

# **Morfología, viabilidad y longevidad del polen en clones de *Theobroma cacao* tipo Nacional y Trinitario (CCN51) en el Litoral ecuatoriano**

Boris García Talledo<sup>1</sup>, Alex Zambrano Bazurto<sup>1</sup>, Luz García Cruzatty<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad Técnica de Manabí, Campus La Teodomira, Lodana, Manabí, Ecuador

\*Correspondencia: cecilia29@hotmail.com

## **Morphology, viability and longevity of pollen in clones of *Theobroma cacao* type National and Trinitario (CCN51) in the Ecuadorian Litoral**

### ABSTRACT

Understanding the biology of pollen is necessary to improve the reproduction of plant species and for the successful implementation of genetic improvement and conservation programs. The objective of this work was to determine the ideal method for in vitro germinability of *Theobroma cacao* pollen, evaluate the initial viability, longevity and make the morphological description of it. In order to have information on the morphological and viability characteristics of pollen in *Theobroma cacao*, flowers were collected at noon in a clonal trial at La Hacienda "Teodomira" in Lodana, Manabí. Viability was assessed by in vitro germination, germination in vivo and staining. The morphological characterization of the pollen was carried out from observations in light microscope and scanning electron and to determine the size of the pollen measurements were made using the Motic Images Plus 2.0 software. The pollen of this species is small (20 µm) and spheroidal in shape. The best way to evaluate the viability in vitro is the sucrose and agar compound. Its initial viability through germination in vitro was between 56.6 and 86.6 %; with the staining method it was 100 % and by germination in vivo it was calculated between 40.7 and 58.7 %. There was a moderate correlation between germination in vitro and germination in vivo ( $r = 0.5$ ), but there was no correlation between the viability calculated by the staining method and that calculated by germination in vivo, for which the method is recommended in vitro to perform evaluations of both viability and pollen longevity. In the clones of *T. cacao* National type, pollen quickly loses its viability, and at 240 minutes there was no germination; nevertheless, the pollen of clone CCN-51 has a longevity of 24 hours.

Keywords: germination, viability, pollen, pollen tube

## RESUMEN

Entender la biología del polen es necesario para mejorar la reproducción de las especies vegetales y para la implementación exitosa de programas de mejoramiento genético y conservación. Este trabajo tuvo como objetivos: determinar el método idóneo para la germinabilidad in vitro del polen de *Theobroma cacao*, evaluar la viabilidad inicial, la longevidad y realizar la descripción morfológica del mismo. Con el fin de contar con información sobre las características morfológicas y de viabilidad del polen en *T. cacao*, se colectó flores a medio día en ensayo clonal en La Hacienda “Teodomira” en Lodana, Manabí. La viabilidad se evaluó mediante germinación in vitro, germinación in vivo y tinción. La caracterización morfológica del polen se realizó a partir de observaciones en microscopio de luz y electrónico de barrido y para determinar el tamaño del polen se realizaron mediciones utilizando el software Motic Images Plus 2.0. El polen de esta especie es de tamaño pequeño (20  $\mu\text{m}$ ) y de forma esferoidal. El medio idóneo para evaluar la viabilidad in vitro es el compuesto por sacarosa y agar. Su viabilidad inicial mediante la germinación in vitro estuvo entre 56.6 y 86.6 %; con el método de tinción fue de 100 % y mediante germinación in vivo se calculó entre 40.7 y 58.7 %. Hubo una moderada correlación entre la germinación in vitro y la germinación in vivo ( $r = 0.5$ ), más no hubo correlación entre la viabilidad calculada por el método de tinción y la calculada mediante germinación in vivo, por lo cual se recomienda el método in vitro para realizar evaluaciones tanto de viabilidad como de longevidad del polen. En los clones de *T. cacao* *Tipo nacional*, el polen pierde rápidamente su viabilidad, ya a los 240 minutos no hubo germinabilidad; no obstante, el polen del clon CCN-51 tiene una longevidad de 24 horas.

Palabras clave: germinación; viabilidad; polen; tubo polínico

## INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un frutal nativo de la cuenca amazónica y varias regiones de Centroamérica, que en plantaciones tiene una baja productividad de frutos (Rangel *et al.*, 2012). En el *T. cacao*, la polinización es predominantemente cruzada a pesar que la flor es hermafrodita, pues presenta hercogamia revertida, que impide la autopolinización, lo cual sumado a una incompatibilidad esporofítica y gametofítica que se ha observado en la especie, causa que menos del 25 % de las flores que se producen en un año sean fecundadas, de las cuales máximo el 2 % terminarán en frutos cosechados (Pérez, 2014).

El conocimiento de la calidad del polen es de primordial importancia en los procesos de conservación, mejoramiento genético y producción de cultivos (selección de variedades polinizadoras, reconocimiento polen-pistilo, germinación y crecimiento del tubo polínico y fertilización) (García *et al.*, 2012). Es importante conocer la viabilidad y longevidad del polen de los árboles que se pretende utilizar como progenitores masculinos para obtener resultados exitosos (García *et al.*, 2015).

Varios factores internos y externos pueden determinar la viabilidad del polen, entre los factores internos destacan la variabilidad genética interespecífica, la duración de la microsporogenesis, el metabolismo del polen. Los factores externos tenemos la temperatura, el grado de humedad considerados los más importantes (García *et al.*, 2015).

Las evaluaciones de la calidad del polen se pueden realizar mediante técnicas *in vivo* e *in vitro*, siendo la primera un poco más exacta y confiable, sin embargo las pruebas de germinación *in vitro* son más utilizadas debido a que son más sencillas y rápidas para ejecutar. Las pruebas de tinción son uno de los métodos que permiten determinar la integridad de la membrana plasmática y la presencia de actividad enzimática (García *et al.*, 2012), sin embargo algunos autores ponen en duda su eficacia para evaluar la viabilidad de granos de polen (García *et al.*, 2015).

La influencia del medio de cultivo para la evaluación de la viabilidad de los granos de polen en *T. cacao*, es de gran importancia, ya que las principales sustancias nutritivas que lo componen (sacarosa y agar) conforman el sustento adecuado para su desarrollo. La adición de agar al medio de cultivo no resulta ser un aporte tan sustancial, ya que se ha demostrado que no incrementa la germinación en algunos granos de polen, sin embargo

en *T. cacao* funciona como componente básico para el desarrollo del tubo polínico (Polania, 1953).

El polen maduro presenta una morfología bien definida que permite la identificación de la especie de la cual procede, por lo cual la identificación de los caracteres polínicos es de gran importancia en taxonomía y filogenia. En general, los caracteres morfológicos, tanto la forma como el tamaño, son considerados caracteres de valor taxonómico, pues en general, permanece constante dentro de una misma especie. Se ha reportado entre diferentes especies que la heterogeneidad del polen en un taxón concreto puede ser indicativo de diferentes estados de madurez u origen híbrido (García *et al.*, 2015; Stecconi *et al.*, 2004)

Aunque en el país existen avances en programas de mejoramiento genético, la información generada no es suficiente, especialmente en lo que respecta a la biología reproductiva. Con estos antecedentes, el presente estudio tuvo como objetivos proveer una descripción detallada del polen de diferentes genotipos de *T. cacao* para determinar la variabilidad intraespecífica de esta característica. Además, por su importancia en programas de mejoramiento, se estudió la viabilidad inicial y la longevidad del polen. Previamente se determinó el método idóneo para evaluar la viabilidad del polen mediante germinabilidad *in vitro*.

## MÉTODOS

### *Ubicación de la zona de estudio*

El estudio se realizó en ensayo de 12 clones de *T. cacao* que se encuentra establecido en Campus Experimental “Teodomira” de la Universidad Técnica de Manabí, localizada en el cantón Santa Ana de la provincia de Manabí, en la cuenca del río Portoviejo a 60 msnm, cuyas coordenadas geográficas son 80°26'22” de longitud oeste y 01°04'15” de latitud sur.

### *Material vegetal*

El polen que se utilizó para el estudio se colectó entre los meses octubre del año 2017 a marzo del 2018. La colecta de las flores se realizó entre las 10:00 y 11:00 am, en el estado de anteras maduras, antes de su dehiscencia, ubicadas a una altura de 1.50 m del suelo aproximadamente. El material vegetal utilizado fue de 12 diferentes clones de *T. cacao*

tipo Nacional, codificados como: L29-H04, L26-H64, L46-H88, L21-H38, EET-103, L49-H28, L11-H19, L46-H75, L18-H58, L46-H57, L21-H43 y el clon trinitario CCN-51.

### *Evaluación de la viabilidad inicial*

Para la evaluación de la viabilidad inicial del polen, se utilizaron los métodos indirectos de germinación *in vitro*, tinción vital y el método directo de germinación *in vivo*. Para poder evaluar la viabilidad mediante germinabilidad *in vitro*, previamente se determinó el medio idóneo para hacerlo, para lo cual se probó el medio (M1) desarrollado por (Falque *et al.*, 1993), compuesto por: sacarosa (10 %), agar (1 %), nitrato de calcio (0.02 %) y ácido bórico (0.01 %) y otros tres medios que corresponden a modificaciones del M1 (Cuadro 1).

Para este ensayo se utilizó una mezcla de polen de 3 clones de *T. cacao*. Este polen fue sembrado el mismo día en que se efectuó la recolección y se lo mantuvo durante un periodo de 24 horas a una temperatura de 25 °C. El número estimado de granos de polen germinados se los determino bajo microscopio óptico; considerando que un grano de polen se encuentra germinado cuando el tubo polínico tenga una longitud igual o superior al diámetro del grano de polen.

**Cuadro 1.** Medios de cultivo para evaluar viabilidad de polen de *Theobroma cacao* por medio de germinabilidad *in vitro*.

**Cuadro 1.** Culture media to assess viability of *Theobroma cacao* pollen by means of *in vitro* germinability.

	M1	M2	M3	M4
Sacarosa (%)	10	8	12	14
Agar (%)	1	1	1	1
Nitrato de calcio (%)	0.02	0.02	0.02	0.02
Ácido Bórico (%)	0.01	0.01	0.01	0.01

Para calcular la germinación *in vivo* se realizó polinización manual, mediante la utilización del polen fresco de individuos coespecíficos (12 clones, 3 rametos por clon y 10 flores por rameto); previamente se aislaron botones florales, antes de la antesis, de esta forma se aseguró que los estigmas no recibieran polen de individuos cercanos. Según lo establecido por Mena & García (2014) la receptividad estigmática ocurre entre las 10h00 y 14h00, por lo cual la polinización se realizó cuando las inflorescencias femeninas se encuentren en esta fase.

Para la evaluación de la viabilidad del polen a través del método indirecto se utilizó la tinción de Alexander (verde malaquita y fucsina). Este método se probó en 12 clones, para lo cual se tomaron 10 flores de cada uno, de la que se extrajo el polen en condiciones de laboratorio. Para la tinción de los granos de polen, se procedió a aplicar una gota de la solución mencionada a un grupo de granos de polen colocados sobre el portaobjeto, a lo que posteriormente se los observó mediante un microscopio óptico, para la realización del conteo de granos de polen viables (se realizaron 4 repeticiones por cada clon). Se consideró que los granos de polen estaban viables cuando su pared celular se tiñó de verde y el citoplasma de color fucsia (Villalon, 2008).

La longevidad del polen se midió a través de la germinación *in vitro* hasta que la germinabilidad del polen fue menor al 5 %. Durante el periodo de evaluación el polen fue almacenado en tubos de Eppendorf, sin pasar por ningún proceso de secado, bajo condiciones ambientales.

#### *Análisis estadístico*

Para determinar el medio adecuado, se colocó una mezcla de polen de 3 clones en los diferentes medios (tratamientos). Este ensayo se estableció siguiendo un diseño completamente al azar, la variable a evaluar fue el número de granos de polen viables (germinados), expresando en porcentaje, en función del total de granos de polen. Los valores porcentuales fueron transformados, previo al análisis de varianza, mediante la transformación angular de Bliss. La comparación de medias se hizo mediante la prueba de Tukey ( $p \geq 0.05$ ), previo a análisis de homogeneidad y normalidad.

El medio que dio mejores resultados se utilizó para evaluar la viabilidad inicial en los 12 clones. De igual forma se evaluó la viabilidad inicial del polen, en los mismos clones, mediante los métodos de tinción y germinabilidad *in vivo*, la variable a evaluar fue el número de granos de polen viables (germinados), expresado en porcentaje, en función del total de granos de polen.

Se hizo un análisis de correlación y regresión lineal, con previa homogenización de los datos (prueba de Barlet), para determinar el grado de asociación entre germinación *in vitro* y germinación *in vivo* y entre la viabilidad por el método de tinción y la viabilidad calculada mediante germinación *in vivo*.

## RESULTADOS

Se realizó pruebas de germinabilidad in vitro para determinar el medio de cultivo adecuado para evaluar la viabilidad del polen en *T. cacao*. Utilizando el M4 se obtuvo el mayor porcentaje de germinación (89.81 %); sin embargo solo hubo diferencia estadística (Tukey  $\leq 0.05$ ) para el M2 en el que hubo la menor cantidad de granos de polen germinados (78.39 %) (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Germinación de polen de *Theobroma cacao* en diferentes medios de cultivo.

**Cuadro 2.** Pollen germination of *Theobroma cacao* in different culture media.

TRATAMIENTOS <sup>1</sup>	VARIABLE	
	% GERMINADOS <sup>2</sup>	% NO GERMINADOS
M1	83.97 ± 9.0 a	16.03 ± 9.0
M2	78.39 ± 8.2 a	21.61 ± 8.2
M3	83.41 ± 9.1 a	16.59 ± 9.1
M4	89.81 ± 10.1 a	10.19 ± 0.1
M5	89.21 ± 9.2 a	10.79 ± 9.2

<sup>1</sup>M1 = ácido bórico (0.01 %), sacarosa (8 %), agar (1 %); M2 = ácido bórico (0.01 %), sacarosa (12 %), agar (1 %); M3 = ácido bórico (0.015 %), sacarosa (8 %), agar (1 %); M4 = sacarosa (8 %), agar (0.7 %); M5 = ácido bórico (0.01 %), sacarosa (8 %), agar (0.4 %); por 30 ml de agua destilada.

<sup>2</sup> Medias con letras iguales no presentan diferencia estadística

**Cuadro 3.** Longitud del tubo polínico ( $\mu\text{m}$ ) de polen de *Theobroma cacao* en diferentes medios de cultivo.

**Cuadro 3.** Pollen tube length ( $\mu\text{m}$ ) of *Theobroma cacao* pollen in different culture media.

Medios/clones	CCN-51	L21-H38	L26-H64	$\bar{x}$
M1	14.07 ± 3.64	16.05 ± 4.74	12.72 ± 3.24	14.28 c
M2	10.84 ± 3.11	12.39 ± 1.58	11.56 ± 1.13	11.59 d
M3	13.55 ± 3.17	14.68 ± 2.93	13.16 ± 2.49	13.80 c
M4	19.86 ± 5.56	25.38 ± 4.15	13.26 ± 2.49	19.50 a
M5	16.88 ± 3.74	19.70 ± 6.13	12.36 ± 2.12	16.31 b
$\bar{x}$	15.04 b	17.64 a	12.61 c	

<sup>2</sup>M1= ácido bórico (0.01 %), sacarosa (8 %), agar (1 %); M2 = ácido bórico (0.01 %), sacarosa (12 %), agar (1 %); M3 = ácido bórico (0.015 %), sacarosa (8 %), agar (1 %); M4 = sacarosa (8 %), agar (0.7 %); M5 = ácido bórico (0.01 %), sacarosa (8 %), agar (0.4 %); por 30 ml de agua destilada.

En vista de que no se encontró diferencia significativa para la variable germinación in vitro (%) en los medios de cultivo M1, M2, M3, M4 y M5, se midió la longitud de los tubos polínicos para establecer el medio adecuado para evaluar la viabilidad y longevidad del polen de *T. cacao*. Los resultados obtenidos demostraron que en medio de cultivo M4 hay un mayor crecimiento del tubo polínico, presentando una media de 19.50  $\mu\text{m}$ . En cuanto a la relación entre los clones en torno a su capacidad de desarrollo del tubo polínico; así mismo se observó que hay diferencias estadísticas entre clones, el clon L21-H38 tuvo el tubo polínico de mayor longitud 17.64  $\mu\text{m}$  en comparación a los otros clones evaluados (Cuadro 3).

**Cuadro 4.** Comparación de medias generales de Tinción, Germinación in Vitro y Germinación in vivo.

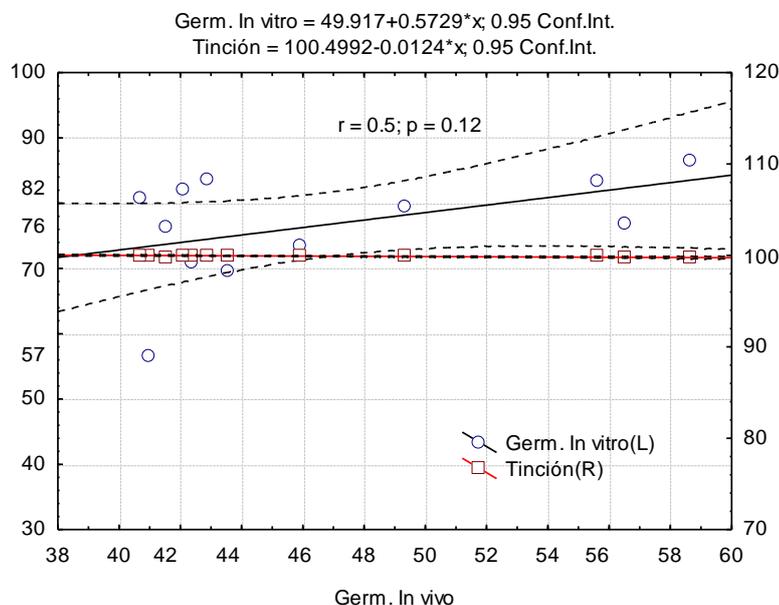
**Cuadro 4.** Comparison of general means of Staining, Germination in Vitro and Germination in Vivo.

CLONES	TINCION	GERM IN VITRO	GERM IN VIVO
L21-H38	100 $\pm$ 0	73.49 $\pm$ 5.6	45.90 $\pm$ 15.1
L26-H64	100 $\pm$ 0	56.58 $\pm$ 6.0	40.99 $\pm$ 1.9
L18-H58	100 $\pm$ 0	69.66 $\pm$ 12.0	43.56 $\pm$ 10.4
EET-103	100 $\pm$ 0	70.95 $\pm$ 14.5	42.38 $\pm$ 3.2
L46-H57	99.77 $\pm$ 0.5	76.34 $\pm$ 5.1	41.52 $\pm$ 7.6
L49-H98	100 $\pm$ 0	81.72 $\pm$ 18.9	40.70 $\pm$ 4.4
L11-H19	100 $\pm$ 0	79.47 $\pm$ 10.3	49.35 $\pm$ 12.0
L29-H04	100 $\pm$ 0	83.49 $\pm$ 4.5	42.87 $\pm$ 1.5
L21-H43	99.94 $\pm$ 0.2	82.13 $\pm$ 8.7	42.08 $\pm$ 1.3
L46-H88	99.85 $\pm$ 0.4	83.46 $\pm$ 5.9	55.62 $\pm$ 10.1
CCN-51	99.70 $\pm$ 0.4	86.61 $\pm$ 1.2	58.68 $\pm$ 8.6
L46-H75	99.73 $\pm$ 0.6	76.34 $\pm$ 10.3	56.50 $\pm$ 11.2
$\bar{x}$	99.92 $\pm$ 0.2	76.69 $\pm$ 8.9	46.68 $\pm$ 7.3

Los clones evaluados presentaron una viabilidad inicial alta. Por medio de las pruebas de germinación in vitro los clones L49-H98, L29-H04, L21-H43, L46-H88, CCN-51, obtuvieron el mayor porcentaje (81 y 86 %) mientras los clones obtuvieron el menor porcentaje de granos de polen germinados fueron L26-H64, L18-H58 (56 y 69 %). Por medio de la evaluación in vivo los clones con mayor porcentaje L11-H19, L46-H88, L46-75, CCN-51 (49 y 58 %) mientras que los clones con porcentajes más bajos de granos de polen germinados L26-H64, L46-H57, L49-H98 (40 y 41 %). Utilizando el método de tinción se obtuvo resultados entre 99 y 100 % de viabilidad del polen para todos los clones (Cuadro 4).

**Fig. 1.** Correlación entre la germinación in vivo y germinación in vitro y tinción, del polen de *Theobroma cacao*.

**Fig. 1.** Correlation between in vivo germination and in vitro germination and staining of *Theobroma cacao* pollen.

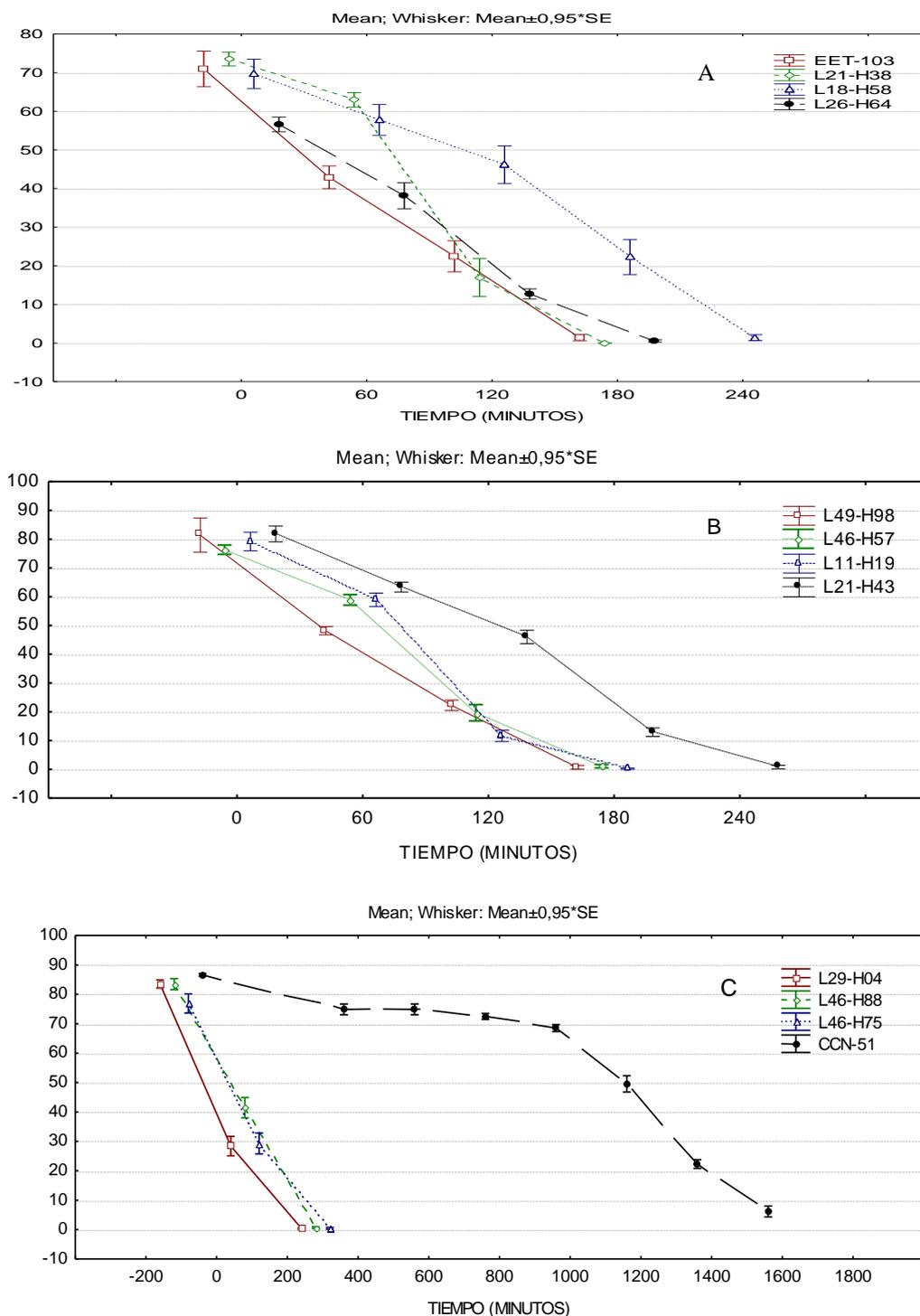


Se calculó una correlación positiva directa ( $r = 0.5$ ) entre la germinación in vitro e in vivo, mientras la correlación calculada para la viabilidad por tinción y germinabilidad in vivo fue muy baja ( $r = 0.01$ ) (Fig. 1).

Los 11 clones de *T. cacao* Tipo Nacional presentan un porcentaje de viabilidad inicial entre 70 y 83 %, evidenciándose que la mayor pérdida de viabilidad ocurrió al transcurrir los 120 minutos, en donde su capacidad germinativa disminuyó en un 60 % en la mayoría de las pruebas realizadas con el polen de los 11 clones Nacionales evaluados, los cuales la mayoría de ellos llegan a perder rápidamente la viabilidad a los 180 minutos, sin embargo se pudo conocer que hubo clones en los que la viabilidad del polen se perdió completamente a los 240 minutos (Fig. 3. A-B). No obstante el clon CCN-51 fue el único que alcanzó una longevidad mucho más prolongada, siendo este clon el único que superó las 24 horas de vida (Fig. 2. C).

**Fig. 2.** Longevidad del polen de 11 clones de *Theobroma cacao* Tipo Nacional y el clon CCN51 Tipo Trinitario. A = (EET103)-(L21-H38)-(L18-H58)-(L26-H64), B = (L49-H98)-(L46-H57)-(L11-H19)-(L21-H43), C = (L29-H04)-(L46-H88)-(L46-H75)-(CCN-51)

**Fig. 2.** Pollen longevity of 11 clones of *Theobroma cacao* National type and the clone CCN51 Trinitario type. A = (EET103)-(L21-H38)-(L18-H58)-(L26-H64), B = (L49-H98)-(L46-H57)-(L11-H19)-(L21-H43), C = (L29-H04)-(L46-H88)-(L46-H75)-(CCN-51)



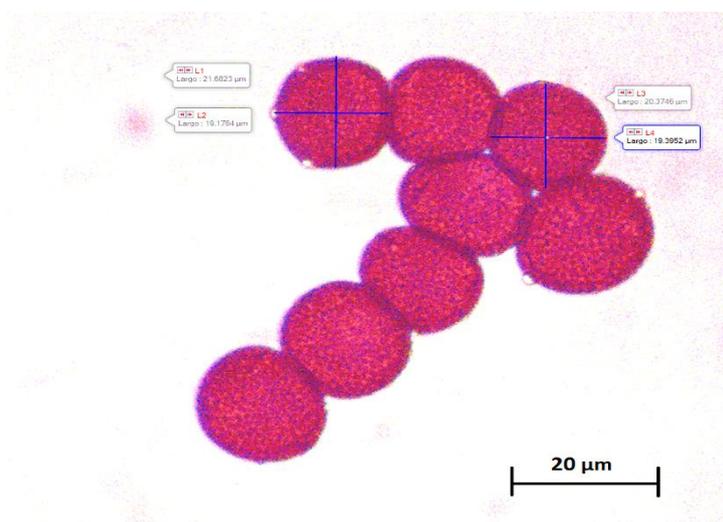
**Cuadro 5.** Tamaño de granos de polen ( $\mu\text{m}$ ) 11 clones de *Theobroma cacao* Tipo Nacional y el clon CCN51 Tipo Trinitario. De presentan valores máximos y mínimos de lado 1.

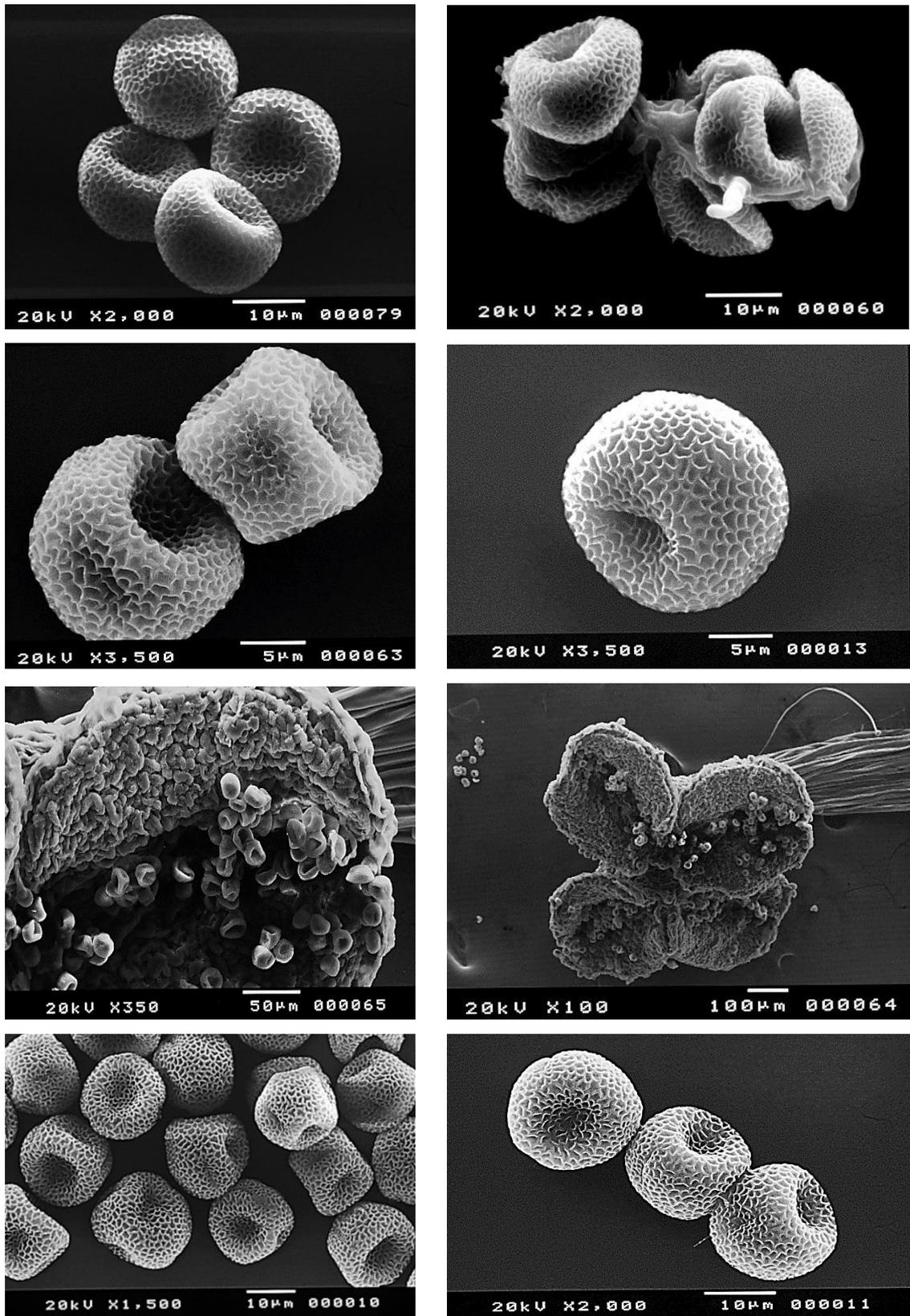
**Cuadro 5.** Size of pollen grains ( $\mu\text{m}$ ) 11 clones of *Theobroma cacao* National Type and clone CCN51 Trinitario type. Of present maximum and minimum values of side 1.

CLONES	$\bar{x}$ LADO 1	$\bar{x}$ LADO 2	L1/L2	Forma	MAX	MIN
L21-H38	21.42 $\pm$ 4.2	21.46 $\pm$ 3.8	1.00	esferoidal	31.72	15.20
L26-H64	18.75 $\pm$ 2.3	17.93 $\pm$ 1.3	1.05	esferoidal	25.73	10.03
EET-103	17.95 $\pm$ 1.9	17.49 $\pm$ 1.8	1.03	esferoidal	21.75	18.61
L49-H98	17.58 $\pm$ 0.8	16.91 $\pm$ 1.1	1.04	esferoidal	19.74	15.35
L18-H58	21.69 $\pm$ 3.0	19.59 $\pm$ 2.6	1.11	esferoidal	29.12	15.31
L46-H57	18.12 $\pm$ 1.1	17.44 $\pm$ 1.3	1.04	esferoidal	21.24	15.52
L11-H19	20.76 $\pm$ 1.3	20.06 $\pm$ 0.9	1.03	esferoidal	22.88	15.03
L29-H04	19.09 $\pm$ 0.9	18.18 $\pm$ 0.9	1.05	esferoidal	20.66	16.93
L46-H88	18.48 $\pm$ 0.7	17.40 $\pm$ 0.9	1.06	esferoidal	20.17	16.55
L46-H75	18.44 $\pm$ 0.8	17.37 $\pm$ 0.9	1.06	esferoidal	20.80	17.16
L21-H43	18.39 $\pm$ 0.7	17.08 $\pm$ 0.7	1.08	esferoidal	19.94	16.92
CCN-51	17.26 $\pm$ 0.6	16.44 $\pm$ 0.6	1.05	esferoidal	18.67	16.38
$\bar{x}$	19.00 $\pm$ 1.5	18.12 $\pm$ 1.4	1.05	esferoidal	22.70	14.78

El polen de *Theobroma cacao* es de forma esferoidal, apolar, radiosimétrico, de tamaño pequeño que oscila entre 15 a 32  $\mu\text{m}$ , un promedio de 19  $\mu\text{m}$ . Hay diferencia significativa en el tamaño del polen en los clones evaluados; los clones L21-H38 y L18-H58 presentaron polen de mayor tamaño y el clon CCN-51 polen más pequeño (Cuadro 5, Fig. 3 y 4).

**Fig. 3.** Medición del polen de *Theobroma cacao* mediante el software Motic Images plus 3.0  
**Fig. 3.** Measuring pollen from *Theobroma cacao* using the Motic Images plus 3.0 software.





**Fig. 4.** Microfotografías de granos de polen de *Theobroma cacao* en Microscopio Electronico de Barrido.

**Fig. 4.** Microphotographs of pollen grains of *Theobroma cacao* in Scanning Electron Microscope.

## DISCUSIÓN

El medio idóneo para evaluar la germinabilidad del polen de *T. cacao* está constituido por 8 % sacarosa y 0.7 % de agar, lo cual coincide con lo que menciona Suárez (2009) que las diferencias en la capacidad germinativa del polen se relacionan especialmente con la composición química del medio y sostiene que lo primordial es el agar (esencial para el desarrollo germinativo) y la sacarosa (esencial para el rol osmótico y elongación del tubo polínico), presentando buenos resultados en diversas especies, cuando el agar está por debajo del 2 % y la sacarosa por debajo del 10 %. Así mismo Varas (1961) e Hilo *et al.*, (2015) determinaron que los azúcares en el medio de cultivo cumplen un rol en la regulación de la concentración osmótica durante la germinación de los granos de polen; además sirve como material nutriente para el crecimiento de los tubos polínicos, reportando que en medios con menos del 10 % de sacarosa hay una germinación más acelerada del polen y por ende un mayor desarrollo de sus tubos polínicos.

Así mismo las concentraciones bajas de agar tienen un efecto significativo en el medio, logrando una humedad adecuada en el mismo, permitiendo una alta tasa germinativa. Demostrando que al disminuir las concentraciones de agar dentro de la composición del medio se favorece a crear un estado idóneo que aumenta la germinabilidad y desarrollo de los granos de polen, permitiendo obtener una germinación inicial elevada (Stanley & Linskens, 1974).

El polen de *T. cacao* posee una alta capacidad germinativa, respondiendo de manera efectiva en los medios evaluados. Anteriormente, ya se presentaron evidencias de la alta germinabilidad del polen, por encima del 70 % utilizando medio de cultivo constituido por sacarosa (16 %), ácido bórico (0.01 %), agar (0.4 %) (Esteves *et al.*, 2009). Según menciona García *et al* (2015) en programas de mejoramiento genético es importante conocer la viabilidad inicial del polen y la forma idónea de evaluarla, ya que no es recomendable utilizar polen de individuos que presenten baja viabilidad polínica. En este caso, los genotipos evaluados presentaron alta germinabilidad por lo cual es factible su utilización como donadores de polen en planes de cruzamiento controlado.

Se observó que los granos de polen de *T. cacao* se mantienen aglutinados al colocarlos en el medio, formando tubos polínicos de hasta 19  $\mu\text{m}$  a los 30 minutos de evaluación.

Según Brewbaker & Kwack (1963) al no existir una buena distribución de los granos de polen sobre el medio se produce un efecto de estimulación mutua en la germinación de los mismos, provocando una competencia progresiva por el desarrollo de los tubos polínicos. Las alteraciones en el crecimiento del tubo polínico van a estar mediados por la cantidad y densidad del polen, ya que este al poseer un tamaño muy pequeño y consistencia pegajosa formará agrupaciones en las cuales se va a dificultar su conteo y/o desarrollo del tubo polínico (Enríquez, 1985).

En las pruebas realizadas con el polen de *T. cacao* usando el método de tinción de Alexander (malaquita verde + ácido fucsina) se obtuvieron resultados de 99 – 100 % de granos de polen viables, tiñéndose de color violeta oscuro aquellos que resultaron viables, mientras que los granos de polen no viables se tiñeron de un color violeta opaco. Diversos estudios de viabilidad del polen, utilizando la tinción de Alexander en diversas especies, demostraron que existe una estimación general entre 98 – 100 % de granos de polen viables (Coelho *et al.*, 2012). Así mismo los resultados son similares para diversas especies (Techio *et al.*, 2006). Otros autores han evidenciado que los resultados obtenidos a través de métodos de tinción no se relacionan con la capacidad o vigor para germinar que posea el grano de polen. Aunque tomando en cuenta el uso práctico que poseen estos métodos, incluido el de tinción de Alexander, es posible recomendarlos para futuros trabajos, mediante la elaboración de cartillas donde se relacione el color de los granos de polen con su porcentaje germinativo (García *et al.*, 2015). No hay una descripción de una prueba universal de viabilidad del polen que utilice una tintura definida, debido al modo de acción específico de cada tinción en la estructura citológica de los granos de polen (Arenas *et al.*, 2016).

El polen se puede dividir en 3 grupos según la longevidad: polen de larga duración, polen con una vida media y polen de vida corta, según lo cual *T. cacao* tiene polen con vida corta, con una duración de unos minutos (Tipo Nacional) hasta 2 días (CCN51). Varios trabajos han evidenciado que la vida útil del polen está determinada principalmente por el genoma de la planta, pero también está influenciado por condiciones tanto internas como externas en las que se encuentren. (Simmonds, 1972).

Las limitaciones fisiológicas y/o ambientales son un factor que cumple un papel importante en la capacidad germinativa del polen, ya que al momento de realizar las pruebas *in vitro*, se pueden llegar a obtener resultados erróneos si no se toman en cuenta

dichas condiciones ambientales en las que se encuentre el cultivo (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 2009). Por lo cual se determina que el grano de polen de *T. cacao* pierde progresivamente su capacidad germinativa, según el contenido de humedad y temperatura durante el almacenamiento, de igual manera depende de las características propias de la especie y genotipos evaluados (26.64 °C y 62.28 % HR).

Se calculó una moderada correlación entre la germinación in vitro e in vivo ( $r = 0.5$ ,  $p = 0.12$ ) del polen de *T. cacao*, lo cual coincide con lo descrito por Stanley & Linskens (1974) y García *et al* (2015) quienes mencionan que existe una alta correlación entre la germinación in vitro e in vivo de granos de polen. Sin embargo, se observa que la capacidad germinativa no depende estrictamente de la viabilidad del polen, sino también del estado nutricional de la planta madre y las condiciones ambientales en las que se encuentre, dando a conocer que al existir alteraciones por medio de dichos factores, va a dar paso a una cadena de sucesos fisiológicos que poco a poco desmejoran la calidad del polen y por ende reducen su viabilidad y longevidad.

Los granos de polen de diferentes individuos de *T. cacao* miden en promedio 19  $\mu\text{m}$  ( $\pm 1.5$ ). De acuerdo a la escala propuesta por Erdtman (1952) son de tamaño pequeño. Lo cual coincide con Enríquez (1985) quien mencionó que el polen de *T. cacao* es muy pequeño y posee una forma esférica y pegajosa, debido a estas características se agrupan en forma de conglomerados juntándose varios cientos de miles de granos de polen, que en condiciones naturales es transportado en el cuerpo de insectos del género *Forcipomya* y en algunos Tripsidos del género *Frankiniella*, para realizar la fecundación de forma natural. Dichas características concuerdan con lo mencionado por (Shivanna, 2003) que el polen de flores entomófilas poseen estambres bien expuestos y anteras suspendidas a lo largo de los filamentos, teniendo la capacidad de producir una enorme cantidad de polen, a lo cual los insectos polinizadores responden de manera versátil, transportando una gran cantidad adherido a las cerdas de sus patas. Demostrando que en *T. cacao* la polinización por medios entomófilos es muy alta y eficiente debido a la gran cantidad de insectos polinizadores que posee esta especie.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública-INSPI, Ecuador, por el apoyo en la captura de las fotografías en microscopio electrónico de barrido.

## BIBLIOGRAFIA

- Arenas, M., Bandini, A., Lemos, T., Farias, G., & Machado, S. (2016). Stigmatig receptivity and pollen viability of *Theobroma subincanum* Mart.: fruit species from THE AMAZON REGION. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38(4).  
<https://doi.org/10.1590/0100-29452016757>
- Brewbaker, J. L., & Kwack, B. H. (1963). the Essential Role of Calcium Ion in Pollen Germination and Pollen Tube Growth1 , 2. *American Journal of Botany*, 50(9), 859–865. <https://doi.org/10.2307/2439772>
- Coelho, A., Morais, K., Laughinghouse, D., Sandro, J., Giacomini, Tedesco, & Solange, B. (2012). Pollen grain viability in accessions of *Crotalaria juncea* L. (fabaceae). *Agrociencia*, 46(5), 481–487.
- Enríquez, G. A. (1985). *Curso sobre el cultivo de cacao*. Turrialba, Costa Rica.
- Erdtman, G. (1952). *Pollen morphology and plant taxonomy: Angiosperms*. (M. Waltham, Ed.) (2nd ed.). Stockholm, Sweden.
- Esteves, P., Magalhães, M., Amaral, F., Ramos, P., Santos, I., & Ahnert, D. (2009). Performance polínica em cacauzeiros ( *Theobroma cacao* L .) autocompatíveis e autoincompatíveis. *Scientific note/Nota Científica*, 32(3), 617–620.  
<https://doi.org/10.1590/S0100-84042009000300019>
- Falque, M., Sounigo, O., Eskes, A., & Charrier, A. (1993). Effect of cacao (*Theobroma cacao* L.) pollen gamma-irradiation on pollen viability, germination, mitosis and fruit set. *Reproductive Biology and Plant Breeding: Book of Posters and Abstracts. EUCARPIA, Wageningen, Netherlands, 159-160*, 167–168.
- García, J., Rejón, C., Ramires, J., Alché, A., & Rodríguez, M. (2012). Evaluación de diferentes métodos para estimar la calidad del polen en distintos cultivares de olivo (*Olea Europaea* L.). *Polen*, 20(0), 60–72.  
<https://doi.org/10.14201/POL.V20I0.8921>
- García, L., Rivero, M., & Droppelmann, F. (2015). Descripción morfológica y

- viabilidad del polen de *Nothofagus nervosa* (Nothofagaceae). *Bosque (Valdivia)*, 36(3), 487–496. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002015000300015>
- Heslop-Harrison, J., & Heslop-Harrison, Y. (2009). Evaluation of Pollen Viability by Enzymatically Induced Fluorescence; Intracellular Hydrolysis of Fluorescein Diacetate. *Stain Technology*, 45:3, 115–120. <https://doi.org/10.3109/10520297009085351>
- Hilo, E., Duarte, F. V., Lanzoni, M., Brancalleão, N., da Silva Ledo, C. A., & Pinheiro, A. (2015). Viability, storage and ultrastructure analysis of *Aechmea bicolor* (Bromeliaceae) pollen grains, an endemic species to the Atlantic forest. *Euphytica*, 204(1), 13–28. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1273-3>
- Mena, M. &, & García, L. (2014). Eficiencia reproductiva y receptividad estigmática en clones de cacao ( *Theobroma cacao* L .) en la zona central del Litoral Reproductive efficiency and stigmatic receptivity in cocoa clones ( *Theobroma cacao* L .) in the central area of the Ecuadorian coas. *Magap*, 1, 1–10.
- Pérez, G. (2014). *Plan de negocios para la exportación de cacao producido en la región 7 (Loja, Zamora y El Oro)*. Tesis. Universidad de Cuenca.
- Polania, H. (1953). Germinacion del polen de cacao, crecimiento del tubo polinico y cuajamiento: Sus relaciones con el sombrío, el pH del estigma, estados del árbol, III.
- Rangel, M., Zavaleta, H., Córdova, L., López, A., Delgado, A., Vidales, I., & Villegas, A. (2012). Anatomy and histochemistry of the mexican cacao (*Theobroma cacao* L.) Seed | Anatomía e histoquímica de la semilla del cacao (*Theobroma cacao* L.) criollo mexicano. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(3).
- Shivanna, K. R. (2003). *Pollen Biology and Biotechnology*. Enfield, USA: Science Publishers, Inc.
- Simmonds, N. (1972). Genetic Resources in Plants: Their Exploration and Conservation. *Experimental Agriculture*, 8:1, 554. <https://doi.org/10.1017/S0014479700023553>

- Stanley, R., & Linskens, H. (1974). *Pollen: Biology Biochemistry Management* (1st ed.). New York. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-65905-8>
- Stecconi, M., Marchelli, P., Puntieri, J., Picca, P., & Gallo, L. (2004). Natural hybridization between a deciduous (*Nothofagus antarctica*, Nothofagaceae) and an evergreen (*N. dombeyi*) forest tree species: Evidence from morphological and isoenzymatic traits. *Annals of Botany*, *94*(6), 775–786. <https://doi.org/10.1093/aob/mch205>
- Suárez, C. (2009). *Caracterización Estructural e Histoquímica del Pistilo durante la fase progámica e implicación de pectinas y AGPs en las interacciones polen-pistilo en el olivo*. (E. de la U. de Granada, Ed.), *Doctor* (1st ed.). Granada.
- Techio, V. H., Davide, L. C., Ângela, C., & Vander, A. (2006). Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim - elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim - elefante X milho). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, *28*(1679–9283), 7–12.
- Varas, J. (1961). *Factores que afectan la germinación del polen de cacao (Theobroma cacao) in vitro*. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA.
- Villalon, J. M. M. (2008). Determinación de la viabilidad en la carga polínica de insectos, que visitan flores de avellano chileno (*Gevuina avellana* Mol.). *In Vitro*, *3*, 1–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.myaccess.library.utoronto.ca/pubmed/11720961>

