



# **UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**

## **UNIDAD DE POSGRADO**

### **MAESTRÍA EN MANEJO Y APROVECHAMIENTO FORESTAL**

Tesis previa la obtención del Grado Académico de Magíster en Manejo y Aprovechamiento Forestal.

#### **TEMA**

EFECTO DE LA TEMPERATURA Y SECADO EN LA VIABILIDAD DE POLEN ALMACENADO DE *Ochroma pyramidale* (Cav. Ex Lamb) (BALSA). AÑO 2015. PLAN DE MEJORAMIENTO.

#### **AUTORA**

Ing. For. IVONNE ROCÍO JALCA ZAMBRANO

#### **DIRECTORA**

Dra. C. LUZ CECILIA GARCIA CRUZATTY.

**QUEVEDO – ECUADOR**

**2015**





# **UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**

## **UNIDAD DE POSGRADO**

### **MAESTRÍA EN MANEJO Y APROVECHAMIENTO FORESTAL**

Tesis previa la obtención del Grado Académico de Magíster en Manejo y Aprovechamiento Forestal.

#### **TEMA**

EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y SECADO EN LA VIABILIDAD DE POLEN ALMACENADO DE *Ochroma pyramidale* (Cav. Ex Lamb) (BALSA). AÑO 2015. PLAN DE MEJORAMIENTO.

#### **AUTORA**

Ing. For. IVONNE ROCÍO JALCA ZAMBRANO

#### **DIRECTORA**

Dra. C. LUZ CECILIA GARCÍA CRUZATTY

**QUEVEDO – ECUADOR**

**2015**

Dra. C. LUZ CECILIA GARCÍA CRUZATTY, Directora de la Tesis previa la obtención del Grado Académico de **Magíster en Manejo y Aprovechamiento Forestal**.

**CERTIFICA:**

Que la Ingeniera **Ivonne Rocío Jalca Zambrano**, ha cumplido con la elaboración de la Tesis titulada **“EFECTO DE LA TEMPERATURA Y SECADO EN LA VIABILIDAD DE POLEN ALMACENADO DE *Ochroma pyramidale* (CAV. EX LAMB) (BALSA). AÑO 2015. PROPUESTA DE PLAN DE MEJORAMIENTO”**, la misma que esta está apta para la presentación y sustentación respectiva.

---

**Dra. C. Luz Cecilia García Cruzatty**

**DIRECTORA**

## **AUTORÍA**

Yo, Ing. Ivonne Jalca

DECLARO QUE:

:

La Tesis titulada **“EFECTO DE LA TEMPERATURA Y SECADO EN LA VIABILIDAD DE POLEN ALMACENADO DE *Ochroma pyramidale* (CAV. EX LAMB) (BALSA). AÑO 2015. PROPUESTA DE PLAN DE MEJORAMIENTO”** previa a la obtención del Grado Académico de Magíster en Manejo y Aprovechamiento Forestal, fue realizada a través de una investigación honesta, acatando las normas de los derechos intelectuales, por lo cual este trabajo corresponde a mi total autoría, responsabilizándome de su autenticidad, y contenido científico y total de la tesis del Grado Académico en mención.

---

**Ing. Ivonne Rocío Jalca Zambrano.**

## DEDICATORIA

A mi gran amor Mateo Alejandro, mi razón de vivir, mi fortaleza, mi coraje, a ti hijo amado que haces que tu sonrisa ilumine mi vida, tu ternura sea mi pan de vida, tu amor libere mi mente de todas las adversidades que se presentan y tus “te amo mamá” me den la felicidad más grande de este mundo.

A mi ejemplo de vida, a ti madre amada, luchadora e invencible ante mis ojos, durante el desarrollo de mi vida y cada día vivido contigo me das ejemplo de vida y fortaleza. Demostrándome que aunque tus pies ya no puedan avanzar tu fortaleza hace que ellos avancen cada día, porque aún tienes mucho camino por hacer para que nosotros tus hijos sigamos tus pasos de amor y bien con los demás.

A ti padre amado, que te has convertido en mi mejor amigo, quién con tus pasos un poco lento sigues detrás de mí para protegerme, e inventas cosas para sacarme muchas sonrisas, quién cree en mis sueños y los apoyas.

A mi hermana Vanessa a quién amo mucho, más que una hermana es mi mejor amiga quién siempre ha estado incondicionalmente, quién ha dado amor de madre a mi hijo, quién se ha desvelado desde su nacimiento hasta la actualidad para poder superarme profesionalmente y culminar esta meta. A ti hermana porque nacimos de la mejor raíz de una bella flor y a pesar de estar distante y dirigirnos en diferente dirección, nuestro punto de nacimiento nos mantendrá siempre unidas con el mejor de los lazos “el lazo del amor”

A mis hermanos Christian, David, Mayra y Paola por sus palabras de apoyo y su amor de hermanos.

**Ivonne**

## AGRADECIMIENTO

La autora deja en constancia sus más sinceros agradecimientos a:

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo Alma Máter formadora de grandes profesionales para el país, a la Unidad de Posgrado y a la Facultad de Ciencias Ambientales, especialmente al:

- Ing. Roque Vivas Moreira, Director de la Unidad de Posgrado de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.
- Eco. Carlos Zambrano Ph. D Coordinador del Programa de la Maestría en Manejo y Aprovechamiento Forestal.
- Ing. For. Luz Cecilia García Cruzatty Ph. D. Directora de Tesis.
- Ing. Elías Cuásquer Fuel M. Sc. Decano de la Facultad de Ciencias Ambientales.

La empresa 3A Composites & Plantabal S.A. por haberme dado la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis en el Departamento de Investigación y Desarrollo, y ser parte de una experiencia gratificante a través de un grandioso equipo de trabajo conformado por: Bernardo Castro, Diana Sánchez, Francisco Vera, Luis Cedeño, Marcos Ortega, Marcelino Guachambala y Wilmer Zambrano, quienes me acogieron con cariño y amor compartiendo conocimientos y experiencias inolvidables.

A mis compañeros de maestría Héctor Gomezcoello, Levin Zambrano, María Gallardo, Miriam Mata y Norberto Mite por compartir sus esfuerzos y aportes en

los trabajos grupales durante el desarrollo de la maestría y sembrar una verdadera amistad.

A mi hermano David por las noches de desvelo apoyándome hombro a hombro en la fase de laboratorio, gracias hermano tu apoyo fue esencial.

A mis amigas Jessenia Castro, Eva Briones y Martha Nájera por los momentos vividos, sus ánimos constantes, sus consejos y su cariño.

A todas aquellas personas que con un o miles de granitos de arena contribuyeron a mi perseverancia necesaria para la culminación de este estudio.

*“Porque el ser humano vive en comunidad y nadie es insignificante e innecesario en el ciclo de vida de una persona”*

## PRÓLOGO

Los estudios sobre viabilidad de polen han permitido el conocimiento de la biología, fisiología y otros aspectos de interés sobre el polen de muchas especies, Albert (1930). Estos logros han ayudado a manejar y optimizar las polinizaciones dirigidas de los programas de mejora y enfermedades, entre otros caracteres de alta importancia económica.

Los productos maderables procesados que se obtienen de *Ochroma pyramidale* en el país son de alta calidad de exportación, lo que nos ha venido dando un reconocimiento como el primer país exportador de madera de *O. pyramidale* a nivel mundial (PROECUADOR 2014).

Actualmente las plantaciones comerciales tienen pérdidas en producciones de madera de buena calidad a causa de la incidencia de enfermedades y ataques de insectos plagas. Bajo este contexto forestal nacional es necesario emprender planes de mejoramiento genético que usen el potencial biodiverso de *O. pyramidale* en la búsqueda de caracteres deseados que potencialicen el aprovechamiento de esta madera.

Plantabal S.A. & 3A Composites- Baltex Ecuador, es la única empresa que cuenta con un robusto programa de mejoramiento genético en balsa, que incluye ensayos de progenies, rodales y huertos productividad y calidad de madera. La conservación del polen de *O. pyramidale* realizada en esta investigación aportará a los conocimientos de la biología reproductiva de esta especie y será una herramienta útil para la realización del programa de cruces dirigidas.

Marcelino S. Guachambala C. M. Sc.

Gerente de Investigación y Desarrollo PLANTABAL S.A.

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en las plantaciones de la empresa Plantabal S.A. en la hacienda Madera Seca 14, ubicada en el cantón El Empalme, sector Los Bancos, de coordenadas  $1^{\circ} 2'57.43''$  latitud Sur y  $79^{\circ} 35'33.22''$  latitud Oeste, con un área de 1,5 ha, con una muestra de 10 árboles. El objetivo general fue evaluar el efecto de temperatura y secado en la viabilidad de polen almacenado de *O. pyramidale*, y realizar una propuesta de plan de mejoramiento genético mediante la técnica de la polinización dirigida. Se determinó el medio idóneo para la evaluación de la viabilidad mediante germinación in vitro, probando variantes del medio de Brewbaker y Kwack (1963). El mejor medio para medir la viabilidad inicial y post almacenamiento fue: 10 % de sucrosa,  $30 \text{ mgL}^{-1}$  ácido bórico,  $430 \text{ mgL}^{-1}$  nitrato de calcio. El contenido de humedad del polen fresco de *O. pyramidale* calculado por métodos termogravimétricos fue de 49.80 % con respecto a su peso. La viabilidad inicial del polen fue de 65.62 %. El secado del polen se realizó en cámara climática a  $29^{\circ}\text{C}$  y 45 % de humedad relativa (HR) a diferentes tiempos (60, 120, 180 y 240 minutos) la viabilidad del polen disminuyó gradualmente a medida que se incrementó el tiempo de secado, lo que causó una pérdida de 6.04 % en la germinación del polen de *O. pyramidale* secados durante 240 minutos. Las muestras fueron sometidas 60', 120', 180' y 240' de secado y almacenadas a  $5^{\circ}$  (refrigeración),  $-20^{\circ}\text{C}$  (congelación), y  $-196^{\circ}\text{C}$  (crio conservación) en tubos eppendorf durante 45 días. La temperatura y el contenido de humedad óptimos para el almacenamiento del polen de *O. pyramidale* fue a  $-196^{\circ}\text{C}$  y 4.46 % respectivamente.

## ABSTRACT

This research was conducted in the plantations of the company Plantabal S.A. in Madera Seca 14 hacienda, located in the village of El Empalme, industry Banks, coordinate 1st 2'57.43" south latitude and 79 ° West longitude 35'33.22", with an area of 1.5 ha, a sample of 10 trees. The overall objective was to evaluate the effect of temperature and drying on the viability of *O. pyramidale* stored pollen, and make a proposal for a plan of genetic improvement through technical pollination directed. the best means of assessing the viability was determined by in vitro germination testing variants medium and Kwack Brewbaker (1963). The best way to measure the initial and post-storage viability was 10% sucrose, 30 mg L<sup>-1</sup> boric acid, 430 mg L<sup>-1</sup> calcium nitrate. The moisture content of fresh pollen *O. pyramidale* was calculated by thermogravimetric methods of 49.80% relative to its weight. The initial pollen viability was 65.62%. Pollen drying was performed in a climatic chamber at 29 ° C and 45% relative humidity (RH) for different times (60, 120, 180 and 240 minutes) pollen viability decreased gradually as the drying time increased , causing loss of 6.04% in pollen germination of *O. pyramidale* dried for 240 minutes. The samples were subjected 60', 120', 240' 180'y drying and stored at 5 ° (cooling), -20 ° C (freezing) and 196 ° C (cryo conservation) in eppendorf tubes for 45 days. The temperature and moisture content for optimal storage *O. pyramidale* pollen was at -196 ° C and 4.46% respectively.

## ÍNDICE

PORTADA.....	
HOJA EN BLANCO.....	i
COPIA DE LA PORTADA.....	ii
CERTIFICA: .....	IV
AUTORÍA .....	V
DEDICATORIA.....	VI
AGRADECIMIENTO.....	VII
PRÓLOGO .....	IX
RESUMEN .....	X
ABSTRACT .....	XI
ÍNDICE .....	XII
ÍNDICE DE CUADROS .....	XV
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XVI
INTRODUCCIÓN .....	XVII
CAPÍTULO I. MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN.....	1
1.1 UBICACIÓN Y CONTEXTUALIZACIÓN DE LA PROBLEMÁTICA .....	2
1.2 SITUACIÓN ACTUAL DE LA PROBLEMÁTICA .....	3
1.3 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	4
1.3.1 Problema general.....	4
1.3.2 Problemas Derivados.....	4
1.4 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA.....	5
1.5 OBJETIVOS .....	6
1.5.1 Objetivo general.....	6
1.5.2 Objetivos específicos .....	6
1.6 JUSTIFICACIÓN .....	7
1.7 CAMBIOS ESPERADOS CON LA INVESTIGACIÓN.....	8
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN.....	9
2.1 FUNDAMENTACIÓN CONCEPTUAL.....	10
2.2 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA .....	11
2.2.1 Descripción de la especie.....	11
2.2.2 Polen.....	13
2.2.3 Germinación y viabilidad del polen .....	16
2.2.4 Almacenamiento de polen .....	18
2.2.5 Factores que afectan a la viabilidad del polen en el almacenamiento.....	20

2.2.6	Algunas evaluaciones de germinación <i>in vitro</i> y viabilidad de polen.....	24
2.2.7	Algunas evaluaciones de los efectos de temperatura y secado en la viabilidad de polen almacenado.....	26
2.3	FUNDAMENTACIÓN LEGAL.....	28
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....		31
3.1	TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	32
3.2	MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN.....	33
3.2.1	Recolección de flores.....	33
3.2.2	Extracción del polen.....	34
3.2.3	Cálculo de germinación.....	35
3.2.4	Determinación del contenido de humedad y secado del polen.....	36
3.2.5	Almacenamiento del polen.....	37
3.2.6	Evaluación de la viabilidad del polen almacenado.....	37
3.3	CONSTRUCCIÓN DEL OBJETO DE INVESTIGACIÓN.....	38
3.3.1	Variables evaluadas.....	38
3.4	ELABORACIÓN DEL MARCO TEÓRICO.....	39
3.5	RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN EMPÍRICA.....	39
3.6	DESCRIPCIÓN DE LA INFORMACIÓN OBTENIDA.....	40
3.7	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	40
3.8	CONSTRUCCIÓN DEL INFORME DE LA INVESTIGACIÓN.....	41
CAPÍTULO IV. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS EN RELACIÓN CON LA HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN.....		42
4.1	ENUNCIADO DE LA HIPÓTESIS.....	43
4.1.1	Variables.....	43
4.2	UBICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LA INFORMACIÓN EMPÍRICA PERTINENTE A LAS HIPÓTESIS.....	43
4.2.1	Determinación del medios idóneos para evaluar la viabilidad inicial y post almacenamiento del polen de <i>O. pyramidale</i> .....	43
4.2.2	Determinación del contenido de humedad del polen de <i>O. pyramidale</i> mediante métodos termogravimétricos.....	44
4.2.3	Viabilidad inicial y post almacenamiento de polen de <i>O. pyramidale</i> .....	45
4.2.4	Determinación de la temperatura y contenido de humedad adecuados para un óptimo almacenamiento de polen de <i>O. pyramidale</i> .....	46
4.3	DISCUSIÓN DE LA INFORMACIÓN EMPÍRICA PERTINENTE A LAS HIPÓTESIS.....	50
4.4	COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS.....	53
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		55

5.1 CONCLUSIONES .....	56
5.2 RECOMENDACIONES .....	57
CAPÍTULO VI. ....	58
PROPUESTA ALTERNATIVA .....	58
6.1 TÍTULO DE LA PROPUESTA. ....	59
6.2 JUSTIFICACIÓN .....	59
6.3 OBJETIVOS .....	60
6.3.1 Objetivo general.....	60
6.3.2 Objetivos específicos .....	60
6.4 IMPORTANCIA.....	60
6.5 UBICACIÓN SECTORIAL Y FÍSICA .....	61
6.6 FACTIBILIDAD .....	62
6.7 PLAN DE TRABAJO.....	62
6.8 ACTIVIDADES.....	65
6.9 RECURSOS ADMINISTRATIVOS, FINANCIEROS O TECNOLÓGICOS .....	67
6.10 IMPACTO .....	67
6.11 EVALUACIÓN .....	68
6.12 BIBLIOGRAFÍA.....	70
ANEXOS .....	76

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Extracción de polen de flores de <i>O. pyramidale</i> colectadas durante el año 2015 .....	34
Cuadro 2. Determinación del medio idóneo en la viabilidad de polen de <i>O. pyramidale</i> .....	44
Cuadro 3. Cálculo de contenido total de humedad (CH) en base del peso fresco .....	44
Cuadro 4. Contenido de humedad perdido después de tratamientos de secado en polen de <i>O. pyramidale</i> .....	45
Cuadro 5. Efecto del secado en la viabilidad del polen de <i>O. pyramidale</i> .....	45
Cuadro 6. Viabilidad del polen de <i>O. pyramidale</i> post el almacenamiento .....	46
Cuadro 7. Efecto de la temperatura y contenido de humedad en la viabilidad del polen almacenado de <i>O. pyramidale</i> .....	47
Cuadro 8. Medias del polen de <i>O. pyramidale</i> almacenado a diferentes temperatura y contenido de humedad, durante un lapso de 45 días	48
Cuadro 10. Plan de trabajo de la propuesta del plan de mejoramiento genético para <i>O. pyramidale</i> .....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución natural de la balsa, <i>Ochroma pyramidale</i> , en el geotrópico. Fuente: Francis K., 1991. ....	12
Figura 2. Factores que afectan a la viabilidad del polen (esquema modificado a partir de Dafni y Firmage, 2000).....	21
Figura 3. Proceso de aclimatación y rehidratación del polen almacenado de <i>O. pyramidale</i> .....	38
Figura 4. Viabilidad del polen de <i>Ochroma pyramidale</i> almacenado en diferentes condiciones de contenido de humedad y temperatura .	49
Figura 5. Viabilidad del polen de <i>Ochroma pyramidale</i> almacenado en diferentes condiciones de contenido de humedad y temperatura .	50

## INTRODUCCIÓN

Una de las principales características de los seres vivo es la facultad que tienen para reproducirse. Las angiospermas, comúnmente llamadas plantas con flores se reproducen sexualmente, siendo los granos de polen responsables de la producción de los gametos masculino que intervienen en la fecundación de los óvulos, para dar formación a la semilla. Por ende, el almacenamiento de los granos de polen es gran importancia en la preservación de germoplasma, ya que promueve el intercambio genético y mejoran los programas de mejoramiento genético (Hanna, 1994). Además, se considera una de las principales alternativas para la conservación de alelos, facilitando el cruzamiento dirigido entre individuos de interés (Ganesan *et al.* 1986).

*Ochroma pyramidale* es una especie nativa del Ecuador, de importancia comercial, por las exportaciones de su madera en los mercados internacionales, exportándose desde 1938 (Martínez 2012). El Ministerio de Relaciones Exteriores y PROECUADOR, mediante un análisis del mercado internacional en el año 2013, indicó que durante el período del 2007 – 2012 se exportaron 1.310,28 toneladas de madera lo que generó un ingreso al estado de 3,625.47 miles de dólares. La demanda en los mercados internacionales por la madera y productos de *O. pyramidale* crece, lo que genera la necesidad de mejorar la productividad de esta especie, y enfrentar diversos problemas como plagas y enfermedades que generan pérdidas de producción y económicas.

Carmona (2012), afirma que el modo de reproducción de una especie determina la estructura genética de sus poblaciones, define el éxito reproductivo natural y su potencial productivo. Sin embargo en el país no se han realizado estudios referentes a la biología del polen en especies forestales, lo que ha conllevado que la reproducción de *Ochroma pyramidale*. se la realice

por semillas de polinización abierta recolectadas en plantaciones. Por tal motivo, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la temperatura y el secado en la viabilidad del polen almacenado. Estos conocimientos permitirán realizar ensayos de progenie mediante la polinización dirigida y obtener semillas mejoradas, estableciendo plantaciones con mejor material genético que garantice una excelente producción de madera de *O. pyramidale*.

**CAPÍTULO I**  
**MARCO CONTEXTUAL DE LA**  
**INVESTIGACIÓN**

## 1.1 UBICACIÓN Y CONTEXTUALIZACIÓN DE LA PROBLEMÁTICA

*O. pyramidale* es una especie pionera que se encuentra de manera natural en la costa y amazonía ecuatoriana, Gonzales *et al.* (2010) realizaron un estudio en el año 2008 determinando que hasta esa fecha, el Ecuador contaba con 20.000 hectáreas de esta especie entre bosques naturales y plantaciones. Según este estudio, la propagación de la especie se realiza utilizando semillas; siendo las zonas de mayor producción: las provincias de Guayas, El Oro, Pichincha y Los Ríos. En esta última, las empresas privadas que manejan esta especie son; Plantabal. S.A., Inmahia y Balsaflex.

En el Ecuador el cultivo de *O. pyramidale* sigue siendo una excelente alternativa económica en el sector productivo, por lo que los programas de incentivos forestales por parte del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), siguen apoyando al establecimiento de plantaciones comerciales de *O. pyramidale* y otras especies en la región Costa y región Amazónica. A este incremento de miles de hectáreas de *O. pyramidale* que tiene actualmente el país, gracias al apoyo gubernamental, se suma las del sector privado. Esta excelente alternativa no escapa de tener sus desventajas cuando se trata del control fitosanitario de las plantaciones, pues los riesgos de pérdidas en la producción pueden ser altos por la presencia de enfermedades tales como; corazón de agua y muerte regresiva.

PLANTABAL S.A. ha sido una empresa líder en el mercado de la madera de *O. pyramidale* en el país, la misma que en el marco de un programa de mejoramiento genético, ha realizado avances en; selección de rodales semilleros, establecimientos de huertos semilleros, propagación asexual (clones), aportaciones de gran importancia para el manejo de esta especie.

El almacenamiento de polen de las especies forestales sin duda constituye un recurso imprescindible para la solución de problemas actuales y futuros del campo forestal y agrícola, ya que su conservación a través del tiempo mantendrá la variabilidad genética de las especies necesarias para la búsqueda de soluciones. Theilade (2007) indica que el almacenamiento de polen puede disminuir riesgo fitosanitarios ya que, es rara la transferencia por el polen de plagas y enfermedades a excepción de algunas enfermedades ocasionadas por virus, lo que permite la seguridad en el traslado e intercambio de germoplasma (Trujillo 2006).

## **1.2 SITUACIÓN ACTUAL DE LA PROBLEMÁTICA**

En la Costa Ecuatoriana la mayor parte de las plantaciones comerciales de *O. pyramidale* son manejadas por la empresa PLANTABAL S.A., que a pesar de cambiar de razón social, se ha mantenido por más de 70 años trabajando en el sector forestal balsero ecuatoriano, teniendo en la actualidad un patrimonio de 9.500 hectáreas. La producción de plantas, desde sus inicios hasta la actualidad, se realiza a partir de plantas producidas en viveros de la misma empresa. Corroborado por Gonzáles *et al.* (2010) en el año 2008, quienes manifiestan que el 98.84 % de los productores del *O. pyramidale* en el Ecuador usan semillas que son recolectadas en sus propias plantaciones u otras sin ningún criterio de selección de los árboles progenitores, lo que no garantiza el mejoramiento en plantaciones y un 53.50 % de los productores compran las plántulas en viveros tradicionales de la localidad, cuyos propietarios no certifican la calidad de las semillas ni su procedencia.

Actualmente existe un solo vivero tecnificado (REFOREI) que ofrece plantas de balsa y otras especies forestales de buena calidad y procedencia. En el país, no se han reportado oficialmente la existencia de fuentes semilleras seleccionadas o mejoradas de *O. pyramidale*, a excepción del rodal semillero

establecido a finales de los años ochenta, por Joe Kovach, con quince familias en el sitio El Vergel, para la empresa que actualmente es PLANTABAL S.A (Martínez 2012), y un huerto semillero en el cantón El Empalme perteneciente a la misma empresa. Sin embargo, las plantaciones comerciales de *O. pyramidale* a nivel de país siguen enfrentando de moderados a graves problemas de enfermedades y plagas; a pesar de los esfuerzos en investigación para controlar algunas enfermedades, pues no siempre se ha tenido el éxito esperado y aún se sigue teniendo pérdidas en la producción en muchas plantaciones de diferentes zonas del país.

### **1.3 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

#### **1.3.1 Problema general**

La pregunta a responder con la presente investigación es: ¿Cuáles son los efectos de temperatura y secado en la viabilidad de polen almacenado de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.)?

#### **1.3.2 Problemas Derivados**

¿Cuáles es la producción de polen por flor en *O. pyramidale*?

¿Cuáles serán los medios de cultivo para evaluar la viabilidad inicial y post almacenamiento de polen de *O. pyramidale* mediante germinación *in vitro*?

¿Cuál es el contenido de humedad del polen fresco de *O. pyramidale*, mediante métodos termogravimétricos?

¿Cuáles son los procedimientos y parámetros óptimos de temperatura y contenido de humedad que requiere el polen de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb., para un buen almacenamiento a mediano plazo?

#### 1.4 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

**CAMPO** : CIENCIAS FORESTALES  
**ÁREA** : BIOLOGÍA  
**ASPECTO** : MANEJO DE POLEN DE *O. pyramidale* PARA SU ALMACENAMIENTO A MEDIANO PLAZO  
**SECTOR** : EI EMPALME  
**TIEMPO** : JULIO A DICIEMBRE DEL 2015

Las flores recolectadas para la extracción del polen almacenado fueron del huerto semillero, establecido en la hacienda “Madera Seca 14” (MS14), ubicada en el cantón El Empalme, sector Los Bancos, de coordenadas 1° 2’57.43’’ latitud Sur y 79° 35’33.22’’ latitud Oeste, con un área de 1,5 ha, con una muestra de 10 árboles. La floración estuvo limitada por las condiciones climáticas anormales, provocando retraso y disminución de la misma.

El talento humano necesario para la realización de este trabajo de investigación fueron: Gerente del departamento de investigación y desarrollo (D&I) con respecto a la logística, planeación y toma de decisiones para la colecta del germoplasma; los trabajadores quienes aplicaron sus destrezas en el uso de las herramientas para la colecta de las flores; supervisores de departamentos

de D&I quienes aportaron con los conocimientos sobre la fenología y crecimiento de *O. pyramidale*.

Los materiales y herramientas utilizadas para la fase de campo y laboratorio durante el desarrollo la investigación fueron; palancas tipo malayo, cuchillo para malayo, fundas de papel para el transporte de las flores, marcadores, papel aluminio, nutrientes (sucrosa, ácido bórico y nitrato de calcio), estufa, balanza analítica, calibrador, cámara fotográfica, microscópico, tanque de nitrógeno, refrigerador, incubadora, tubos eppendorf y falcon de capacidad 0,25 y 15 ml respectivamente, sílica gel, algodón, cajas petri, agua destilada, guantes, mascarilla, mandil, botas, navegador de GPS, libreta de campo, termohigrómetro, bisturí

## **1.5 OBJETIVOS**

### **1.5.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de temperatura y secado en la viabilidad del polen almacenado de *O. pyramidale*.

### **1.5.2 Objetivos específicos**

Establecer los medios idóneos para evaluar la viabilidad inicial y post almacenamiento del polen de *O. pyramidale*.

Determinar el contenido de humedad inicial de humedad del polen de *O. pyramidale* mediante métodos termogravimétricos.

Determinar la temperatura y contenido de humedad adecuados para un óptimo almacenamiento del polen de *O. pyramidale*.

Elaborar la propuesta de un plan de mejoramiento para *O. pyramidale* mediante polinización dirigida.

## 1.6 JUSTIFICACIÓN

En países de América Latina y Europa desde hace muchas décadas se han realizado investigaciones de viabilidad de polen, tales como: “Viability of pollen and receptivity of pistillate flowers” por Albert (1930), “Effect of vacuum-drying and storage environment on the viability of pea” por Layne (1963), “Influence of temperature on date and duration of pollen shed by longleaf pine” por Boyer (1970), lo que permitió avanzar a pasos agigantados en la producción, manejo, mejoramiento genético y conservación de sus especies, especialmente aquellas de importancia comercial.

En el Ecuador se han realizados estudios de viabilidad de polen en; *Phaedranassa viridiflora*, *Phaedranassa dubia*, *Stenomesson aurantiacum*, *Tehobroma cacao*, *Alstroemeria ssp*, *Vasconcellea ssp*, *Ealis guineensis* (Vara 1960, Andrade 2007, Maita 2006, Vargas 2010, Moreno *et al.* 2013) lo que permitió una mayor producción de sus cultivos, variabilidad genética, soluciones a enfermedades mediante la polinización manual. En referencia a estudios de almacenamiento de polen en el país solo se han realizado para

*Theobroma cacao* (Vara 1960, Cadena 1962, Cornejo 1962). La importancia de emprender planes de mejoramiento genético mediante polinización dirigida en especies forestales nativas del Ecuador y de importancia comercial como *O. pyramidale*, es de garantizar la producción de madera de balsa con altos estándares de calidad, diseñar estrategias de conservación y salvaguardar la diversidad genética de la especie.

## **1.7 CAMBIOS ESPERADOS CON LA INVESTIGACIÓN**

Los resultados de la investigación contribuirán directamente a establecer un protocolo para manejo y almacenamiento de polen de *O. pyramidale*, lo que permitirá planificar cruzamientos controlados para la producción de semilla mejorada.

**CAPÍTULO II**  
**MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN**

## 2.1 FUNDAMENTACIÓN CONCEPTUAL

**Polen.** Los granos de polen se desarrollan en los sacos polínicos (en las anteras). Esta formación inicia como una célula equivalente a una microspora, que luego de varias divisiones por mitosis quedando formada por dos células, la vegetativa de gran volumen que ocupa casi todo el interior del grano de polen y sirve para el desarrollo del tubo polínico y una célula generativa o gameto sexual masculino (Vasil 1964, Stanley y Linskens 1974).

**Viabilidad polínica.** Se refiere a la viabilidad del polen. Según Stanley y Linskens (1974) es la capacidad de germinar, crecer y fertilizar, es muy útil para medir la reproducción de una especie y las condiciones de almacenaje de su polen para evitar que se pierda su viabilidad a través del tiempo. La viabilidad del polen se considera generalmente para indicar; la capacidad del grano de polen de entregar las células espermáticas para el saco embrionario después de la polinización (Shivanna *et al.* 1991 citado por Zeng *et al.* 2004). Dafni y Firmage (2000) definen la viabilidad del polen como la capacidad para vivir, crecer, germinar o desarrollarse. Estos dos autores mencionaron también a la viabilidad como la capacidad del polen para germinar sobre la superficie del estigma o bien en estado *in vitro*, como la respuesta del polen a ciertas tinciones y a la efectividad de producción de semillas después de la polinización.

**Longevidad del polen.** El término de longevidad polínica define el periodo en el cual el polen mantiene la capacidad de germinar sobre un estigma apropiado (receptivo y compatible) (Dafni y Firmage 2000). La duración de la viabilidad del polen después de la deshiscencia de las anteras es crucial para la polinización (Stone *et al.* 1995). La duración del grano de polen después de la deshiscencia de la antera varía según el contenido de carbohidratos presentes en él, ya que

éstos protegen a la membrana de la desecación dando mayor longevidad al polen (Dafni y Firmage 2000).

## 2.2 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

### 2.2.1 Descripción de la especie

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malvales
Familia	Malvaceae
Sub familia	Bombacoides
Género	<i>Ochroma</i>
Especie	<i>pyramidale</i>

Sinonimia; *Ochroma lagopus* Sw; *Bombax pyramidale* Cav. ex Lam (Vázquez *et al.* 1999).

Según Whitmore (1968) citado por Francis (1991), el área de distribución natural para esta especie de importancia comercial, se ha registrado desde la cuenca del Río Guayas en Ecuador en los extremos a 22° de latitud norte hasta alrededor de los 15° de latitud sur. Y para el resto de esta especie se distribuye desde el sur de México hasta Bolivia, a través de la mayor parte de Venezuela, y las Antillas (Pennington 1968) (fig. 1).

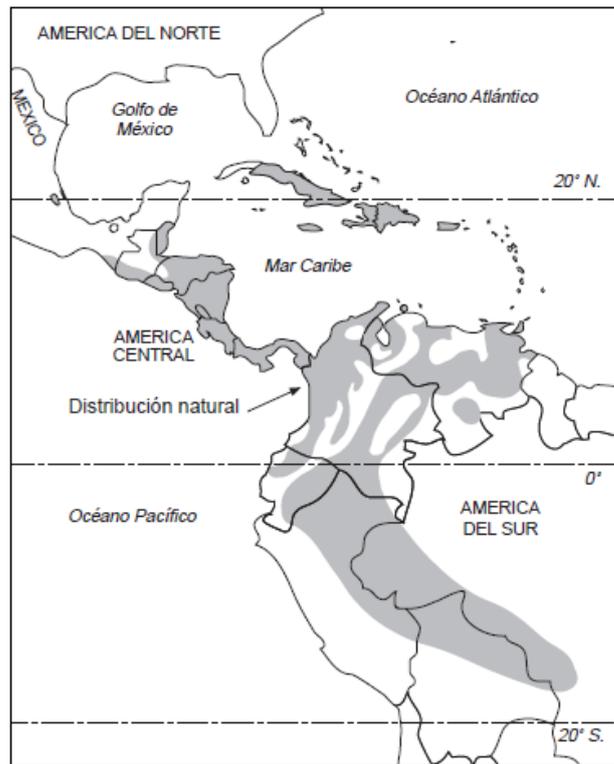


Figura 1. Distribución natural de la balsa, *Ochroma pyramidale*, en el geotrópico. Fuente: Francis K., 1991.

*O. pyramidale* es nativa de Ecuador, conocida como balsa, lana, boya, se la encuentra de manera natural y en plantaciones comerciales en las regiones de la costa y el oriente amazónico, de crecimiento rápido lo que facilita su aprovechamiento a los 4 o 5 años y sea rentable para pequeños productores, se la considera indicadora de bosques secundarios. Su madera es una de las más livianas y sus principales usos en el aeromodelismo, material aislante, chapa de interiores, para la elaboración de juguetes y artesanías. También se la utiliza en programas de reforestación puesto que se regenera en terrenos degradados, en programas de conservación de cuencas hídricas y en sistemas agroforestales (Vázquez *et al.* 1999).

Es un árbol que puede alcanzar alturas por encima de los 35 m, de copa abierta, ancha, redondeada o irregular, su fuste recto, cilíndrico, liso aunque en

ciertas ocasiones puede presentar gambas, de corteza es gris o pálida, lisa con cicatrices lineales sin embargo la interior es fibrosa. De follaje perennifolio, sus hojas son simples y alternas, dispuestas en espiral, acorazonadas, de 20 a 40 cm de largo, borde liso y con pelos epidérmicos rojizos (densamente estrellado, pubescentes), con 5-7 nervios principales desde la base. Con estípulas hasta de 2 cm de largo, foliáceas (Francis 1991).

Especie hermafrodita, las flores solitarias, axilares, sobre pedúnculos pubescentes de hasta 20 cm de largo, ligeramente perfumadas, de cinco pétalos, blancas pubescentes y con el cáliz color verde, son polinizadas por insectos y mamíferos nocturnos. Produce frutos secos, tipo cápsula dehiscente, largos y en forma de bastón con 10 costillas longitudinales prominentes, divididas en 5 partes; son semileñosos y cilíndricos de 14 a 24 cm de largo recubiertos de lana. Las semillas son abundantes en forma de pequeña gota, ovoides, de 3 a 5 mm de largo, color castaño oscuro y se encuentran envueltas en lana amarillenta y sedosa, llegando a producir de 20 a 48 frutos por árbol y cada fruto contiene un promedio de 828 semillas, lo que puede resultar que un árbol produzca entre 6,000 y 39,000 semillas y su primera fructificación puede darse a los 2 o 3 años de edad, (Pennigton y Sarukhán 1968, Vázquez *et al.* 1999, Rojas y Torres 2009)

### **2.2.2 Polen**

La palinología es el estudio de los granos de polen (producidos por las angiospermas y gimnospermas) y las esporas (producidas por las Pteridofitas, Briofitas, algas y hongos). Ambos grupos difieren considerablemente en su función, pero tanto los granos de polen como las esporas (con algunas excepciones), son el resultado de la división celular que involucra la reducción a la mitad del número cromosómico (meiosis) y ambas estructuras necesitan

ser transportadas para realizar su función adecuadamente. El polen y las esporas son similares en tamaño (frecuentemente entre 20 y 40 micras) y ambos están formados por paredes fuertes y resistentes pero son morfológicamente diferentes (Morales y Fernández 2012).

Un grano de polen está constituido por dos partes: “la célula viva” y la “esporodermis” o pared externa, su función principal es la de proteger el protoplasma celular, mediante la impermeabilización y la resistencia a la degradación físico-química y biológica. Esta pared está formada por dos capas fundamentalmente diferenciadas una interna que está en contacto con el protoplasma celular denominada “*intina*”, y otra externa rodeando a todo el conjunto, llamada “*exina*”; capas que difieren por sus caracteres químicos, morfológicos y ontogénicos.

La exina es una capa muy resistente, ya que soporta la acción de los ácidos y bases concentradas, así como el calentamiento hasta 300 °C, únicamente alterada por algunos oxidantes y ciertos microorganismos. Debido a ello, se han encontrado exinas prácticamente intactas en predecesores de los granos de polen actuales, como esporas de helechos y prepólenes, procedentes de depósitos del Paleozoico. Su componente químico fundamental es la esporopolenina. Presenta una cierta elasticidad y plasticidad, permitiendo al grano de polen adaptarse a las condiciones ambientales. También hay un componente polisacárido y otro lipídico, así como proteínas, fundamentalmente glucoproteínas. La exina consta a su vez de dos capas: ectexina (externa) y endexina (interna), se diferencian por su morfología, por su desarrollo y por su composición química la misma se puede observar a microscopio óptico utilizando tinciones diferenciales y a microscopio electrónico de transmisión, ya que ambas capas dan distinto contraste (Anero 2008, Jaramillo y Trigo 2011).

La intina es la capa más interna de la pared del grano de polen. Sus componentes principales son celulosa, pectinas y glucoproteínas. No es resistente a los ácidos y se destruye fácilmente con la acetólisis. Puede considerarse equivalente a la pared de celulosa típica del resto de células vegetales. Forma una capa continua, no interrumpida alrededor de todo el grano de polen (Anero 2008, Jaramillo y Trigo 2011).

La mayor parte de los granos de polen, en el momento de la dehiscencia de la antera, están recubiertos por una sustancia llamada "pollenkitt" o manto polínico, que es secretada por las células del tapete compuesta fundamentalmente por lípidos, carotenos, polisacáridos y glucoproteínas en proporciones variables. Es probable que tenga un papel importante en el reconocimiento polen-estigma. La consistencia y la cantidad de lípidos del pollenkitt presente en los granos de polen de plantas de polinización entomófila y anemófila, es bastante diferente (Anero 2008, Jaramillo y Trigo 2011)

El grano de polen en las Malvaceae son esféricos, porados y esquinados, con endexina notablemente gruesa. Los poros pueden ser pequeños (1-3 micras) o grandes (4-6 micras); y los poros dilatados pueden o no tener un engrosamiento interior. En la ectecina los poros presentan aberturas ásperas y rectangulares. Están uniformemente espaciados a lo largo de una sola línea (arco) que rodea el grano de polen, si la longitud de la línea que rodea es igual a la esférica del grano, este es triporado. Si es más largo, entonces el grano es 4-porado, 5-porado- etc. Las espinas son aproximadamente dos veces más gruesas que la pared y algunas pueden ser huecas. Son pequeñas cuando son dos veces menor que la altura de la pared y son grandes cuando están en forma de botella en la base y tienen una base cónica o plataforma columnar (Barath 1975, Culhane y Blackmore 1988).

Montoya *et al.* en el año de 2014 describió los granos de polen de 122 especies, entre ellas los de *O. pyramidale*. Este autor indica que los granos de polen de esta especie son: radiosimétricos, isopolares, brevitricolporados, oblado-esferoidales a prolado-esferoidales, ámbito triangular convexo; distancia ecuatorial de 77-95  $\mu\text{m}$ , distancia polar de 70-80 $\mu\text{m}$ . Exina: 4-5 $\mu\text{m}$ , reticulada. Retículo heterobrocado, simplicolumelado a duplicolumelado, muro de 2 $\mu\text{m}$  de ancho, lumen de 6-18 $\mu\text{m}$ . Poros elípticos-lolongados y costados (10-14 x 8-10 $\mu\text{m}$ ). Colpos (14-25 x 3-8 $\mu\text{m}$ ).

### **2.2.3 Germinación y viabilidad del polen**

Stanley y Linskens (1974) definieron a la viabilidad como la capacidad de germinar, crecer y fertilizar. Se podría considerar como un buen método de medir la viabilidad del polen, la habilidad del mismo para fertilizar y producir semillas. Para determinar la viabilidad del polen a nivel de laboratorio, existen varias pruebas, entre éstas: germinación, actividad enzimática y tinción del citoplasma de granos de polen. La duración de la viabilidad del polen varía considerablemente entre las diferentes especies, y se relaciona con el tipo de polinización. En general, plantas con polinización entomófila poseen un polen con una viabilidad mayor que aquellas polinizadas con el viento (Nepi y Pacini 1993).

La germinación del polen comienza con un agrandamiento de éste por la absorción del agua de la superficie del estigma. Las vacuolas turgentes empujan la intina y el citoplasma hacia la apertura del grano de polen produciendo una elongación del citoplasma a manera de tubo y su pared está formada por la intina. A través de la historia se han desarrollado muchas técnicas para la evaluación de la germinación del polen, sin duda unas han sido más exitosas que otras. Sin embargo, las más empleadas por los resultados

obtenidos son dos; 1) por tinción que consiste en teñir los granos, en dónde se considera que son viables aquellos que son teñidos durante el proceso de tinción, sin embargo es posible que se puedan teñir granos de polen muertos (Ochoa, 1991) y 2) por germinación *in vitro* en condición líquida y sólida, enriquecidos con sacarosa, calcio o boro son componentes de importancia para la germinación. Los protocolos cambian según el vegetal y los autores, pero la mayoría utiliza el medio elaborado por Brewbaker y Kwack (1963).

Zaid en el 2002 citó las diferentes técnicas rápidas y fiables que aseguran una excelente y rápida germinación, el crecimiento normal del tubo polínico y casi ningún estallido de los granos de polen.

#### **2.2.3.1 Técnica de la germinación de Albert (1930)**

Una pequeña cantidad de granos de polen se espolvorea sobre una gota de 20 % de sacarosa colocado sobre una cubierta de vidrio, que se invierte entonces a través de una celda de vidrio. Una película delgada de vaselina se coloca en la parte superior de la celda para sellar el vidrio de cubierta a la misma. Luego se coloca en una incubadora a 27 °C durante 12 a 14 horas y la inspección se realiza bajo un microscopio. Un inicio de un crecimiento del tubo polínico se considera como una prueba de germinación. Recuentos de germinación deben tomarse de 4 campos de cada diapositiva.

#### **2.2.3.2 Técnica de tinción de Moreira y Gurgel (1941)**

Tomar una pequeña cantidad de los granos de polen y colocarlos en una diapositiva con 1-2 gotas de solución acetocarmina 1 %. Las diapositivas se calientan durante unos minutos en un plato caliente. El examen se lleva a cabo

bajo microscopio, utilizando objetivo 200x para evaluar la viabilidad de los granos de polen (uso 4 campos para cada diapositiva). Los granos de polen rojo teñidos se consideran viables, mientras que los granos de polen incoloros se consideran no viables.

#### **2.2.3.3 Técnica de germinación de Monciero (1954)**

El medio es un sólido y consta de 1 % de agar y 2 a 10 % de glucosa; Se ejecuta a una temperatura media de 27°C durante 24 horas.

#### **2.2.3.4 Medio Brewbaker y de Kwack (1963)**

Es un medio líquido desarrollado en 1963 compuesto por; sacarosa 10 %, ácido bórico 100 mg/L, nitrato de calcio 300 mg/L, sulfato de magnesio 200 mg/L, nitrato de potasio 100 mg/L. Los granos de polen se sembraron en gotas de 1/50 ml de pie sobre cubreobjetos, estos se colocaron en placas de Petri con en papel de filtro húmedo y normalmente se dejan a temperatura ambiente durante el crecimiento (hasta 24 horas).

#### **2.2.4 Almacenamiento de polen**

El término almacenamiento es la acción de guardar un objetos, sujeto, órganos, etc., bajo condiciones adecuadas en determinados tiempos, que manera que estos conserven sus propiedades y cualidades según sea su naturaleza y objetivos de almacenamiento. Stanley y Linskens (1974) indicaron que los primeros almacenamientos de polen se registró por los años 2000 A.C., para *Phoenix dactylifera*, donde se almacenaron inflorescencias masculinas y una

vez que determinaron las condiciones óptimas para su almacenamiento estas pudieron mantenerse viables por 19 años. Por otra parte estos investigadores mencionan a varios autores, que han logrado almacenar a bajas temperaturas polen de aprox. 80 especies, donde algunas mantuvieron hasta 20 años su viabilidad.

Una de las principales razones por la cual se ha visto la necesidad de almacenar polen en actividades de hibridación en ciertas especies en la que no existe sincronización de la dispersión del polen con el período de receptividad floral (Tighe, 2004).

La técnica de almacenamiento de polen es muy semejante a la que se utiliza en semilla, puesto que el polen de la mayorías de especies pueden almacenarse con bajos contenidos de humedad y almacenarse a bajas temperaturas, sin embargo al igual que ciertas semillas, existen especies con polen de tipo recalcitrante, es decir que no permiten almacenamiento a bajas temperaturas. El polen se puede almacenar en temperaturas van desde refrigeración, pasando por congelación y hasta pueden ser almacenados en crioconservación (temperaturas ultrabajas, generalmente en nitrógeno líquido,  $-196^{\circ}\text{C}$ ), la misma que dependerás de varios factores entre ellos pueden ser ambientales como intrínsecos, así como del proceso que se dé al polen durante su almacenamiento y descongelación (Tighe 2004, Dafni y Firmage 2000, Stanley y Linskens 1974).

La técnica de almacenamiento de polen a la que nos hemos referido, consiste en provocar una deshidratación protectora en las células y el tejido, de manera que se evite o disminuya la formación de cristales de hielo durante el almacenamiento a bajas temperatura lo que puede causar daños en las membranas. Los resultados mejores en almacenamiento de polen en muchas especies, han indicado que los granos de polen con menor contenido de humedad mantienen mayormente su viabilidad durante largos plazos de

almacenamiento (Stanley y Linskens 1974). Esto puede incumbir a una estabilidad de las membranas en los granos de polen deshidratados según Shivanna y Heslop-Harrison (1981) citado por García (2014), lo que implica que si la reorganización molecular producidas en las membranas del polen como resultado de la deshidratación no provoca una alteración irreversible en su estructura, estas pueden regenerar en la rehidratación del polen por la absorción de agua y recuperar sus funciones normales.

### **2.2.5 Factores que afectan a la viabilidad del polen en el almacenamiento.**

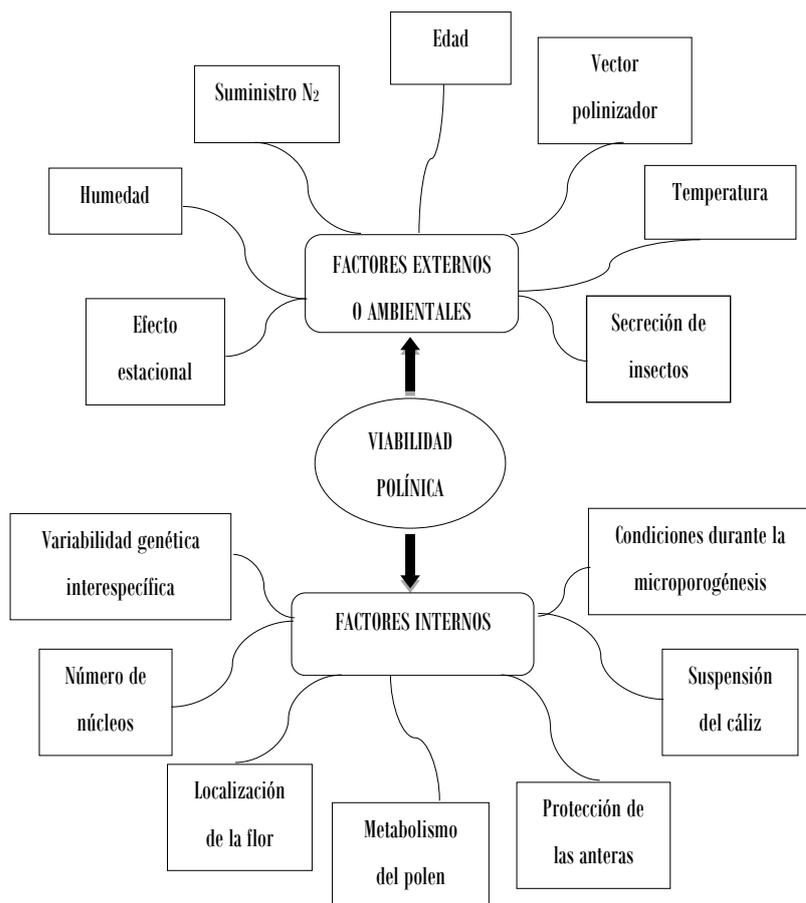
Para el éxito de almacenamiento mediano y largo plazo, hay que dominar la recolección, técnicas de secado, almacenamiento y pruebas de viabilidad del polen. Para ello, las metodologías de estas técnicas se deben desarrollar, ya que cada especie se comporta de manera diferente en contra de estos procedimientos, que pueden poner en peligro la viabilidad del polen (Sousa *et al.* 2010).

La viabilidad del polen está determinada por diversos factores internos y externos o medioambientales. Entre los factores internos, específicos de la especie, destacan la duración de la microsporogénesis, la variabilidad genética interespecífica, el metabolismo del polen, etc. (Hormaza y Herrero 1999 citado por Rejón *et al.* 2010).

La viabilidad del polen también se ve afectada por el tiempo y la metodología usada en la colecta del polen (anteras y/o flores) (Kearns e Inouye 1993 citado por Aragón 2006), la hora del día en que se colecta el polen y el estado de desarrollo floral de donde este proviene. Las exposiciones a la luz ultravioleta y al ozono también pueden afectar su viabilidad reduciéndola en algunas

especies (Stanley y Linskens 1974). Por otra parte Stone *et al.* (1995) sostiene que la pérdida de viabilidad del grano de polen es algo inevitable, pudiendo llegar a ser demasiado rápida debido a la edad del polen y a la exposición de estrés de tipo medioambiental.

Stanley y Linskens (1974), indicaron como los principales factores que afectan la germinación del polen a: 1) Factores primarios: temperatura, pH, oxígeno, presión osmótica, humedad, cationes ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ , metales pesados), aniones ( $\text{BO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^-$ ), carbohidratos, y 2) Factores secundarios: hormonas de crecimiento,  $\text{CO}_2$ , micronutrientes, irradiación.



**Figura 2. Factores que afectan a la viabilidad del polen (esquema modificado a partir de Dafni y Firmage, 2000).**

### **2.2.5.1 Humedad relativa**

Stanley y Linskens (1974) determinaron que el grado de humedad es el factor más importante que afecta a la viabilidad del polen durante su almacenamiento, llegando a causar graves daños al polen por desecación, sustentándose en la siguientes hipótesis. Los procesos metabólicos son severamente retardados y la respiración es reducida como consecuencia del bajo contenido de agua en el polen maduro (O'konuki 1993). Los modelos de inhibición de las reacciones bioquímica en la respiración del polen pueden se explicadas en base a los bajos contenidos de agua (Bunning y Herdtle 1946). La deshidratación de las proteínas puede reducir la actividad enzimática. Igualmente la deshidratación normal del polen trinucleados puede probablemente causar daño a los componentes del núcleo de la célula masculina y asimismo reducir la viabilidad (Haeckel 1951).

La humedad del aire durante el almacenamiento de polen decisivamente afecta a la longevidad del polen (Pfundt 1910 citado por Stanley y Linskens 1974). Muchas especies mantienen una buena viabilidad a humedades relativas bajas, sin embargo no se puede generalizar respecto a una humedad promedio óptima, debido a que en un gran número de especies los resultados de este tipo de investigaciones no son comparables ni similares (Magin *et al.* 1886 citado por Stanley y Linskens 1974).

### **2.2.5.2 Temperatura**

La temperatura también es otros de los factores que debe de considerarse en la viabilidad del polen, Stanley y Linskens (1974), mencionan que

temperaturas próximas a cero grados prolongan la viabilidad substancialmente, sin embargo, el contenido de humedad juega un rol importante, por ejemplo, en algunos tipos de polen, que almacenados a -12 °C presentaron mayor longevidad a humedad de 28 % que, polen almacenado a 56 % de H.R. Para otros tipos de polen, un pre-secado es esencial para el almacenado 0 °C. En estudios de almacenamiento de polen se han encontrado a bajas temperaturas se preserva mejor la viabilidad que a altas temperaturas.

Shivanna y Sawhney (2005) concuerdan que el almacenamiento de polen a temperaturas superiores a 0 °C, aunque tenga una actividad metabólica lenta habrá una disminución gradual en la viabilidad del polen, hasta llegar a la pérdida total de la viabilidad. Por lo que el almacenamiento en condiciones criogénicas puede ser prometedor para la preservación de la viabilidad del polen a largo plazo. La longevidad del polen bicelular que es considerada ser tolerante a desecación con un bajo contenido inicial de agua, ha sido exitosamente prolongado usando temperaturas de almacenamientos entre -10 y -34 °C.

### **2.2.5.3 Gas atmosférico**

Linskens and Stanley en 1974 cita a; Knowlton (1922) Antles (1920) quienes indicaron que la influencia de la composición de la atmósfera en el almacenamiento del polen ha sido investigada y un aumento del porcentaje de dióxido carbono en la atmósfera, como ocurre cuando el polen se almacena en hielo seco, prolonga la viabilidad; y a Griggs *et al* (1950) quien indicó que el almacenamiento en oxígeno puro acorta la longevidad.

#### 2.2.5.4 Presión del oxígeno

Linskens and Stanley (1974) realizaron varias investigaciones concluyendo que al reducir la presión parcial del oxígeno se puede prolongar la viabilidad en algunos granos de polen. Cuando el pre-secado ocurre bajo presión reducida, el polen de *Citrus*, *Pyrus* y *Malus* retienen un alto porcentaje de germinación durante su tratamiento al vacío. Sin embargo otras especies como *Hordeum*, *Antirrhinum*, *Saccharum* y *Cinchina*, mueren cuando se almacenan a bajas presiones de oxígeno. Otras como *Pinus nigra* y *Betula verrucosa* incrementaron la longevidad cuando se coloca en ampollas de vidrio selladas al vacío.

#### 2.2.6 Algunas evaluaciones de germinación *in vitro* y viabilidad de polen

Rajora y Zsuffa (1985) evaluaron la viabilidad del polen de *Propulus nigra* L., y *Propulus. mimowiczii* A. mediante las técnicas de tinción y germinación *in vitro*. Los autores obtuvieron los siguientes resultados para la germinación *in vitro*: en ambas especies su germinación inicial fue luego de dos horas de la siembra, sin embargo difieren en tiempo de máxima germinación, siendo ocho y diez horas para *P. nigra* y *P. mimowiczii*; el máximo de germinación para fue después de aproximadamente 8 horas. El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas ( $p < 0,0001$ ) para diferentes concentraciones de sacarosa. El mejor tratamiento para *P. deltoides* resultó con la concentración del 10 % de sacarosa y para *P. mimowiczii* el mejor tratamiento fue con la concentración del 20 % de sacarosa. Mediante la técnica de tinción, ambas especies iniciaron la germinación del polen después de aproximadamente 30 minutos y su máximo fue aproximadamente a 1 hora. La tinción inició con una coloración amarillo, rojo claro o rojo oscuro. El porcentaje de polen de colores rojo oscuro (contado como viable) de *P. nigra* y *P. maximowiczii* osciló entre 20 y 62 %. El polen manchado rojo claro varió de 4 a

20 %. El resto del polen fue sin teñir (amarillo). En algunos granos, el color no se distribuye uniformemente sobre los grano de polen.

Tivo e Iglesias (2003) realizaron pruebas de viabilidad del polen de *Pinus hartwegii* Lindley mediante las técnicas de tinción y germinación *in vitro*, donde obtuvieron una amplitud de variación mayor para los indicadores de viabilidad del polen en el método de tinción con un rango desde 11 a 99.66 %, mientras que para la germinación *in vitro* obtuvieron un rango del 26.16 a 95%. Concordando con Ochoa (1991), quien indicó que el método de tinción puede teñir el citoplasmas de los granos de polen vivos o muertos sobreestimando la viabilidad del polen.

Ahmad (2005) evaluó la germinación del polen *in vitro* de cinco especies de árboles frutales; *Olea europaea* L., *Citrus maxima* Merr., *Citrus paradisi* Macfad., *Prunus persica* L., y de *Prunus domestica* L., en medio de cultivos semisólidos con sacarosa, ácido bórico y ácido cítrico con la aplicación de una variante (con y sin aceite de oliva antes de sembrar en los medios). Los resultados obtenidos indicaron que el aceite de oliva puede suprimir completamente la germinación de algunas especies, en este caso suprimió totalmente la germinación para las especies *Citrus* y parcialmente a *P. domestica*. La mayor geminación para *C. paradisi* fue del 52.3 % en el medio 0.5 % de agar, 20 % de sacarosa, para *P. domestica* con el 42.1 % en el medio en el medio 0.8 % de agar, 10 % de sacarosa, 50 mg/l ácido cítrico y para *C. maxima* fue del 44.9 % en el medio 0.8 % de agar, 20 % de sacarosa. Sin embargo, para *O. europaea* la pre inmersión del polen el aceite de oliva incrementó la germinación en del 30.2 % al 52.8 % en el medio 0.8 % de agar, 10 % de sacarosa, 50 mg/l ácido bórico and 50 mg/l ácido cítrico El mismo efecto tuvo para *P. persica* quien tuvo un incremento del 28.7 % al 43.3 % en el medio 10 % sacarosa + 0.8 % agar + 100 mg/l ácido bórico.

Gehrke, *et al* (2011), evaluó la viabilidad y germinación del polen *Mangifera indica L.*, en cuatro sitios diferentes (Mazatán, Tapachula, Suchiate y Tuzantán), separando el polen de flores hermafroditas y flores masculinas por el método de tinción y germinación *in vitro*. El polen proveniente de flores hermafroditas mostró índices de viabilidad constantemente mayores que los de flores masculinas, habiéndose observado diferencias de 36 a 59 % y un promedio de 43.3 % en los cuatro sitios experimentales. En las pruebas preliminares de germinación *in vitro* en los medios de cultivos: M1: agar + sacarosa 0.01g y M2: agar + sacarosa + solución nutritiva, los porcentajes de germinación fueron de 40 % y 30 % respectivamente. Sin embargo, los promedios de germinación cambiaron considerablemente en las pruebas definitivas, donde se observó una media de germinación de 14.5 % para el polen proveniente de flores hermafroditas y 1.75 % para el polen proveniente de las flores masculinas.

Souza *et al.* (2014), evaluaron la viabilidad inicial del polen de *Aechmea bicolor L.B.*, mediante la germinación *in vitro* resultando el mejor medio el compuesto por: 1.62 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.27 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.81 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.99 mM KNO<sub>3</sub>, 350 mM sucrosa, 8 g L<sup>-1</sup>agar, pH 6.5, donde se obtuvo un 95 % de germinación del polen y un crecimiento en el tubo polínico de 0.6 mm después de 24 horas de la siembra.

### **2.2.7 Algunas evaluaciones de los efectos de temperatura y secado en la viabilidad de polen almacenado.**

Lora *et al.* (2006), almacenamiento de polen de *Annona cherimola* (Mill) a -20°C, -80°C y -196 °C durante un máximo de 3 meses, la misma que se redujo progresivamente según el tiempo de almacenamiento en donde resultó el 10.4, 14.2 y 13.6 % de germinación para -20°C, -80°C y -196 °C, respectivamente.

Es decir que se llegó a perder hasta 46.7 % de su germinación, ya que el polen fresco obtuvo una germinación *in vitro* de polen fresco de 57.1 %.

Mortazavi *et al.* (2010), realizaron prueba de almacenamiento de polen de *Phoenix dactylifera L.*, en tres sitios: Ghanami, Samsmavi y Gheibani, almacenando el polen a temperatura ambiente en condiciones de luz y oscuridad, en nevera a 4°C, congelador a -20°C y nitrógeno líquido a -196°C, evaluando la viabilidad mediante la germinación *in vitro* a los 40 y 200 días de almacenamiento. Los resultados obtenidos después de los 40 días del polen fresco al ambiente fueron 51.36 %, 74.29 % y 75.94 % indicando una disminución para los cultivares de Ghanami, Gheibani y Samsmavi, respectivamente; sin embargo este polen no presentó germinación a los 200 días. Los granos de polen almacenados en el refrigerador a 4°C mostraron una viabilidad aceptable después de 200 días, con el 54.9%, el 71.6% y el 77.8% para los cultivares Ghanami, Gheibani y Samsmavi respectivamente. Los granos de polen de tres cultivares presentaron mejor respuesta cuando se almacenaron en nitrógeno líquido con el 67.1 %, 80.9% y 83.9% para los cultivares Ghanami, Gheibani y Samsmavi respectivamente, es decir que solo se perdieron el 2% de su viabilidad después de 200 días de almacenamiento.

Souza *et al.* (2014) evaluaron el almacenamiento de polen fresco de *Aechmea bicolor* (L.B.Sm) y polen sometidos a secado o deshidratación. El almacenamiento se realizó a -5°C en refrigeración, -80°C supercongelador y -196°C en nitrógeno líquido, en cuatro tiempos de almacenamiento (1 y 24 horas; 8, 30, 180 y 365 días). Para la deshidratación de polen se realizaron cuatro métodos termogravimétricos; 1) en incubadora a  $27 \pm 1$  °C, 2) cabina flujo laminar, 3) gel de silicio en un desecador y 4) estufa a  $37 \pm 1$  °C, en diferentes períodos de tiempo (1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 horas y 8 días). Para la evaluación de la germinación *in vitro* se utilizó el medio MSM: 1.62 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.27 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.81 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.99 mM KNO<sub>3</sub>, 350 mM

sucrosa, 8 g L<sup>-1</sup>agar, pH 6.5. El mejor tratamiento de deshidratación fue en desecador con gel de sílice durante tres horas con una germinación del polen (95%), un crecimiento del tubo polínico de 0.6 mm después de 24 horas, y contenido de humedad del grano de polen de alrededor de 40%, lo que se considera una condición segura para la conservación de polen. Y el mejor tratamiento de almacenamiento de polen fue en nitrógeno líquido con tratamiento de deshidratación, donde se obtuvo el 94.00%, 89.25%, 87.17%, 86.50%, 86.92%, 87.58% para los tiempos de almacenamiento de 1 y 24 horas, 8, 30, 180 y 365 días respectivamente.

García (2014) estableció que el mejor tratamiento para el almacenamiento de polen para *Nothofagus alpina* (P. et E.) Oerst., fue secar el polen por 240 minutos con un contenido de humedad del 8% y almacenado a -80°C, con una viabilidad de germinación del 31.3 % ( $\pm 6.1$ ) conservando el 100 % de su viabilidad hasta los 30 días, ya que la germinación inicial para *N. alpina* fue el 33.9 % ( $\pm 4.3$ ). Sin embargo, a los 90 días del polen almacenado a -80°C registró un 24.9 % ( $\pm 4.3$ ) de germinación, correspondiendo al 80 % del polen viable almacenado. García concluye que; al someter el polen seco a bajas temperaturas, se redujo su actividad metabólica, lo que le permitió mantener la viabilidad en el tiempo. Además, manifiesta que el proceso de secado fue extremadamente deletéreo, ya que ocasionó la pérdida progresiva de la viabilidad conforme se aumentó el tiempo de secado.

## **2.3 FUNDAMENTACIÓN LEGAL**

De acuerdo con la Constitución del Ecuador (2008), el capítulo segundo, sección primera sobre naturaleza y Ambiente señala que:

**Art. 86.-** El Estado protegerá el derecho de la población a vivir en un medio ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice un desarrollo sustentable.

**Art. 395.-** La Constitución reconoce los siguientes principios ambientales:

1. El Estado garantizará un modelo sustentable de desarrollo, ambientalmente equilibrado y respetuoso de la diversidad cultural, que conserve la biodiversidad y la capacidad de regeneración natural de los ecosistemas, y asegure la satisfacción de las necesidades de las generaciones presentes y futuras.
2. Las políticas de gestión ambiental se aplicarán de manera transversal y serán de obligatorio cumplimiento por parte del Estado en todos sus niveles y por todas las personas naturales o jurídicas en el territorio nacional.

**Art. 400.-** El Estado ejercerá la soberanía sobre la biodiversidad, cuya administración y gestión se realizará con responsabilidad intergeneracional. Se declara de interés público la conservación de la biodiversidad y todos sus componentes, en particular la biodiversidad agrícola y silvestre y el patrimonio genético del país.

**Art. 401.-** Se declara al Ecuador libre de cultivos y semillas transgénicas. Excepcionalmente, y sólo en caso de interés nacional debidamente fundamentado por la Presidencia de la República y aprobado por la Asamblea Nacional, se podrán introducir semillas y cultivos genéticamente modificados. El Estado regulará bajo estrictas normas de bioseguridad, el uso y el desarrollo

de la biotecnología moderna y sus productos, así como su experimentación, uso y comercialización. Se prohíbe la aplicación de biotecnologías riesgosas o experimentales.

**CAPÍTULO III**  
**METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

### 3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación es de tipo experimental para lo cual se utilizó un diseño completamente al azar, con un arreglo factorial de 4 x 3 con cinco repeticiones. Mediante el cual se compararon cuatro tiempos de secado y tres temperaturas de almacenamiento de polen, lo que resulta:

$$\text{Factor a = (secado) } \left\{ \begin{array}{l} \text{A (60')} \\ \text{B (120')} \\ \text{C (180')} \\ \text{D (240')} \end{array} \right. \quad \text{Factor b= (temperatura) } \left\{ \begin{array}{l} \text{P (5°C)} \\ \text{Q (-20°C)} \\ \text{R (-196°C nitrógeno líquido)} \end{array} \right.$$

$$\text{Combinaciones} = 4 \times 3 = 12$$

- |       |        |
|-------|--------|
| 1. AP | 7. CP  |
| 2. AQ | 8. CQ  |
| 3. AR | 9. CR  |
| 4. BP | 10. DP |
| 5. BQ | 11. DQ |
| 6. BR | 12. DR |

$$\text{Número de muestra (n)} = 4 \times 3 \times 5 = 60$$

<u>Fuentes de variación</u>	<u>Grados de Libertad</u>
Tratamientos	$t - 1 = 11$
Repeticiones	$r - 1 = 4$
Factor a	$a - 1 = 3$
Factor b	$b - 1 = 2$
(a x b)	$(a-1) (b-1) = 6$
Error	$(ab-1) (r-1) = 44$
Total	$(a) (b) (r) - 1 = 59$

## **3.2 MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN**

El método utilizado para el desarrollo de este trabajo investigativo fue de carácter hipotético-deductivo, en razón que se determinó las condiciones óptimas de temperatura y humedad para el almacenamiento del polen de *O. pyramidale* a mediano plazo.

Con el método inductivo se alcanzaron los objetivos específicos: determinar la viabilidad del polen en un lapso de 45 días, temperatura y contenido de humedad óptimos para el almacenamiento del polen. El método deductivo nos permitió determinar el medio idóneo para evaluar la germinación in vitro, la temperatura en el secado del polen, el envase adecuado para almacenar, el horario para la recolección de las flores en el campo y su respectivo transporte.

### **3.2.1 Recolección de flores**

El polen utilizado para el almacenamiento fue obtenido de flores cerradas recolectadas en horario de 15h00 a 17h00 (antesis nocturna inicia a las 18h00) de 10 árboles, con una muestra de cinco flores por árbol (de los bordes, de la parte baja y media de la copa). De cuatro años de edad con altura promedio de 28 m, lo que limitó la colecta flores en ciertos árboles puesto que la palanca (tubos de aluminios) utilizada fue de 18 m.

Para evitar la deshidratación de las flores, una vez cortadas se guardaron en fundas de papel kraft con su respectivo código por árbol y posteriormente colocadas en un ambiente fresco para su transporte. Se recolectaron flores de diferentes tamaños, algunas presentaron perforaciones como si fuesen afectadas por insectos. En todas las flores se presencié un insecto (no identificado) en estadios jóvenes y adultos que se alimentan del polen.

### 3.2.2 Extracción del polen

Una vez colectadas las flores fueron directamente trasladadas a los laboratorios de la empresa 3A Composites etiquetándose cada flor con la misma numeración sus pétalos y estambres. Se midió el tamaño de cada flor con un calibre y se cortaron los estambres (monoantraxos) (ver anexos figura 4) dejándolo a temperatura ambiente para que inicien las anteras su dehiscencia y liberen el polen, este proceso por lo general inició a partir de las 18h00. Una vez que fue liberado el polen, con una espátula se colocó el polen de cada flor en platos Petri y se pesó en la balanza analítica. Finalmente se mezclaron los granos de polen de cada flor para homogeneizar la muestra.

El polen obtenido de las flores de *O. pyramidale* varía según su tamaño. Para determinar la producción de polen por flor con respecto a su tamaño se clasificaron en tres tamaños: pequeñas, medianas y grandes. Según los análisis de varianza se encontraron diferencias significativas entre las flores pequeñas con respecto a las flores medianas y grandes. Los resultados indicaron que una flor pequeña puede producir entre 0.68 y 1.24 gr de polen, mientras que una flor con una mediana o grande puede producir entre 1.19 – 1.20 gr (cuadro 1).

**Cuadro 1. Extracción de polen de flores de *O. pyramidale* colectadas durante el año 2015**

<b>Categoría</b>	<b>Peso de polen (gr)/ flor (<math>\bar{x}</math>)</b>	<b>n</b>	<b>(Sd)</b>	
<b>Pequeña</b> (12 - 16,9 cm)	0,96	26	0,05	a
<b>Mediana</b> (17 - 19,9 cm)	1,19	7	0,09	b
<b>Grande</b> (20 - 24 cm)	1,20	25	0,05	b

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

### 3.2.3 Cálculo de germinación

La viabilidad del polen se calculó a través de la germinación *in vitro* probando diferentes concentraciones y modificaciones, mediante la metodología descrita por Brewbaker y de Kwack (1963) a partir de un medio compuesto por; sacarosa 10%, ácido bórico 100 mg/L, nitrato de calcio 300 mg/L, sulfato de magnesio 200 mg/L, nitrato de potasio 100 mg/L, con el objetivo de determinar el medio idóneo para evaluación de la viabilidad inicial y post almacenamiento del polen de *O. pyramidale*. Para ello se probaron los siguientes medios:

M1= 10 % de sucrosa, 100 mgL<sup>-1</sup> ácido bórico, 300 mgL<sup>-1</sup> nitrato de calcio, 200 mgL<sup>-1</sup> sulfato de magnesio, 100 mgL<sup>-1</sup> nitrato de calcio. Brewbaker y Kwack (1963)

M2= 5 % de sucrosa, 50 mgL<sup>-1</sup> ácido bórico, 150 mgL<sup>-1</sup> nitrato de calcio, 100 mgL<sup>-1</sup> sulfato de magnesio, 50 mgL<sup>-1</sup> nitrato de calcio.

M3= 10 % de sucrosa, 30 mgL<sup>-1</sup> ácido bórico, 430 mgL<sup>-1</sup> nitrato de calcio

M4= 5 % de sucrosa, 20 mgL<sup>-1</sup> ácido bórico, 200 mgL<sup>-1</sup> nitrato de calcio

M5= 10 % de sucrosa, 30 mgL<sup>-1</sup> ácido bórico

M6= 5 % de sucrosa, 20 mgL<sup>-1</sup> ácido bórico

La germinación *in vitro* consiste en sembrar polen en un medio líquido o semilíquido, en este trabajo se utilizaron medios líquidos. Una vez que el polen fue extraído, pesado se procedió a sembrar 8 mg de polen en 10 ml de medio utilizando cajas Petri (Ø 5cm). La germinación de los granos de polen se dieron a partir de los 30 a 40 minutos después de la siembra, de manera que se

detuvo el crecimiento de los tubos polínicos a los 60 minutos aplicando una gota de cotton blue (200 mL<sup>-1</sup> de ácido láctico, 100 grL<sup>-1</sup> cristales de fenol, 200 mL<sup>-1</sup> glicerol, 100 mL<sup>-1</sup> agua, 200 grL<sup>-1</sup> cotton blue) para facilitar el conteo de los granos de polen germinados.

Para el cálculo de porcentaje de germinación, se consideraron germinados aquellos granos de polen que emitieron el tubo polínico (polen germinado) y su longitud fue mayor al diámetro del grano del polen, con cuatro observaciones por cada repetición, utilizando un microscopio óptico con un aumento de 4x, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de germinación} = \frac{\text{número de granos de polen germinados}}{\text{número total de granos de polen observados}} \times 100 \%$$

Una vez que el polen fue secado a diferentes tiempos, se calculó el porcentaje de germinación después de cada tiempo de secado (tratamientos) inmediatamente después que fueron retiradas las muestras de la incubadora y pesadas, mediante la germinación *in vitro*.

### **3.2.4 Determinación del contenido de humedad y secado del polen**

Una vez homogenizado el polen de las flores, se dividió en cinco partes iguales (490 mg); cada una de ellas se sometió a un tiempo de secado diferente. El cálculo del contenido de humedad del polen fue mediante métodos termogravimétricos usado por García (2014), calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = \frac{\text{peso del polen fresco} - \text{peso del polen seco}}{\text{peso del polen fresco}} \%$$

Primeramente se determinó el contenido total de agua del polen fresco, secando en estufa a 60°C una muestra (490 mg) colocada en plato Petri durante una hora, los que permitió extraer toda el agua de los granos de polen fresco. Las cuatros muestras restantes fueron sometidas a 60, 120, 180 y 240 minutos de secado en una incubadora a temperatura 29°C y 45% HR, (una muestra de 490 mg de polen para cada tiempo).

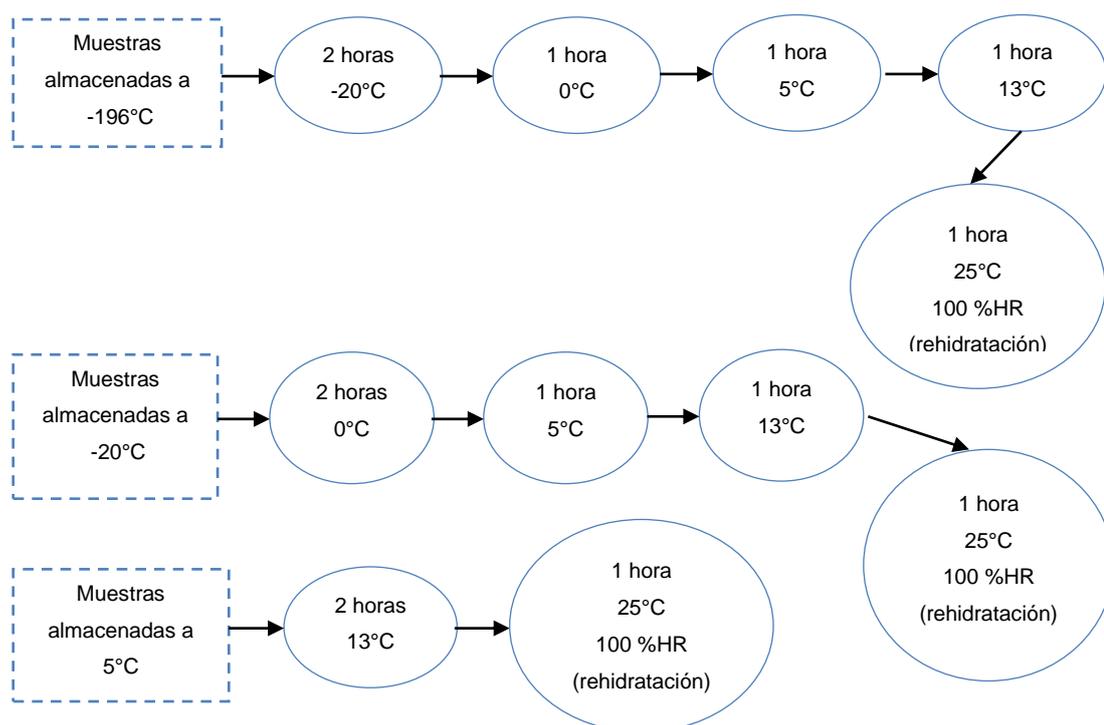
### **3.2.5 Almacenamiento del polen**

Se almacenó 20 mg de polen por cada tubito Eppendorf de capacidad de 0,25 ml, y estos a su vez se guardaron en tubos falcon de capacidad 15 ml con 800 mg de sílica gel y algodón (de manera que las muestras no tengan contacto directo con la sílica gel) para evitar cualquier humedad. Los tubos eppendorf de las muestras almacenadas a -196°C se envolvieron en papel aluminio y estas a su vez en los tubos falcon sin sílica gel. Para las muestras almacenadas a 5°C y -20°C se utilizó un refrigerador marca Panasonic (Frost Free) y -196°C fueron almacenadas en un tanque criogénico (nitrógeno líquido).

### **3.2.6 Evaluación de la viabilidad del polen almacenado**

Las evaluaciones se realizaron a los 15, 30 y 45 días de almacenamiento. Todas las muestras almacenadas antes de proceder a la germinación *in vitro*,

fueron sometidas a procesos de aclimatación mediante el aumento de temperatura en forma gradual. En el primer aumento de temperatura, todas las muestras se dejaron en reposo por lapso dos horas. Posterior a ello se siguieron aumentando la temperatura y el tiempo de reposo fue de una hora por cada aumento hasta llegar a la rehidratación a 25°C y 100% de humedad relativa (Figura 3).



**Figura 3.** Proceso de aclimatación y rehidratación del polen almacenado de *O. pyramidale*

### 3.3 CONSTRUCCIÓN DEL OBJETO DE INVESTIGACIÓN

#### 3.3.1 Variables evaluadas

La variable dependiente es la viabilidad del polen almacenado de *O. pyramidale*, es decir que la viabilidad de los granos de polen va a depender tanto del contenido de humedad, como de la temperatura de almacenamiento.

Las variables independientes son la temperatura de almacenamiento y el contenido de humedad, se evaluaron tres temperaturas de almacenamiento y cuatro contenidos de humedad (resultados de cuatro tiempos de secado).

### **3.4 ELABORACIÓN DEL MARCO TEÓRICO**

Para la elaboración del marco teórico fue necesario contar con bibliografía científica a través de publicaciones científicas y libros on line, puesto que este tipo de investigación no se lo ha realizado en especies forestales en país. Este tipo de información permitió fundamentar teórica, conceptual y científicamente el presente trabajo.

### **3.5 RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN EMPÍRICA**

La empresa 3A Composites en octubre del 2014 realizó pruebas de germinación *in vitro* y polinización dirigida para *O. pyramidale*, proceso en el cual se observó el mecanismo de anthesis de la flor, adquiriendo conocimientos empíricos como la dehiscencia de las anteras y mecanismo de liberación del polen.

En salidas de campo se adquirió conocimientos de la madurez de los botones florales próximos a convertirse en flor. Por lo que se realizaron ensayos de extracción de polen y de germinación *in vitro* en botones flores.

Para determinar la temperatura del secado se realizaron ensayos con 27, 28 y 29°C de temperatura, con la finalidad de obtener un contenido de humedad del polen por debajo del 30% que es recomendado por varios autores cuando se

trata de almacenamiento a muy bajas temperatura. Como resultado se determinó que el polen sea secado a 29°C.

### **3.6 DESCRIPCIÓN DE LA INFORMACIÓN OBTENIDA**

La primera información obtenida fue sobre la fenología reproductiva de la especie, que se consiguió mediante observación directa de las flores colectadas, en la cuales se corroboró que la deshidratación de las anteras se inicia a las 18h00. Se conoció el período de floración, el tamaño de las flores para *O. pyramidale* determinándose que pueden medir de 12 a 24 cm de largo y producir entre 0.6 hasta 1.2 gr de polen. Se comprobó los nutrientes (Sucrosa, ácido bórico y nitrato de calcio) que intervienen en la germinar del polen, así como el tiempo que inicia a germinar *in vitro*. Además se determinó el porcentaje de germinación del polen fresco, las temperaturas a las cuales pueden ser sometidos a secado el polen. También se conoció el contenido total de agua del polen fresco. Así mismo el contenido de humedad de los granos de polen después de ser sometidos a diferentes tiempos de secado. Se estableció que el polen puede ser almacenado a 5°C, a temperaturas bajo cero grados centígrados y en crio conservación. Consecuentemente también se conoció longevidad del polen fresco. Todo lo anterior mencionado llevó a determinar un protocolo para el almacenamiento del polen de *O. pyramidale*.

### **3.7 ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

El presente trabajo determinó la temperatura y el contenido de humedad propicios para el almacenamiento de polen de *O. pyramidale*. Una vez obtenida la información, se procedió a procesarla mediante el uso de hoja de cálculo Excel y del software InfoStat, calculándose: la media, desviación estándar y

valores mínimos. Para la comparación entre medias se usó la prueba de Kruskal-Wallis con 95 % de confiabilidad en razón que las distribuciones de los datos no resultaron normales.

### **3.8 CONSTRUCCIÓN DEL INFORME DE LA INVESTIGACIÓN**

El informe de investigación para el presente trabajo se lo realizó bajo las normas, formato y estructura que establece la Unidad de Posgrado de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, el mismo que comprende de seis capítulos. Entre sus contenidos están: la ubicación, contextualización y situación de la problemática, la delimitación del problema, objetivos, cambios esperados, metodología aplicada, procesamiento de los datos y análisis para los resultados, todo fundamentado en revisiones conceptuales, teóricas y legales. Finalizando con una propuesta alternativa a la investigación. Para la realización de este informe se contó con la colaboración de la Dra. C. Luz Cecilia García, quién ha realizado este tipo de investigación con *Nothofagus alpina*, en el proceso de estudio doctoral en la Universidad Austral de Chile.

**CAPÍTULO IV**  
**ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS**  
**RESULTADOS EN RELACIÓN CON LA**  
**HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN**

## 4.1 ENUNCIADO DE LA HIPÓTESIS

$H_0$  “El almacenamiento del polen de *O. pyramidale*, a largo plazo, no es posible bajo requerimientos térmicos y de humedad específicos.”

$H_1$  “El almacenamiento del polen de *O. pyramidale*, a largo plazo, es posible bajo requerimientos térmicos y de humedad específicos.”

### 4.1.1 Variables

Dependiente: Viabilidad del polen almacenado de *O. pyramidale*

Independientes: Temperatura, contenido de humedad

## 4.2 UBICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LA INFORMACIÓN EMPÍRICA PERTINENTE A LAS HIPÓTESIS

### 4.2.1 Determinación del medios idóneos para evaluar la viabilidad inicial y post almacenamiento del polen de *O. pyramidale*

Los resultados obtenidos para determinación de medio idóneo en la viabilidad inicial (polen fresco) y post almacenamiento indicaron que existe diferencia significativa entre los tratamientos (medio). Siendo el tratamiento 4 (compuesto por el 5 % de sucrosa, 20 mgL<sup>-1</sup> ácido bórico, 200 mgL<sup>-1</sup> nitrato de calcio), el más idóneo para evaluar la viabilidad inicial, con 72.72 % de germinación.

**Cuadro 2. Determinación del medio idóneo en la viabilidad de polen de *O. pyramidale***

Medios de cultivos	% germinación inicial	Sd		% germinación post almacenamiento	Sd	
M1	69.55	7.19	b	33.16	12.78	b
M2	56.00	4.58	ab	0.00	0	a
M3	70.14	2.88	b	40.39	22.55	b
M4	72.72	8.77	b	16.20	11.21	ab
M5	22.17	2.75	a	0.00	0	a
M6	56.80	24.18	ab	0.00	0	a

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

#### 4.2.2 Determinación del contenido de humedad del polen de *O. pyramidale* mediante métodos termogravimétricos

Como se puede observar en el cuadro 3, el contenido total de humedad (CH) del polen de *O. pyramidale* resultó el 49.80%. De este contenido de humedad se perdió un 31.5, 41.07, 44.90 y 45.34 al pasar por 60, 120, 180 y 240 minutos de secado respectivamente, lo que significó una pérdida del contenido de humedad inicial por encima del 90% cuando fue sometido a 180 y 240 minutos, es decir que prácticamente los granos de polen perdieron todo el agua libre que contiene (cuadro 4).

**Cuadro 3. Cálculo de contenido total de humedad (CH) en base del peso fresco**

r	Peso inicial	Peso seco	CH (%)
1	490.00	243.89	50.23
2	490.00	248.08	49.37
3	490.00	245.98	49.80
			49.80(±0.43)

**Cuadro 4. Contenido de humedad perdido después de tratamientos de secado en polen de *O. pyramidale***

Tiempo de secado	Peso inicial (gr)	Peso final (gr)	% CH <sup>1</sup> perdido respecto del peso total	(Sd)	% CH <sup>1</sup> restante	(Sd)	% CH perdido respecto del contenido de agua original	(Sd)	
60´	0.49	0.335	31.51	1.83	18.29	1.83	63.28	3.67	a
120´	0.49	0.288	41.07	0.04	8.73	0.05	82.46	0.09	ab
180´	0.49	0.269	44.91	0.18	4.89	0.18	90.19	0.36	b
240´	0.49	0.267	45.34	0.41	4.46	0.40	91.05	0.81	b

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

1. Contenido de humedad perdido respecto del contenido de humedad total calculado para el pool de polen (49.80%) (Cuadro 3)

#### 4.2.3 Viabilidad inicial y post almacenamiento de polen de *O. pyramidale*.

El polen fresco (evaluado antes de los tratamientos de secado) tuvo una viabilidad de 65.62%, a medida que fue sometido a diferentes tiempos de secado fue perdiendo su viabilidad, quedando con un 61.65% después de 240 minutos de secado (cuadro 5).

**Cuadro 5. Efecto del secado en la viabilidad del polen de *O. pyramidale***

Tiempo de secado (minutos)	% CH restante con respecto al contenido de agua original	% Germinación	(Sd)	
240	4.46	61.65	4.48	a
180	4.89	62.76	4.08	a
120	8.73	64.23	3.98	a
60	18.29	64.64	4.49	a
0	100	65.62	3.76	a

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

El polen almacenado perdió progresivamente su viabilidad a medida que transcurrieron los días en todas las temperaturas de almacenamiento y según su contenido de humedad. Todas las muestras secadas durante 60 minutos perdieron totalmente su viabilidad luego de 30 días de almacenamiento. Lo mismo ocurrió en las muestras secada por 120 minutos y almacenadas a 5°C, sin embargo los granos de polen de las muestras con igual tiempo de secado, almacenadas a -20 y -196°C perdieron el 91.77 y 92.76 % su viabilidad respectivamente en un lapso de 45 días. Los demás tratamientos de secados y almacenamientos mantuvieron viables los granos de polen por encima de una media del 80 % durante 45 días de almacenamiento (cuadro 6).

**Cuadro 6. Viabilidad del polen de *O. pyramidale* post el almacenamiento**

Tiempo de secado (minutos)	Temperatura de almacenamiento (°C)	% de germinación		
		15 días	30 días	45 días
				<b>65,62 (±3,76)</b>
<b>60´</b>	5	41,71 (±4,05)	6,73 (±2,57)	0
	-20	46,27 (±2,68)	17,65 (±3,28)	0
	-196	44,63 (±4,67)	41,89 (±3,88)	0
<b>120´</b>	5	47,10 (±2,47)	25,65 (±10,37)	0
	-20	44,07 (±5,70)	15,90 (±3,07)	5,61 (±3,28)
	-196	45,33 (±7,48)	39,63 (±5,53)	4,65 (±3,59)
<b>180´</b>	5	61,75 (2,37)	53,15 (2,69)	50,25 (±5,77)
	-20	52,57 (±2,70)	37,03 (±5,19)	31,10 (±4,01)
	-196	64,26 (±3,07)	63,96 (±2,91)	52,88 (±6,51)
<b>240´</b>	5	61,66 (±1,57)	59,54 (±0,93)	58,9 (±6,74)
	-20	65,27 (±2,22)	63,58 (±4,56)	58,24 (±6,47)
	-196	64,68 (±1,30)	63,44 (±1,88)	57,99 (±6,23)

#### 4.2.4 Determinación de la temperatura y contenido de humedad adecuados para un óptimo almacenamiento de polen de *O. pyramidale*.

Según los resultados obtenidos en el cuadro 7, indicaron que la temperatura de almacenamiento y el tiempo de secado a los que fueron sometidos los granos de polen incidieron en la viabilidad a medida que transcurrió los días de

almacenamiento. Los mejores tratamientos fueron aquellos granos de polen secado durante 240 minutos a temperatura 29°C y 45 % HR, es decir que fueron almacenados con el 4,46 % de su contenido original de agua, lo que permitió mantener el 94.69 % (media respecto a las tres temperatura de almacenamiento) viables los granos de polen en el lapso de 45 días.

**Cuadro 7. Efecto de la temperatura y contenido de humedad en la viabilidad del polen almacenado de *O. pyramidale***

Temperatura de almacenamiento (°C)	Tiempo de secado	% CH restante	% Germinación luego del secado	% de germinación		
				15 días	30 días	45 días
5				41,71 (±4,05)	6,73 (±2,57)	0
-20	60´	18,28	64,64 (±4,49)	46,27 (±2,68)	17,65 (±3,28)	0
-196				44,63 (±4,67)	41,89 (±3,88)	0
5				47,10 (±2,47)	25,65 (±10,37)	0
-20	120´	8,73	64,23 (±3,98)	44,07 (±5,70)	15,90 (±3,07)	5,61 (±3,28)
-196				45,33 (±7,48)	39,63 (±5,53)	4,65 (±3,59)
5				61,75 (2,37)	53,15 (2,69)	50,25 (±5,77)
-20	180´	4,89	62,76 (±4,08)	52,57 (±2,70)	37,03 (±5,19)	31,10 (±4,01)
-196				64,26 (±3,07)	63,96 (±2,91)	52,88 (±6,51)
5				61,66 (±1,57)	59,54 (±0,93)	58,9 (±6,74)
-20	240´	4,46	61,65 (±4,48)	65,27 (±2,22)	63,58 (±4,56)	58,24 (±6,47)
-196				64,68 (±1,30)	63,44 (±1,88)	57,99 (±6,23)
5				61,66 (±1,57)	59,54 (±0,93)	58,9 (±6,74)

Según el test de Kruskal Wallis (cuadro 8) existen diferencias significativas para los tratamientos de secados referente al contenido de humedad que tuvieron los granos de polen al momento de su almacenamiento. Sin embargo el mejor almacenamiento para el polen de *O. pyramidale* no fue determinado a una temperatura y contenido de humedad específico, ya que no existió diferencias significativas entre las temperaturas de almacenamientos, para los polen almacenados con el 4.46 % de contenido de humedad.

**Cuadro 8. Medias del polen de *O. pyramidale* almacenado a diferentes temperatura y contenido de humedad, durante un lapso de 45 días**

Contenido de humedad	Temperatura de almacenamiento	Medias	(Sd)	
4,46	5	58.90	6.74	c
	-20	58.24	6.48	c
	-196	57.99	6.23	c
4,89	5	50.25	5.77	bc
	-20	31.1	4.01	bc
	-196	52.88	6.51	bc
8,73	5	0	0	a
	-20	5.61	3.28	ab
	-196	4.64	3.59	ab
18,28	5	0	0	a
	-20	0	0	a
	-196	0	0	a

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

La figura 4, muestra que los granos de polen almacenados a 5°C y a -20°C sometidos a 60 y 120 minutos perdieron abruptamente su viabilidad, este comportamiento difiere con el tratamiento de los granos de polen almacenados a -196°C de igual secado donde la pérdida de la viabilidad entre los 15 y 30 días no fue significativa. También se puede observar que el comportamiento de la viabilidad de polen difiere según la temperatura de almacenamiento.

Los granos de polen sometidos a 240 minutos y almacenados a 5°C, -20°C y -196°C, resultaron los mejores tratamientos con 58,9; 58,24 y 57,99 % de germinación respectivamente, donde no existe diferencias significativa entre ellos. La pérdida de la viabilidad del polen se perdió a los 30 días de almacenamiento para las muestras sometidas a secado a 60 y 120 minutos (figura 5).

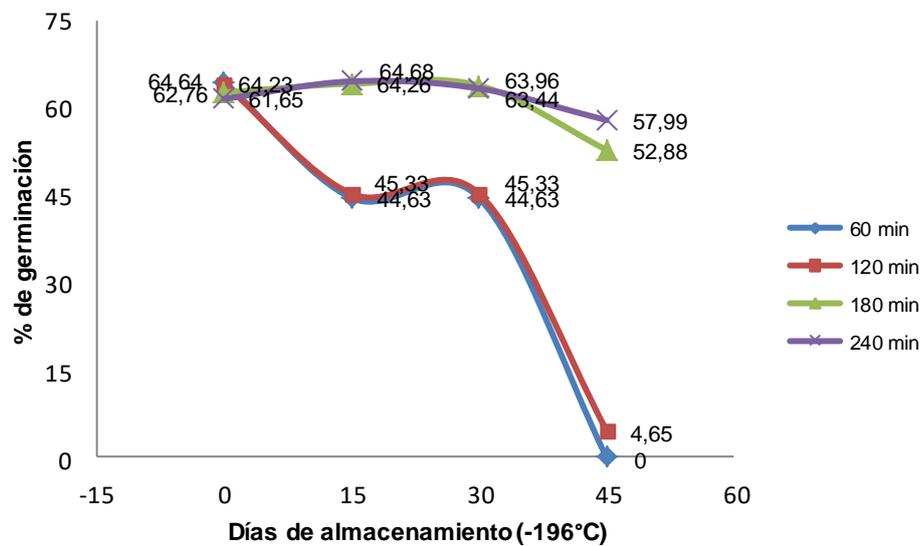
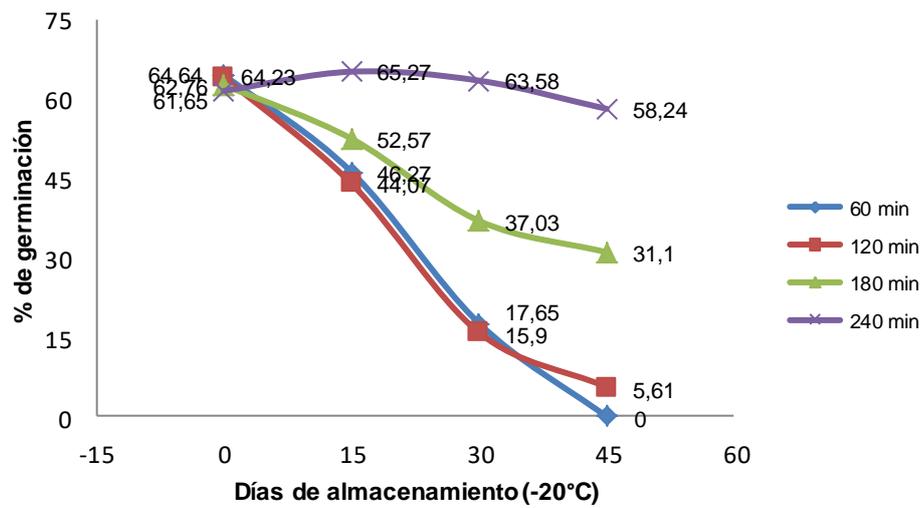
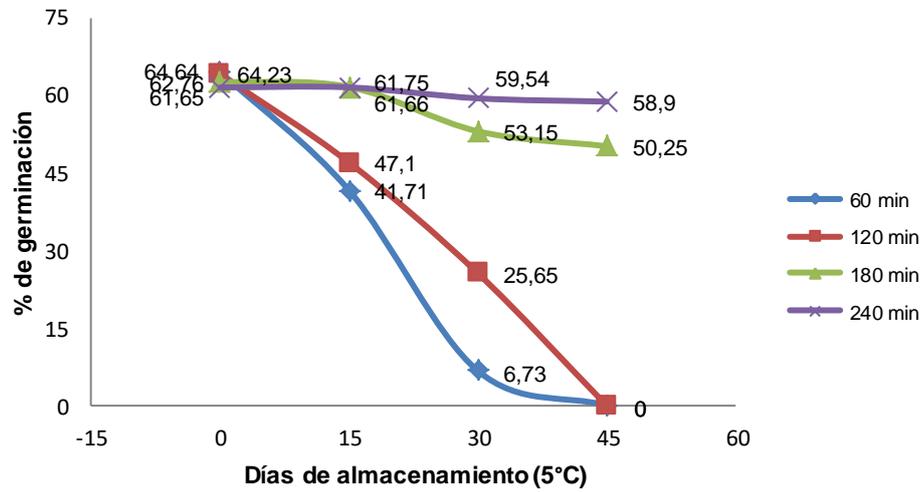


Figura 4. Viabilidad del polen de *Ochroma pyramidale* almacenado en diferentes condiciones de contenido de humedad y temperatura

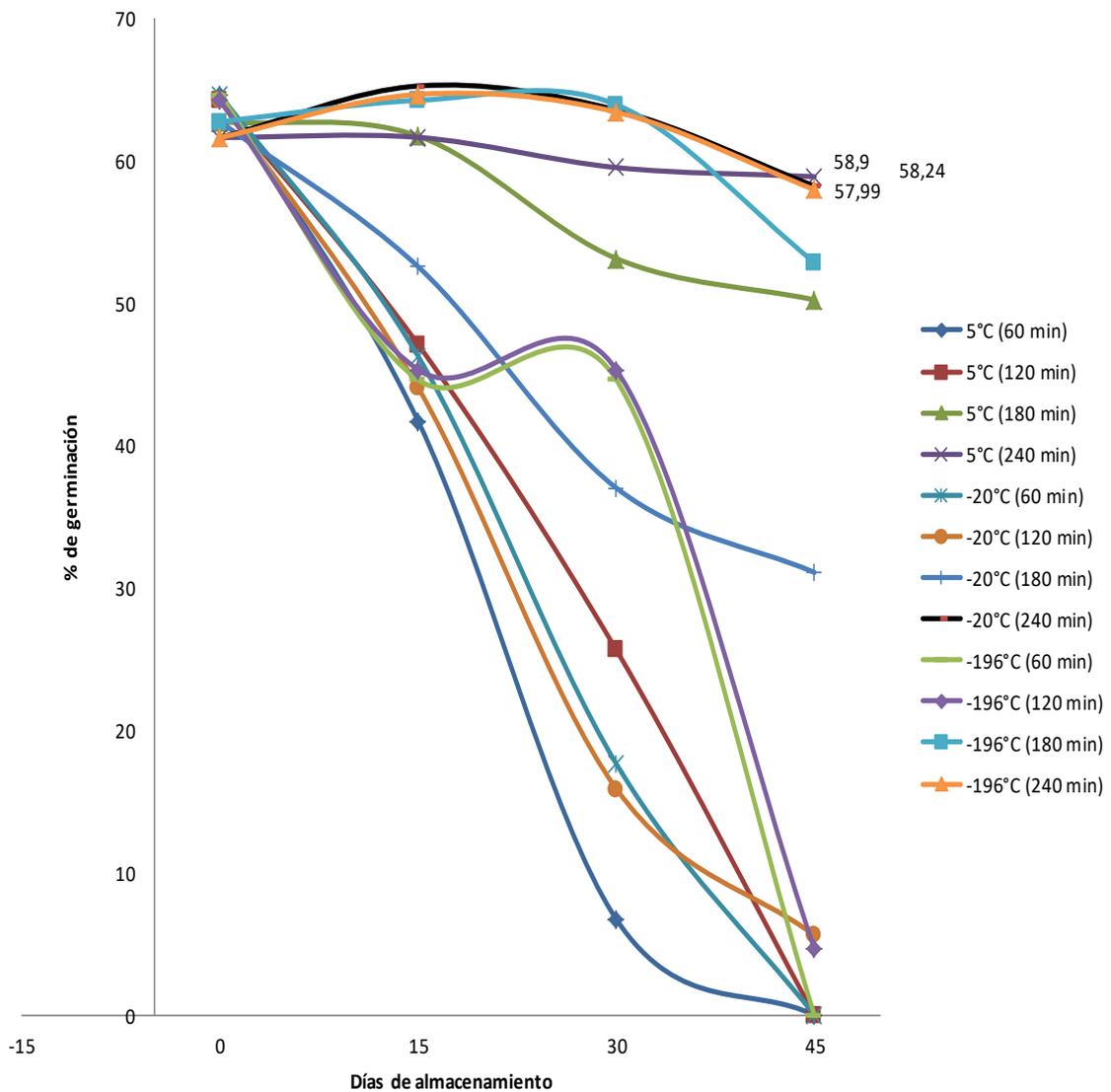


Figura 5. Viabilidad del polen de *Ochroma pyramidale* almacenado en diferentes condiciones de contenido de humedad y temperatura

#### 4.3 DISCUSIÓN DE LA INFORMACIÓN EMPÍRICA PERTINENTE A LAS HIPÓTESIS

No existen trabajos referentes a germinación *in vitro* y almacenamiento del polen de *O. pyramidale*, sin embargo se han realizados estudios similares a este trabajo de germinación *in vitro*, viabilidad y almacenamiento de polen para: *Nothofagus alpina* (García 2014), *Aechmea bicolor* (Souza et al. 2014),

*Mangifera indica* (Gehrke 2011), *Phoenix dactylifera* (Mortazavi 2010), *Annona cherimola* (Lora 2006), *Olea europaea* L., *Citrus maxima* Merr., *Citrus paradisi* Macfad., *Prunus persica* L., y de *Prunus domestica* L (Ahmad 2005).

La metodología descrita por Brewbaker y de Kwack (1963) a partir de un medio compuesto por; sacarosa 10%, ácido bórico 100 mg/L, nitrato de calcio 300 mg/L, sulfato de magnesio 200 mg/L, nitrato de potasio 100 mg/L, permitió determinar el medio idóneo para la evaluación de la viabilidad del polen fresco y post almacenamiento de *O. pyramidale*, así como para varias especies: *Aechmea bicolor* (Souza et al. 2014), *Olea europaea* (Alba et al 2011), *Curcubita maxima* (Marini 2010), *Prunus dulcis* (Marínez et al. 2002) *Theobroma cacao* (Esteve et al. 2009) *Pseudotsuga menziesii* (Merlo et al. 2001), *Banksia menziesii* (Maguire and Sedgley 1997) y *Protea magnifica*, *P. aristata*, *P. repens*, y *P. eximia* (Van der Walt and Littlejohn 1996) en concentraciones equivalentes.

El medio más idóneo para la evaluación de la viabilidad del polen de *O. pyramidale* mediante la germinación *in vitro*, estuvo compuesto por el 10 % de sucrosa, 30 mgL<sup>-1</sup> ácido bórico, 430 mgL<sup>-1</sup> nitrato de calcio, con 65.62 % de germinación en polen fresco. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Souza et al. (2014), para *Aechmea bicolor* con una germinación inicial por encima del 90 % de germinación y con Marini (2010) para *Curcubita maxima* con 28.69 %, en medios de cultivo que contienen: sucrosa, ácido bórico y nitrato de calcio en proporciones similares.

Mediante métodos termogravimétricos el contenido total de humedad del polen fresco de *O. pyramidale* resultó el 49.80 %, lo que resultó similar para *Nothofagus alpina* (García 2014) con 40.19% de contenido total de humedad. Este método de desecamiento permitió almacenar a 5°C, -20°C y -196°C el polen de *O. pyramidale* por debajo del 5 % de su contenido de humedad,

manteniendo la viabilidad de los granos de polen >90% con respecto a la viabilidad del polen que fueron almacenados. Otras especies también han logrado almacenarse con bajos contenidos de humedad, tales como; *Pinus tecunumanii*, *P. taeda*, *P. greggii*, *P. oocarpa*, *P. maximinoi*, y *Pinus patula* (Tighe 2004) con el 6-8 % de contenido de humedad para condiciones de refrigeración y del 3-5 % para congelación y crio conservación. Estos resultados de almacenamientos de polen, con muy bajos contenido de humedad pudieron haber evitado la detección de la respiración fisiológica del polen como lo menciona Hoekstra (1992), o el proceso de desecación por debajo del 20% de contenido de humedad, pudo haber extraído todo el agua libre (disponible) para transporte intracelular, disminuyendo prácticamente la actividad fisiológica del polen. Manteniendo su viabilidad inicial de almacenamiento, puesto que si el polen está activo fisiológicamente bajo cualquier tipo de almacenamiento, la viabilidad disminuye rápidamente.

Por otra parte los resultados obtenidos en el almacenamiento del polen de *O. pyramidale* con muy bajo contenido de humedad, pudo ser consecuencia de una estabilidad en las membranas de los granos de polen deshidratados como lo menciona Shivanna y Heslop-Harrison (1981) citado por García (2014), lo que implica una reorganización molecular en las membranas del polen como resultado de la deshidratación. Dicha reorganización molecular evita alteraciones irreversibles en la estructura de la membrana, de tal forma que estas pueden regenerarse durante el proceso de la rehidratación del polen por la absorción de agua y recuperar sus funciones normales.

Los granos de polen almacenados a 5°C, -20°C y -196°C con contenidos de humedad por encima de 8 % no germinaron luego de los 30 días de almacenamiento. Esta pérdida de viabilidad del polen puede haber ocurrido por que el rompimiento de las membranas del polen como indica Shivanna y Jhori

(1985) citado por García (2014) a causa de la formación de cristales cuando los granos de polen son almacenados con altos contenidos de humedad.

La temperatura óptima para el almacenamiento del polen de *O. pyramidale* fue a  $-196^{\circ}\text{C}$  con 52.88 y 57.99 % de germinación, en las muestras almacenadas con 4.46 y 4.89 % de contenido de humedad respectivamente. Sin embargo, los granos de polen almacenados a  $5^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$  con 4.46 % de contenido de humedad, mostraron excelentes resultados. Estos resultados concuerdan con Lora *et al.* (2006), quienes almacenaron polen de *Annona cherimola* (Mill) a  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  y  $-196^{\circ}\text{C}$  durante un máximo de 3 meses obteniendo 10.4, 14.2 y 13.6 % de germinación respectivamente, y con van der Walt and Littlejohn (1996) quienes almacenaron polen de *Protea magnifica*, *P. aristata*, *P. repens*, y *P. eximia*, de cuatros procedencias durante 360 días, los mejores resultados fueron para las muestras almacenadas a  $-196^{\circ}\text{C}$  donde tres de las cuatros precedencias lograron porcentajes de germinación muy altos ( $> 80\%$ ) como del polen fresco. Sin embargo el polen procedente de Aristocrat solo perdió el 25% de su viabilidad con respecto al polen fresco. Lo que explica que la temperatura y el contenido de humedad son los factores más importantes en el almacenamiento de polen, y el límite inferior de tolerancia a la desecación depende de la especie (Towill 1985).

#### **4.4 COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS**

Para determinar el efecto de la temperatura y secado en la viabilidad de polen almacenado de *O. pyramidale*, se evaluaron la viabilidad inicial y post almacenamiento, mediante la germinación *in vitro*. Por lo cual se realizó la verificación de la variable dependiente planteando las siguientes hipótesis:

$H_0$  “El almacenamiento del polen de *O. pyramidale*, a mediano plazo, no es posible bajo requerimientos térmicos y de humedad específicos.”

$H_1$  “El almacenamiento del polen de *O. pyramidale*, a mediano plazo, es posible bajo requerimientos térmicos y de humedad específicos.”

Los análisis estadísticos no paramétricos, determinaron que las muestras almacenadas a 5°C, -20°C y -196°C con el contenido de humedad por debajo del 5 %, lograron conservar más del 90% viables los granos de polen con respecto a la viabilidad que fueron guardados. Sin embargo la temperatura también influye directamente en el almacenamiento de polen, debido a que las muestras guardadas a -20°C con un contenido de humedad >8 % de perdieron su viabilidad luego de 30 días de almacenamiento. En síntesis se puede deducir que la temperatura y el contenido de humedad tienen una estrecha relación en el almacenamiento, lo que corresponde es conocer la temperatura y el contenido de humedad más propicio para cada especie.

Al mantener el mas del 90% de los granos de polen viables, con respecto a la viabilidad que fueron almacenados por el lapso de 45 días se acepta  $H_1$  = “El almacenamiento del polen de *O. pyramidale*, a mediano plazo, es posible bajo requerimientos térmicos y de humedad específicos” y se rechaza la  $H_0$ .

**CAPÍTULO V**  
**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## 5.1 CONCLUSIONES

El tamaño de la flor de *O. pyramidale* oscila entre los 12 y 24 cm de largo, lo que permite producir entre 0.68 y 1.24 gr de polen, en relación al tamaño de la flor.

El medio más idóneo para la evaluación de la viabilidad del polen fresco y post almacenamiento es el compuesto por el 10 % de sucrosa, 30 mgL<sup>-1</sup> ácido bórico, 430 mgL<sup>-1</sup> nitrato de calcio, en donde se ha obtenido una media del 65, 62% de germinación para los granos de polen fresco.

Mediante métodos termogravimétricos, el contenido de humedad total con respecto al contenido de agua original del polen fresco de *O. pyramidale* fue de 49.80%.

La temperatura y el contenido de humedad óptimos para el almacenamiento del polen de *O. pyramidale* fue a -196°C y 4.46 % respectivamente.

No obstante las muestras almacenadas 5°C, -20°C y -196°C el polen de *O. pyramidale* con 4,89 % de contenido de humedad, manteniendo la viabilidad de los granos de polen >90% con respecto a la viabilidad del polen que fueron almacenados

No obstante, el almacenamiento de polen de *O. pyramidale* en -196°C es importante para el almacenamiento a largo plazo, con fines de conservación de los recursos genéticos, para la polinización dirigida y el mejoramiento de la especie. Se puede almacenar de el polen de *O. pyramidale* de manera

eficiente a 5°C y -20°C con un contenido de humedad del 4.46 y 4.89% a corto y mediano plazo.

La cantidad de polen producido por flor y ocurrencia de floración de *O. pyramidale* en dos temporadas, permite usar esta técnica de almacenamiento como una herramienta viable, de tal manera que se puede programar de manera cruzas dirigidas durante casi todo el año, evitando la necesidad de recoger el polen al día para llevar a cabo polinizaciones dirigidas al día siguiente.

## **5.2 RECOMENDACIONES**

Evaluar las muestras almacenadas hasta llegar a determinar la longevidad del polen en cada uno de los tratamientos, de tal manera que se pueda establecer la temperatura óptima de almacenamiento para *O. pyramidale* a largo plazo.

Evaluar bajo la misma metodología otras temperaturas de almacenamiento y calcular la factibilidad técnica y económica de esta actividad.

Evaluar el polen de los diferentes individuos de *O. pyramidale*, que se utilizan como parentales para la obtención de las semillas para la producción de plántulas con las que la empresa 3A & Plantabal S.A establece sus plantaciones.

**CAPÍTULO VI.**  
**PROPUESTA ALTERNATIVA**

## **6.1 TÍTULO DE LA PROPUESTA.**

Plan de mejoramiento para *O. pyramidale* mediante polinización dirigida.

## **6.2 JUSTIFICACIÓN**

Las plantaciones de *O. pyramidale* sigue siendo una excelente alternativa económica para grandes empresas y pequeños productores, principalmente por el ciclo de corta final (cuatro años), puesto riegos. Para el establecimiento, manejo y aprovechamiento de la balsa estos riegos se reducen a enfermedad como pata roja, corazón de agua y otras enfermedades. Todo esto indica que es eminentemente necesario emprender programas de mejoramiento genético para esta especie nativa, mediante cruzamientos dirigidos (polinización manual) lo que garantizará conservar la diversidad genética de la especie y todos los beneficios que conlleva la misma.

La propagación sexual de *O. pyramidale* es excelente, llegando a alcanzar hasta el 90% de germinación de su semillas, la empresa Plantabal S. A. mantiene un éxito total en almacenamiento y manejo de semillas almacenadas por 10 años, lo que se ha permitido comprobar no pierde que las semillas pueden mantener un alto porcentaje de su viabilidad inicial en el lapso de 10 años. Por estas razones el mejoramiento genético de esta especie con miras de producir semillas mejoradas y certificadas.

## **6.3 OBJETIVOS**

### **6.3.1 Objetivo general**

Proponer un plan de mejoramiento para *O. pyramidale* mediante polinización dirigida.

### **6.3.2 Objetivos específicos**

Proponer el almacenamiento de polen de los mejores genotipos según el ranking de ganancia genética del banco de especie *O. pyramidale*

Proponer el establecer de un huerto semillero por selección individual, con altura promedio de tres metros.

Plantear el establecimiento de un ensayo de procedencia de primera generación mediante cruzamientos dirigidos

## **6.4 IMPORTANCIA**

La empresa 3A Composites & Plantabal S.A. actualmente disponen de un huerto semillero de más de 80 familias de procedencia, de este germoplasma

se realizaron los ensayos y se utilizó para el desarrollo de la presente tesis. Estos avances, los conocimientos de biología reproductivas obtenidos en este estudio, las investigaciones por parte de la empresa le suman importancia a esta propuesta, puesto que estos avances son herramientas para la toma de decisiones para el mejoramiento de *O. pyramidale* que viene desarrollando Plantabal S.A. la conservación de material genético así como el mejoramiento de las especies no solo nos permite conservar dicho material, pues a esto se le suma ventajas desde el punto de vista ecológico, social y económico. Puesto que Swofford y Smith, (1972) afirman que algunos análisis financieros de programas de mejoramiento genético forestal, con especies de rápido crecimiento en climas tropicales y subtropicales, han llegado a obtener una tasa de retorno del 10 %.

## **6.5 UBICACIÓN SECTORIAL Y FÍSICA**

La zona de la provincia de Los Ríos y Guayas han demostrado tener condiciones climáticas y de logísticas favorables para el establecimiento y producción de madera de *O. pyramidale* de exportación. Sin embargo se plantea el establecimiento de un nuevo huerto semillero con altura de dosel de tres metros, procedente de las 85 familias o de las 20 mejores familias según el ranking de ganancia genética. El área en el cual se deberá establecerse en nuevo huertos semillero debe estar alejada de las plantaciones ya existentes, de manera que se evite el flujo genético por medio de la polinización natural.

Además la presente propuesta plantea el establecimiento de un ensayo de procedencia de primera generación mediante polinización dirigida, el área para este ensayo deberá ser determinada según los resultados obtenidos del

estudio de calidad de sitio que la empresa ha realizado. También se puede considerar establecer el mis ensayo en diferentes sitios, para evaluaciones de tal manera que se validen los resultados de la calidad de sitio de *O. pyramidale*.

Tanto la provincia de Los Ríos como Guayas corresponden a sectores agroforestales en donde las plantaciones de *Tectona grandis* y *O. pyramidale* ocupan grandes áreas de estas provincias. Es por ello que el sector local será beneficiado mediante fuentes de trabajo y el sector nacional e internacional será beneficiado por la calidad de la madera a ser producida.

## **6.6 FACTIBILIDAD**

En el ámbito social la empresa 3A Composites & Plantabal cuenta con los recursos humano, material, legal y financiero para el emprendimiento a mejoras en sus producciones. La misma que cuenta actualmente con la certificación FSC u otras normas para dentro del desarrollo de sus actividades.

## **6.7 PLAN DE TRABAJO**

En la iniciación de un programa de mejoramiento genético forestal es indispensable tener en cuenta dos fases: operativa (producción) y desarrollo (investigación) (Zobel y Talbert 1988).

La empresa 3A Composites & Plantabal consta con análisis de ganancia genética entre familias de su huerto semillero, lo que da ventaja para que el

plan de trabajo inicie desde el establecimiento de una nueva precedencia a partir de los mejores genotipos según el ranking de los árboles plus.

De igual manera la empresa en miras a mejoras de sus plantaciones Plantabal S.A. está realizando evaluaciones preliminares en base a cuatro criterios fenotípicos: rectitud, forma de copa, altura de poda y volumen. Todo esto da ventaja para que el plan de mejoramiento inicie y se establezca individuos con base fundamentadas.

Se propone dentro de la fase operativa el establecimiento de huerto semillero y recolección de polen y dentro de la fase de investigación el almacenamiento de polen y pruebas de polinización dirigida.

Como se propone el establecimiento de un nuevo huerto semillero, las actividades iniciales deberán estar dirigida a esta actividad, sin embargo dentro de la fase operativa también se contempla la recolección de flores en el campo para el almacenamiento de polen, dicha actividad deberá iniciar una vez que la plantación tenga un fructificación buena, ya que no hay que olvidar los factores ambientales e intrínsecos que influyen en los procesos fisiológicos e inciden directamente en la floración y fructificación. Si no se consideran los factores importante como la edad fisiológica de los árboles, el polen a ser almacenado podría no ser muy viable.

**Cuadro 9. Plan de trabajo de la propuesta del plan de mejoramiento genético para *O. pyramidale***

Proyecto	Objetivo General	Objetivos específicos	Actividades	Responsable
Propuesta de un plan de mejoramiento para <i>O. pyramidale</i> mediante polinización dirigida	Desarrollar un plan de mejoramiento para <i>O. pyramidale</i> mediante polinización dirigida.	Establecer un huerto semillero de primera generación a través de la reproducción sexual	Fase Operativa	
			Análisis de resultados de evaluaciones fenotípicas. Selección de individuos en base a los resultados analizados. Determinación del área para establecer el nuevo huerto semillero	Gerente del departamento de Investigación y Desarrollo
			Recolección de semillas del huerto en la Hacienda MS14	Supervisor de mejoramiento genético Trabajadores
			Producción de plantas en vivero	Supervisor de vivero
			Establecimiento de huerto semillero en bloques completamente al azar con cinco repeticiones.	Gerente del I& D Sup. Mejorameinto genético. Trabajadores
			Mantenimiento de huerto semillero	Sup. Mejorameinto genético. Trabajadores
			Almacenar polen de los mejores individuos según el ranking de G.G.	Recolección de flores Extracción de polen Pruebas de germinación <i>in vitro</i> Secado y almacenamiento de polen Evaluaciones de viabilidad mediante germinación <i>in vitro</i> cada 7 días los primeros 2 meses

		Mejorar la procedencia mediante polinización dirigida	Fase de investigación	
			Estudio de biología floral de <i>O. pyramidale</i>	Supervisor de Mejoramiento genético
			Establecimiento de protocolo para la polinización dirigida en <i>O. pyramidale</i>	
			Ensayos de polinización dirigida con polen fresco y polen almacenado	
			Recolección del germoplasma mejorado	
		Producción de plantas en vivero con material mejorado	Sup. Vivero Trabajadores	
		Ensayos de procedencias	Supervisor de Mejoramiento genético Trabajadores	
		Ensayos de procedencia mediante clones de las plantas mejoradas producidas a nivel de vivero		
		Evaluar resultados obtenidos		
		Evaluaciones de producción (volumétricas)		
Evaluaciones con enfoques de resistencia a enfermedades y plagas				

## 6.8 ACTIVIDADES

Antes de cualquier toma de decisión a seguir con el mejoramiento de *O. pyramidale* se recomienda establecer una matriz de problemas y eventos suscitados dentro del establecimiento, producción y comercialización de la madera de *O. pyramidale*, de manera que se establezcan los objetivos, metas a cumplir. Por lo que ejecutar un plan de mejoramiento genético forestal conlleva años de investigación con múltiples actividades a nivel de campo y laboratorio, en tales razones detallaremos las siguientes actividades relevantes:

- ✓ Análisis de resultados de evaluaciones fenotípicas y selección de individuos en base a los resultados analizados, los mismos que se considerarán árboles semilleros.

- ✓ Determinación del área para establecer el nuevo huerto semillero
- ✓ Recolección de semillas del huerto en la Hacienda MS14
- ✓ Producción de plantas en vivero con semillas obtenidas de los mejores individuos según el ranking de G.G.
- ✓ Establecimiento de huerto semillero en bloques completamente al azar con cinco repeticiones. Mantenimiento de huerto semillero (diseño en bloques completamente al azar)
- ✓ Control de poda y Raleo
- ✓ Recolección de flores y extracción de polen
- ✓ Pruebas de germinación *in vitro* y secado y almacenamiento de polen
- ✓ Evaluaciones de viabilidad mediante germinación *in vitro* cada 7 días los primeros 2 meses Estudio de biología floral de *O. pyramidale*
- ✓ Establecimiento de protocolo para la polinización dirigida en *O. pyramidale*
- ✓ Ensayos de polinización dirigida con polen fresco y polen almacenado
- ✓ Recolección del germoplasma mejorado
- ✓ Producción de plantas en vivero con material mejorado
- ✓ Ensayos de procedencias mediante clones de las plantas mejoradas

- ✓ Evaluaciones de producción y con enfoques de resistencia a enfermedades y plagas
- ✓ Evaluar la variabilidad presente en las poblaciones incluidas en el proyecto y para ello es necesario diseñar y establecer las pruebas genéticas que permitan la evaluación sistemática del desempeño de las progenies.

## **6.9 RECURSOS ADMINISTRATIVOS, FINANCIEROS O TECNOLÓGICOS**

3A Composites cuenta con laboratorios, herramientas, materiales y personal capacitado e idóneo para el desarrollo de las actividades antes descritas. Sin embargo se aconseja reactivar el presupuesto del Departamento de investigación y desarrollo, para la adquisición de nuevos y mejores equipos tecnológicos que garantizarán la precisión de los resultados obtenidos para esta propuesta. El costo para la realización de la presente propuesta es de 15'000.00 dólares americanos.

## **6.10 IMPACTO**

Los impactos que se provee desde el punto social y ambiental serán positivos; entre ellos tenemos creación de plazas de trabajo, ganancia genética, mantenimiento de diversidad genética u otros beneficios que brindan las plantaciones con el medio ambiente. Además la empresa establece sus plantaciones mediante el uso de buenas prácticas de manejo.

## 6.11 EVALUACIÓN

Con ya se mencionó en líneas anteriores el ejecutar un plan de mejoramiento conlleva a múltiples actividades y procesos investigativos a nivel de campo y laboratorio por tal razones se recomienda realizar un sin números de evaluaciones, principalmente a la variables dasométricas (DAP, altura total y comercial) y las características fenotípicas (bifurcación, rectitud del tronco, poda, grosor de las ramas, y ángulo de las ramas)

Los parámetros que se deben consideran en la siguiente propuesta son:

Bifurcación

- a) Ninguna
- b) Al nivel del suelo
- c) Más arriba

Rectitud del fuste

- a) Recto, desviación de una línea vertical menos de 25 % del diámetro del tronco.
- b) Poco doblado, desviación de una línea vertical entre 25 y 50 % del grosor del tronco.
- c) Muy doblado, desviación de una línea vertical más del 50 % de grosor del tronco.

Capacidad de auto-poda

- a) Buena,

- b) Aceptable
- c) Mala

#### Grosor y ángulo de ramas

- a) Delgada, ramas menos del 10 % del grosor del tronco y ángulo recto
- b) Normales, ramas entre 10 y 20 % del grosor del tronco, ángulo entre 30 y 90°
- c) Gruesas, ramas más de 20 % del grosor del tronco, ángulo menor de 90°

Para el raleo se recomienda utilizar el Índice de Espaciamiento Relativo de Hart citado por Bravo *et al.* (1997). Para evaluar el número de árboles a ralear, con base en este índice, se hizo uso del siguiente modelo matemático:

$$S \% a = \sqrt{10,000 / N} \times 100 / h \text{ dom}$$

$$Nq = (\sqrt{1000 \times 100})^2 / (S \% d \times h \text{ dom})^2$$

$$Nr = N - Nq$$

Donde:

S %a = índice de espaciamiento relativo antes del raleo

S %d = índice de espaciamiento relativo deseado

N = número de árboles/ha antes del raleo

Nr = número de árboles /ha a ralear

Nq = número de árboles /ha que quedan después del raleo

hdom = altura dominante con base en los 100 árboles más gruesos/ha

## 6.12 BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad A. 2005. Improving in vitro Pollen Germination of Five Species of Fruit Trees. *Dirasat, Agricultural Sciences*. 32; 189-194.
- Alva M. 2012. Viabilidad del polen de palma híbrida en códigos atrayentes de insectos *Elaeudobius camerunicus* y *grassidius* en el cultivo de palma africana para incrementar la producción. Ecuador. 46p.
- Andrade P. 2007. Estandarización de la Técnica de rescate de embriones en *Alstroemeia*. 67p.
- Anero M. 2008. Aerobiología y polinosis en Castilla y León. Valladolid. Junta de Castilla y León. 117p
- Aragón C. 2006. Evaluación de la viabilidad y germinabilidad del polen del cultivar Du Chilly y de la selección clonal Santa Rosa de Avellano europeo (*Corylus avellana* L.). Valdivia -Chile.
- Astudillo M. 2006. Evaluación de métodos de conservación de polen sometidos a distintos tiempos de almacenaje en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). C Valparaíso - Chile.
- Barath M. 1975. Catalogo sistemático dos polens das plantas arbóreas do Brasil Meridional XVII - Malvaceae. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 73: 1-29.
- Bravo F. Montero G y Miren del Río. 1997. *Ecología*, N°11.p177-187.
- Cadena S. 1962. Efectos de la deshidratación por sublimación al vacío sobre la viabilidad del polen de cacao y su preservación. Ecuador.75p

- Carmona M. 2012. Descubre la biología reproductiva vegetal. Consultado 16 mar. 2015. Disponible en [www.biologiareproductiva1.blogspot.com](http://www.biologiareproductiva1.blogspot.com)
- Cornejo M. 1962. Efectos del congelamiento-seco sobre la viabilidad del polen en cacao y almacenamiento. 71p.
- Culhane K. y Blackmore S. 1988. Malvaceae: la flora polen del noroeste de Europa, 5. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Países Bajos. (Tomado de Revisión de Paleobotánica y Palinología. 57: 45-74)
- Dafni, A. (1992). Pollination Ecology: A practical Approach. Nueva York.6;776p
- Dafni A. and Firmage D. (2000): Pollen viability and longevity: Practical, ecological and evolutionary implications. Plant. System. Evol., 222: 113-132.
- Díez C. 2002. Notas de ecología forestal. biología reproductiva de las plantas de los bosques tropicales. Medellín - Colombia.
- Francis K. 1991. Ochroma pyamidale Cav. Balsa. SO-ITF-SM-41. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. Consultado 12 feb. 2015, de Disponible en [www.fs.fed.us](http://www.fs.fed.us)
- Franklin C. 1981. Pollen manegement handbook. Washington, DC. USDA. 98p.
- Tivo Y. and Iglesias L. 2003. Evaluación del polen en Pinus hartwegii Lindl. Del Cofre de Perote, Veracruz, México. Foresta Veracruzana. 5; 41-48.

- Ganeshan S. Rajasekharan P. Shashikumar S. and Decruze W. 2008. Cryopreservation of pollen. Plant cryopreservation: a practical guide. New York: Springer. 443-447.
- García L. (2014). Biología de reproductiva de *Nothofagus alpina*. Valdivia - Chile.
- Gehrke M. Castillo A. Ruiz C. y Moreno J. (2011 ). Viabilidad y germinación del polen *Mangifera indica* en cuatro sitios diferentes en México (Mazatán, Tapachula, Suchiate y Tuzantán). INTERCIENCIA, V:35, 378 - 385.
- Gonzales B. Cervantes X. Torres E. Sánchez, C. y Simba L. 2010. Caracterización del cultivo de balsa (*Ochroma pyramidale*) en la provincia de Los Ríos - Ecuador. Ciencia y Tecnología. 11.
- Hanna N. 1994. Pollen storage in frostless and conventional frost-forming freezers. Crop Science. 34: 1681-1682.
- Hoekstra A. 1992. Stress Effects on the Male Gametophyte. In: Cresti, M. and Tiezzi, A. Sexual Plant Reproduction. Springer-Verlag, Berlin. pp. 193-201
- Huidobro S. Muniategui L. 1986. El polen; Determinación del contenido de agua. *Offarm* 5: 73- 77.
- Jaramillo P. y Trigo M. 2011. Guía rápida de Polen de las Islas Galápagos. Fundación Charles Darwin -Parque Nacional Galápagos - Universidad de Málaga. Ecuador. 260p.
- Krell R. 1996. Value-added products from beekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin. Consultado 05 jun. 2015 Disponible en [www.fao.org](http://www.fao.org).

- Lora J. Pérez de Oteyza M. Fuenetaja P. and Hormaza J. 2006. Low temperature storage and in vitro germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) pollen. *Scientia Horticulturae*. 108;91-94.
- Maita S. 2006. Fenología de la floración de las especies *heilbornii*, *cundinamancensis*, *palandensis*, *stipulata* de género *Vasconcellea*, en la colección *ex - situ* del INIAP. Ecuador.
- Martínez J. 2012. Setenta y Dos Años Creciendo Juntos. Guayaquil. Ecuador. 80p
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. 2004. Norma para el aprovechamiento de madera en bosques cultivado y árboles en sistemas agroforestales. Quito - Ecuador.
- Morales E. y Fernández B. 2012 El estudio del polen antiguo: problemas y estrategias en el laboratorio. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. México. 15:62-66.
- Moreno M. Peña P. Oleas N. 2013. Biología reproductiva de dos géneros de plantas de la familia *Amaryllidaceae* en el Distrito Metropolitano de Quito.
- Mortazavi S. Arzani K. and Moieni A. 2010. Optimizing Storage and In vitro Germination of Date Palm (*Phoenix dactylifera*) Pollen. . *Journal of Agricultural Science and Technology* 12: 181-189.
- Owens N. 1995. Constraints to seed production: temperate and tropical trees. *Tree Physiology*.15: 477-484.
- Pennington T. y Sarukhan J. 1968. Arboles tropicales de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Food and Agriculture Organization of the United Nations. 413 p.

- PROECUADOR. 2013. Boletín de Análisis de Mercados Internacionales. Guayaquil. PROECUADOR.
- Rojas F. y Torres G. 2009. Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción. Revista Forestal Kuru. 6; 64-66.
- Rajora O. and Zsuffa L. 1985. Pollen viability of some *Populus* species as indicated by in vitro pollen germination and tetrazolium chloride staining. Toronto- Canadá. Canadian Journal of Botany. 64: 1086-1088
- Rejón D. Suárez G. Alché D. Castro J. y Rodríguez I. 2010. Evaluación de diferentes métodos para estimar la calidad del polen en distintos cultivares de olivo (*Olea europaea* L.).
- Shivanna K. and Sawhney V. 2005. Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement. New York. 468p.
- Sousa A. Schemberg A. Aguiar V. 2010. Germinação *in vitro* do pólen de jervivá (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham) Scientia Forestalis.38:147-151.
- Souza H. Vidigal F. Lanzoni M. Brancalleão N. Silva C. and Pinheiro A. 2014. Viability, storage and ultrastructure analysis of *Aechmea bicolor* (Bromeliaceae) pollen grains, an endemic species to the Atlantic Forest. Euphytica.204; 13-28
- Stanley C. y Linskens H. 1974. Pollen Biology. Springer. Verlag. Berlin.307p
- Stone J, Thomson J. and Dent-Acosta S. 1995. Assessment of pollen viability in hand pollination experiments: a review. American Journal of Botany (U.S.A) 82(9): 1186-1197.

- Varas J. 1960. Conservación del polen de cacao y compatibilidad en cruces interclonales. Ecuador. 73p.
- Vázquez C. Batis A. Alcocer M. Gual M. y Sánchez C. 1999. Árboles y arbustos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación. CONABIO - Instituto de Ecología, UNAM. México. Consultado 24 ene. 2015. Disponible en [www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)
- Zaid A. 2002. Date palma cultivation. Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO). Roma. Consultado 10 jun 2015. Disponible en [www.fao.org](http://www.fao.org)
- Zeng W. Yaxin G. Megann S. and Spangenberg G. 2004. Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) (Poaceae) plants. American Journal of Botany 91: 523–530
- Zobel, B. y Talbert, J. 1988. Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales. Traducido por Manuel Ortiz, México, México, Editorial Limusa. p. 170-177.
- Theilade I. Petri L. y Engels J. 2007. Conservación y manejo de recursos genéticos forestales. En plantaciones y bancos de germoplasma (ex situ). FAO, FLD, Bioversity International. Italia.90p.
- Trujillo M. 2006. Conservación de recursos genéticos forestales. Revista INIA. 8:28-30p.

# **ANEXOS**

**Fotografía 1. Flor de *O. pyramidale* y botones florales**



**Fotografía 2. Flores de *O. pyramidale* de diferentes tamaño**



Fotografía 3. Flores grande de *O. pyramidale*



Fotografía 4. Estambres monoadelphos, estigma y filamento



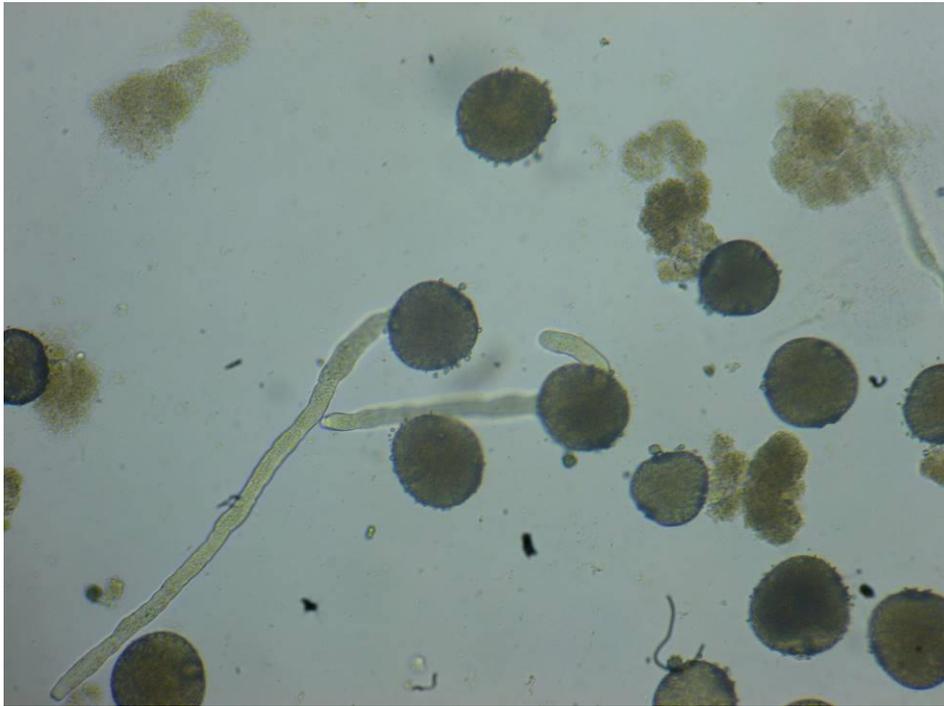
**Fotografía 5. Dehiscencia de las anteras**



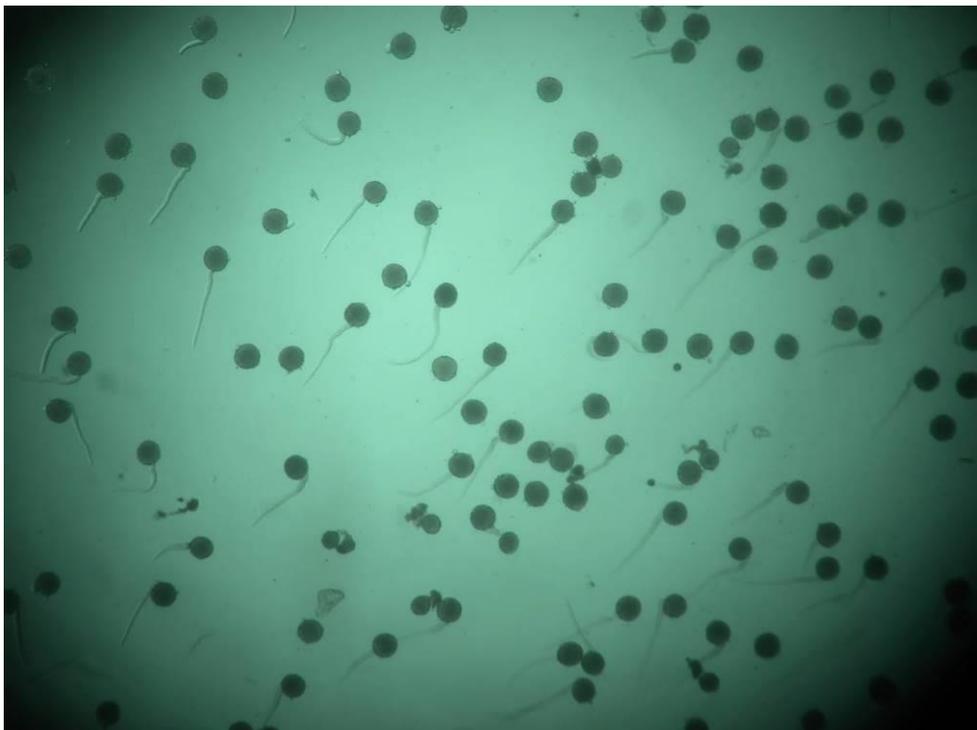
**Fotografía 6. Extracción de polen de *O. pyramidale***



Fotografía 7. Polen geminado *in vitro* (Observación en microscopio con aumento de 10X)



Fotografía 8. Polen germinado *in vitro* posterior a 45 días de almacenamiento en nitrógeno líquido (observación en microscópico con aumento de 4x)



## CERTIFICACIÓN

Dra. C. LUZ CECILIA GARCÍA CRUZATTY, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo certifica que: la tesis del programa de maestría Manejo y Aprovechamiento Forestal, desarrollada por la **Ing. Ivonne Rocío Jalca Zambrano**, con el tema **“Efecto de la temperatura y secado en la viabilidad de polen almacenado de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lamb) (Balsa). Año 2015. Propuesta de plan de mejoramiento”**, fue ingresado al sistema URKUND, y presentó el 7% de similitud; dicho porcentaje está dentro de los límites aceptables, razón por la cual está acta para continuar con los trámites pertinentes.

Quevedo, 15 de Enero del 2016

---

**Dra. C. Luz Cecilia García Cruzatty**  
**Directora de Tesis**

## REPORTE ANALISIS URKUND TESIS IVONNE ROCÍO JALCA ZAMBRANO



<b>Document</b>	<a href="#">TESIS POLEN -IVONNE.doc</a> (D17210327)
<b>Submitted</b>	2016-01-15 08:33 (-05:00)
<b>Submitted by</b>	José Pedro Suatunce Cunuhay (jsuatunce@uteq.edu.ec)
<b>Receiver</b>	jsuatunce.uteq@analysis.orkund.com
<b>Message</b>	ANALISIS TESIS IVONNE JALCA <a href="#">Show full message</a>

7% of this approx. 24 pages long document consists of text present in 10 sources.



### Urkund Analysis Result

**Analysed Document:** TESIS POLEN -IVONNE.doc (D17210327)  
**Submitted:** 2016-01-15 14:33:00  
**Submitted By:** jsuatunce@uteq.edu.ec  
**Significance:** 7 %

#### Sources included in the report:

TESIS OMAR MONTIEL - URKUND.docx (D11315432)  
<http://www.hsph.harvard.edu/population/domesticviolence/ecuador.constitution.08.doc>  
<https://maepichincha.files.wordpress.com/2015/04/proyecto-linea-de-sub-transmision-proyecto-rancho-solar-villa-cayambe.pdf>  
<http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/123456789/3500/1/T-UCSG-POS-MGSS-42.pdf>  
[http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/training\\_material/docs/Mejoramiento%20Genetico%20Forestal.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/training_material/docs/Mejoramiento%20Genetico%20Forestal.pdf)  
<http://www.uv.mx/iif/files/2014/10/Tesis-Yamilet-Tivo-MC.pdf>  
[http://www.ecured.cu/Balsa\\_\(Ochroma\\_pyramidale\)](http://www.ecured.cu/Balsa_(Ochroma_pyramidale))  
<http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/251/1/T-UTEQ-0005.pdf>  
[http://www.mngr.net/publications/arboles-de-puerto-rico/ochroma-pyramidale/at\\_download/file](http://www.mngr.net/publications/arboles-de-puerto-rico/ochroma-pyramidale/at_download/file)  
<http://ciudadanosustentable.blogspot.mx/>

#### Instances where selected sources appear:

21