vol 49 (1): 17-35.*

Badilla, Y; Murillo, O. 2011. Estrategia y avances en mejoramiento genético de GENFORES. En: Seminario Fomento del cultivo eficiente de madera, mediante el manejo intensivo. 16-18 noviembre, 2011. Sede Universidad Nacional, Paso Canoas, La Cuesta, Puntarenas.

Brewbacker JL; Kwack BH. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany* 50 (9): 859-865

Camacho, M; Murillo, O; Pinedo, C. 2015. Ganancia genética esperada en melina (*Gmelina arborea roxb.*) En Córdoba (Colombia). *Temas agrarios - vol. 20:(1) 45 – 59.*

Chacón, P; Murillo, O. 2005. Análisis comparativo de la producción de minijardines clonales hidropónicos y jardines clonales en tierra de melina (*Gmelina arborea Roxb.*). Kurú: *Revista Forestal (Costa Rica)* 2(6):1-7.

Di Rienzo JA, Casanoves F; Balzarini, MG; Gonzalez, L; Tablada, M; Robledo, CW. (2008). *InfoStat*, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Engelmann, F. 2010. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell Development Biology—Plant* (2011) 47:5–16

- Ganeshan, S; Rajasekharan, PE; Shashikumar, S; Decruz, W. 2008. Cryopreservation of Pollen. B.M. Reed (ed). Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer, New York, USA. p. 443-464
- Hine, A; Rojas, A; Suarez, L; Murillo, O; Espinoza, M. 2019. Optimization of pollen Germination in *Tectona grandis* (Teak) for Breeding programs. Forests 10, 908, 1-10.
- Khanduri, VP; Kumar, KS; Sharma, CM; Riyal, MK; Kar, K. 2019. Pollen limitation and seed set associated with year-to-year variation in flowering of *Gmelina arborea* in a natural tropical forest. Grana, 58:2, 133-143
- Lora, J; Herrero, M; Hormaza, JI. 2011. Stigmatic receptivity in a dichogamous early-divergent angiosperm species, *Annona cherimola* (Annonaceae): Influence of temperature and humidity. American Journal of Botany 98(2): 265–274.
- Madhan, SR; Veeralakshmi, S; Sirajunnisa, AR; Rajendran, R. 2014. Effect of Allelochemicals from Leaf Leachates of *Gmelina arborea* on Inhibition of Some Essential Seed Germination Enzymes in Green Gram, Red Gram, Black Gram, and Chickpea. International Scholarly Research Notices 2014: 1-7.
- Maryam; Jaskani, MJ; Naqvi, SA. 2017. In: Chapter 1. Storage and Viability Assessment of Date Palm Pollen. In: Al-Khayri J., Jain S., Johnson D. (eds) Date Palm Biotechnology Protocols Volume II. Methods in Molecular Biology, vol 1638:3-13. Humana Press, New York, NY
- Morales, G. 2004. Potential of *Gmelina arborea* for solid wood products. New Forest 28: 331–337.
- Moya, R. 2004. Wood of *Gmelina arborea* in Costa Rica. New Forests 28:(2)299-307.
- Murillo, O; Badilla, Y; Rojas, F. 2016. Desarrollo del mejoramiento genético forestal en Costa Rica y liderazgo regional con especies tropicales En: XIV CONAFA, 25-27 de octubre, Belén, Costa Rica.

ONF (Oficina Nacional Forestal). 2018. Usos y aportes de la madera en Costa Rica: Estadísticas 2017 & Precios 2018. Consultado el 18 de agosto del 2019. Disponible en <https://onfcr.org/media/uploads/documents/usos-y-aportes-de-la-madera-2017.pdf>.

Popova, E; Shukla, M; Haeng, HK; Saxena, PK. 2015. Chapter 3. Plant Cryopreservation for Biotechnology and Breeding. IN: J.M. Al-Khayri, S.M. Jain and D.V. Johnson (eds.), *Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular Tools*. Springer International Publishing, Switzerland. 63-93

Rojas, F; Arias, D; Moya, R; Meza, A; Murillo, O. y Arguedas, M. 2004. Manual para productores de melina (*Gmelina arborea*) en Costa Rica. Fondo Nacional de Financiamiento Forestal (FONAFIFO). San José, Costa Rica. 314 pp.

Sousa, VA. 1990. Criopreservação de polen de *Eucalyptus* SPP. *Boletim de Pesquisa Florestal*, Colombo, n. 21, p.15-19

STATSOFT INC. 2013. Statistica (data analysis software system), version 13.1. [www.statsoft.com/textbook/](http://www.statsoft.com/textbook/). Tulsa, OK, USA.

Stock, J; Vargas, M; Angarita, K; González, R. 2004. Seed production of *Gmelina arborea* by controlled pollination. *New Forest* (28): 167–177

Volk, GM. 2011. Collecting plant genetic diversity: Technical guidelines: Chapter 25 Collecting pollen for genetic resources conservation. National Center for Genetic Resource Preservation, USDA-ARS. 10 p

Zeaser, D. (1998). Programa de mejoramiento genético de la Ston Forestal en la zona sur de Costa Rica. En: Seminario, Aumento de la rentabilidad de las plantaciones forestales: un reto ligado al uso de semilla de alta calidad. MINAE: San José, Costa Rica.

## SÍNTESIS DE RESULTADOS

Con la realización de esta investigación se generó resultados importantes y promisorios para el sector forestal, especialmente para las áreas de conservación y mejoramiento genético. Dentro de los principales hallazgos se encuentra el establecimiento de la metodología de procesamiento, manejo y conservación del polen para ambas especies. Contar con una técnica de manejo y conservación para las especies de teca y melina representa un gran avance hacia la siguiente generación de mejoramiento genético.

Durante la investigación fue posible determinar que tanto el polen de teca como el de melina soportan la exposición a las ultra bajas temperaturas ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) por inmersión directa en el nitrógeno líquido. Los resultados obtenidos luego de almacenar los granos de polen con un contenido de humedad entre 35 y 39,5 % según la especie; y congelarlos durante al menos una hora en nitrógeno líquido, demuestran que la técnica de crioconservación puede ser considerada como una estrategia de conservación para ambas especies. Además, con la implementación de esta metodología de crioconservación se logrará reducir la pérdida de viabilidad del polen y se facilitará su mantenimiento por al menos dos ciclos de floración, ya que esta modalidad de conservación es poco laboriosa y de bajo costo económico, convirtiéndose en una metodología atractiva para los programas de mejoramiento y conservación de la especie.

Uno de los retos que se vislumbra a partir de estos resultados, es lograr el establecimiento de un criobanco para ambas especies. Para lo cual, se requerirá en primera instancia de la determinación de la variabilidad de cada una de las especies que se desee almacenar, unido a un plan operativo y la consecución de fondo, que a su vez permita contar con infraestructura y equipos. Finalmente se requerirá de la formación técnica del personal que utilizará los materiales post congelamiento, con el fin de realizar los cruces controlados. Lo anterior, permitirá la operatividad tanto

la técnica de manejo como de conservación en cada una de las empresas miembro de GENFORES. El establecimiento del criobanco, permitirá la disponibilidad de polen en cualquier época del año en el caso de floraciones asincrónicas en una plantación o región diferente, tanto para los ensayos de cruces controlados en campo, como los análisis de la calidad del polen en ensayos *in vitro*.

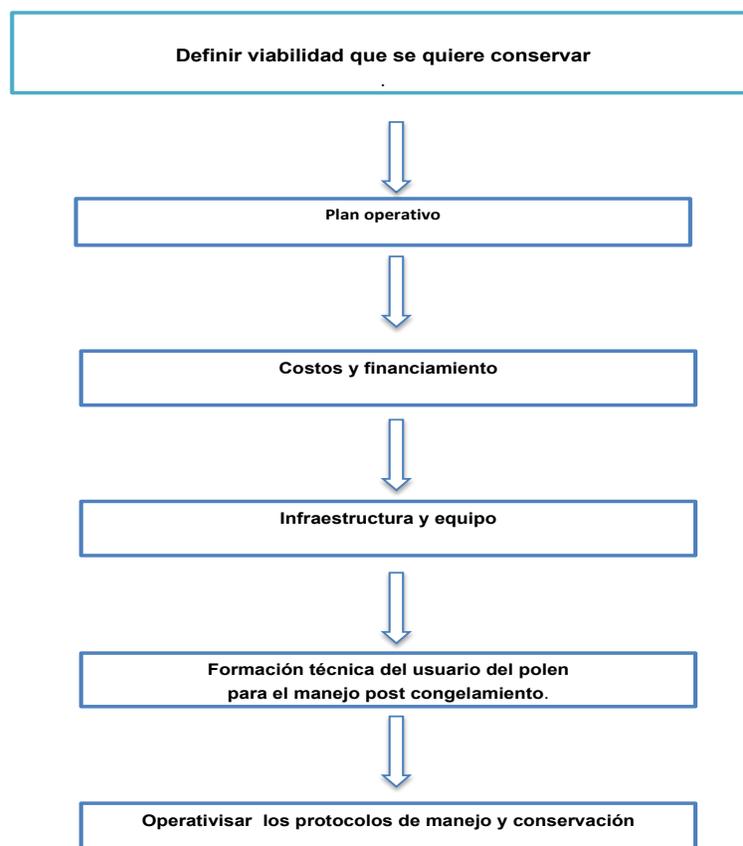


Figura 13. Paso para el establecimiento de un criobanco de polen.

Partiendo de que los resultados de la investigación indican que el polen de teca y melina soporta bajas temperaturas, se piensa implementar la metodología de almacenamiento y conservación a corto plazo a 5°C, ya que con esta metodología hemos observado que el polen de ambas especies mantiene su viabilidad hasta por

28 días. Esta metodología funcionaría muy bien al momento de la realizar cruces controlados de los clones que florecen de manera sincrónica en una plantación.

Mucho se ha avanzado, sin embargo, aún queda mucho trabajo por hacer. Uno de los grandes desafíos que se plantea GENFORES, es la implementación de la conservación del polen empleando aceites naturales, con el fin de lograr un traslado transfronterizo de los materiales, con menos restricciones sanitarios.

## **CONCLUSIONES**

Con base a la aplicación del estudio se concluye que evaluar la calidad del polen es posible bajo los parámetros definidos durante el estudio, los cuales a su vez permitirán el manejo y purificación del polen. Dicho manejo y purificación del polen abre la posibilidad de realizar los ensayos de cruces controlados a una escala operativa dentro de los planes de mejoramiento genético en Costa Rica.

Además, durante la investigación fue posible determinar que el polen de teca y melina soporta la exposición a las ultra bajas temperaturas (-196°C) por inmersión directa en el nitrógeno líquido. Los procesos de colecta, procesamiento, conservación y análisis de la calidad del polen descritos para ambas especies no requieren de un equipo especial, de alto valor económico, por lo que se podría considerar continuar con la investigación ya que, de optimizarse dichos procedimientos para las empresas, podrían ser de fácil implementación.

Además, con la operatividad de estas metodologías, se logrará reducir al máximo la pérdida de viabilidad del polen y se facilitará el mantenimiento de las colecciones, ya que la modalidad de conservación propuesta es poco laboriosa y de bajo costo económico, convirtiéndose en una metodología atractiva para los programas de mejoramiento y conservación de las especies.

## RECOMENDACIONES

Como complemento de esta investigación sería recomendable realizar un ensayo de germinación *in vivo* en campo con polen crioconservado, con el fin de validar la metodología desarrollada. Además de determinar la carga de polen crioconservado a emplear en los ensayos de cruzamiento.

Con respecto a la parte técnica, aun cuando se logró ejecutar la metodología diseñada para la investigación partiendo de la información existente en la literatura para ambas especies, es recomendable investigar más en el tema para obtener, por ejemplo, una mejor metodología de tinción o emplear una complementaria que genere mejores resultados en términos de viabilidad. Realizar investigación en el tema del análisis de los componentes químicos del pistilo de ambas especies, este análisis arrojaría información valiosa para formular un medio de cultivo más eficiente y específico para la germinación del polen de teca y melina. Lo que se traduciría en un análisis más robusto de la calidad del polen.