

Optimización de técnicas de polinización controlada en *Tectona grandis*, Linn f

Optimization of controlled pollination techniques in *Tectona grandis*, Linn isf.

Yorleny Badilla-Valverde¹  • Olman Murillo-Gambo²  • Mario Espinoza-Pizarro³ 

Recibido: 7/6/2021

Aceptado: 27/6/2022

Abstract

Teak is one of the most commercially reforested forest species in the tropical and subtropical world, which has motivated the development of genetic improvement programs in the region, requiring controlled crossing protocols to recombine individuals with superior characteristics to obtain high-yielding genotypes in commercial plantations. The present study aimed to optimize controlled pollination techniques for this species. Several trials were conducted to determine the effect of emasculation, the determination of the best pollination tool between brush and pipette tip, the effect of style cutting, as well as the development of panicle isolation methods. The trials were repeated numerous times over two years, using pollen from different sources. In none of the trials was it possible to determine significant statistical differences between the pollination techniques evaluated. However, differences were found between repetitions over time, suggesting that climatic conditions affect the efficiency of teak pollination. The best pollination technique in teak does not require emasculation, the brush is the simplest and most operationally efficient tool, and cutting the pistil does not significantly increase the number of fruits obtained. The fertilization rate with controlled pollination can reach up to 90%. However, environmental effects and possibly the action of postzygotic self-incompatibility mechanisms reduce the number of effective fruits by more than 25% at the end of the reproductive period.

Keywords: teak, breeding, mating systems, reforestation.

1. Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE), Universidad Nacional, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad Estatal a Distancia. Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Ingeniería Forestal, Cartago, Costa Rica, ybadilla@itcr.ac.cr
2. Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Ingeniería Forestal, Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Ingeniería Forestal, Cartago, Costa Rica, olmuga@yahoo.es
3. Novelteak, Peñas Blancas, Costa Rica. mario.espinoza@novelteak.com

Resumen

La teca es una de las especies forestales de mayor reforestación comercial en el mundo tropical y subtropical, lo que ha motivado el desarrollo de programas de mejoramiento genético en la región, que requieren protocolos de cruzamiento controlado, para recombinar individuos con características superiores para obtener genotipos de alto rendimiento en plantaciones comerciales. El presente estudio tuvo como objetivo optimizar las técnicas de polinización controlada de esta especie. Se realizaron varios ensayos en lo que se determinó el efecto de la emasculación, la determinación del mejor instrumento de polinización entre pincel y punta de pipeta, el efecto del corte del estilo, así como el desarrollo de métodos de aislamiento de la panícula. Los ensayos se repitieron numerosas veces durante dos años, utilizando polen de diferente origen. En ninguno de los ensayos se logró determinar diferencias estadísticas significativas entre las técnicas de polinización evaluadas. Sin embargo, si se encontraron diferencias entre las repeticiones que se realizaron a través del tiempo, lo que sugiere que las condiciones climáticas afectan la eficiencia en la polinización de teca. La mejor técnica de polinización en teca no requiere la emasculación, el pincel es la herramienta más simple y eficiente a nivel operativo, el corte del estilo no aumenta significativamente el número de frutos obtenidos. La tasa de fertilización con polinización controlada puede alcanzar hasta un 90 %. Sin embargo, efecto ambientales y posiblemente la acción de mecanismos de autoincompatibilidad postcigóticos, reducen el número de frutos efectivos en más de 25 % al final del periodo reproductivo.

Palabras clave: Teca, mejoramiento genético, diseños de apareamiento, plantaciones.

Introducción

Tectona grandis L.f; es un árbol perteneciente a la familia Lamiaceae, cuya distribución natural ocurre en el sureste asiático, específicamente en India, Myanmar, norte de Tailandia y el oeste de Laos [1]. Los árboles de esta especie presentan una inflorescencia muy grande, con panículas multiramificadas, axilares y terminales, corola campanulada y blanca, con 6 a 8 estambres que sobresalen. El estilo es sobresaliente, más largo que los estambres, como parte de su estructura floral hermafroditas. La panícula está conformada por pequeños grupos de ramilletes [2], [3], [4]. El fruto es subgloboso, drupáceo, mide de 20 a 30 mm de largo y 20 a 25 mm de ancho, densamente lanado, con hasta cinco óvulos, pero solamente de 1 a 2 son funcionales [5].

La época de floración y fructificación de esta especie varía dependiendo de las condiciones climáticas. En su hábitat natural, en la India, la floración ocurre de setiembre a octubre, y el desarrollo de los frutos en noviembre para la completa maduración en marzo [6]. En Indonesia, donde fue introducida, la floración ocurre de febrero a marzo, y el desarrollo de los frutos de abril a mayo, y la maduración en junio [7]. Mientras que en el trópico americano, como en Costa Rica, la floración ocurre durante la época lluviosa, desde inicios del mes de junio y se puede extender hasta el mes de noviembre. Los frutos se observan en plena madurez desde finales del año y con mayor concentración, en los meses de enero y febrero [4].

Actualmente la teca es cultivada prácticamente en todo el mundo tropical y subtropical [8], [9]. Lo que ha motivado al desarrollo de programas de conservación y mejoramiento genético forestal en la región, con el fin de aumentar la productividad y rentabilidad de los proyectos forestales [10], [11].

A inicios del 2000 en Costa Rica, se constituyó la cooperativa de conservación y mejoramiento genético, que se expandió por la región latinoamericana y logró seleccionar y evaluar más de 400 genotipos [11]. Que ha logrado incursionar en el mejoramiento de la productividad, calidad de fuste, propiedades de la madera, tolerancia a enfermedades, entre otros aspectos [11], [12], [13], [14], [15].

La polinización controlada es el principal procedimiento utilizado en el mejoramiento genético forestal, cuyo objetivo es recombinar los árboles superiores para obtener progenies o descendencias, que contengan los genes deseables de cada uno de los dos progenitores [16], [17]. Este procedimiento es fundamental para maximizar la ganancia genética, producir una siguiente generación de mayor productividad y calidad, y lograr un mayor control genético de la población [10]. Parte esencial para el desarrollo de técnicas de polinización, se fundamenta en el dominio de protocolos de colección, almacenamiento y análisis de polen. De manera reciente, la cooperativa de mejoramiento genético forestal (GENFORES), ha logrado un avance notable en los procedimientos de colecta, procesamiento y almacenamiento de polen de teca en el país [4], [16], [17], que permitirán un avance sustancial en la mejora genética de esta especie.

A pesar de que la teca produce una floración abundante en panículas de gran tamaño, presenta una tasa alta de aborto de flores y frutos, que resulta en una cantidad muy pequeña de frutos efectivos por inflorescencia [18]. En la India se reporta que la polinización natural registra tan solo un 1 % de frutos efectivos. Con autopolinización se obtiene hasta un 4 %, mientras que con polinización artificial se ha logrado entre un 10 y un 14 % [19]. Razón por la que ha sido motivo de interés, la necesidad de

desarrollar técnicas de polinización controlada en teca.

Los primeros estudios sobre polinización controlada en *Tectona grandis* L.f. fueron reportados por Bryndum & Hedegaard [2]. En los trabajos de Hedegart [22] se registraron resultados entre 6 % y 60 % de fertilización, de los cuales solamente un 20 % logró alcanzar la formación de frutos. Sin embargo, la mayor parte de los estudios sobre polinización controlada con la especie, se realizaron a pequeña escala y con carácter de investigación [6], [7], [18], [20].

Actualmente no existe un protocolo a escala operativa, que pueda ser utilizado en programas comerciales con teca. No se conoce ningún reporte de alguna organización que haya logrado avanzar formalmente hacia una segunda generación de mejoramiento genético en esta especie a escala comercial. Por tanto, el presente estudio tuvo como objetivo optimizar las técnicas de polinización controlada de *Tectona grandis* a escala operativa, con el fin de acelerar el avance a las siguientes generaciones de mejoramiento genético con esta especie.

Materiales y métodos

Las investigaciones se realizaron en Peñas Blancas, La Cruz, Guanacaste (coordenadas 11°12'40.15" N y 85°36'45.84" O), donde se registra un promedio de lluvia anual de 1745 mm, temperatura promedio de 27°C y una estación seca de aproximadamente 5 meses [13]. Los trabajos de polinización controlada se desarrollaron durante tres años continuos durante el período de floración de la especie, que transcurre desde junio a noviembre en esta zona del país.

Para la realización de los ensayos de polinización controlada se realizó la extracción de polen mediante la colecta de panículas entre las 5:30 y 6:30 am, antes de iniciarse el proceso de apertura floral o antesis. Todos los árboles donadores de polen (machos) formaron parte de la colección élite del programa de mejoramiento genético de la empresa Novelteak. Todas las polinizaciones se realizaron en panículas (hembras) de árboles injertados con yemas de la misma colección élite de teca de la empresa.

De cada árbol seleccionado, se cortaron varias panículas en la mañana (5:30 a 6:30 am) para proceder a la extracción de su polen. Cada día de trabajo se colectó panículas de al menos 4 o 5 árboles (machos). Las panículas se conservaron separadas en bolsas plásticas de jardín, con el propósito de mantener la temperatura y la humedad alta, de modo que no se interrumpiera el proceso natural de apertura floral. Aproximadamente dos horas después (8 am) se cortó con tijera fina un número suficiente de flores por panícula, que ya



Figura 1. Polen de teca limpio después de tamizado y extraído de las anteras secas.

Figure 1. Clean teak pollen after sieving and extraction from dried anthers.

hubieran iniciado su apertura. Con el uso de pinzas se procedió a desprender las anteras de cada flor hasta acumular 0,1 g de material fresco o peso verde. Las anteras fueron sometidas a un proceso de secado o deshidratación, para completar su apertura y facilitar la liberación de polen, tal y como lo describen Hine et al. [16]. Para esto, las anteras se colocaron dentro de un frasco plástico sellado con 50 g de sílica gel durante 2 horas. Posteriormente, se retiraron las anteras y demás estructuras florales visibles, el remanente se tamizó con un Vórtex (vibrador) durante 3 minutos sobre un fragmento de tela fino, con la finalidad de poder separar el polen fino del resto de residuos florales. Finalmente se obtuvo el polen seco y limpio, debidamente rotulado para ejecutar los ensayos de polinización (Figura 1). Debe mencionarse que el polen de distintos machos fue mezclado en un polymix. Con esto se previno el efecto de un posible error experimental, que podría ocurrir ante la presencia de mecanismos de incompatibilidad específica entre genotipos [6], [19].

Un día previo a la polinización, se aislaron varias panículas en cada uno de los árboles donde se realizaron los ensayos. Después de varias pruebas con materiales y diseños de embolsado de la panícula (aislamiento de polinizadores), se utilizó el diseño como se muestra en la figura 2. En observaciones sobre el comportamiento de la antesis de la flor, se determinó que cada día inician y culminan con la apertura floral aproximadamente 200 a 250 flores en una misma panícula [4]. Por tanto, el aislamiento de polinizadores resulta efectivo con tan solo realizar el embolsado de la panícula un día antes de iniciar con el trabajo de polinización controlada.

Para realizar los cruces controlados, se seleccionó cada día una panícula baja en el árbol receptor, que facilitara la labor de embolsado y de polinización. El aislamiento de la panícula fue realizado un día antes de efectuar la polinización. Sin embargo, el aislamiento si es relevante desde temprano durante el día en que se realizarán las labores de polinización controlada, ya que los visitantes

pueden filtrarse fácilmente. La panícula fue elegida por la presencia de una cantidad suficiente de flores disponibles para conformar al menos 5 o 6 ramilletes, con al menos 8 a 10 flores receptivas cada uno.

Para el refinamiento de la técnica de polinización se establecieron tres ensayos, tal y como se describen a continuación.

1. Efecto de la emasculación en la polinización. Para la realización del experimento se utilizó un diseño estadístico de bloques completos al azar con 2 tratamientos (Con o Sin enmasculación) y 5 repeticiones (días diferentes), con 32 a 40 flores como unidad experimental diaria. El estudio se repitió en días diferentes, donde se utilizó otro árbol como receptor de polen (hembra), y en algunas ocasiones, se utilizaron otros machos (donadores de polen), con lo cual, se aumentó la representatividad del experimento.

Una vez constituidos los grupos de 8 flores (unidad experimental), se colocaron dos gasas plásticas de diferentes colores al inicio del ramillete, una para identificar el día (repetición) y otra para identificar el tratamiento (Con o Sin emasculación). Previo a la polinización, se procedió a realizar la emasculación con ayuda de una pinza plana, que permitió retirar completamente la corola de la flor sin producirle ningún daño visible (Figura 3). Posteriormente se realizó la polinización entre las 11 am y 1 pm, por ser el periodo del día en que las flores de teca están más receptivas [4]. Que coincide con las horas pico de la nube de polen de 9 a 1pm, reportado por Tangmitcharoen y Owens [6] en Indonesia e Indira y Mohanadas [21] en India, donde entre 12 mediodía y 1pm se alcanza la mayor densidad de granos de polen por flor.

Se utilizó un pincel fino diferente para cada macho (repetición), que se impregnó de polen y luego se pasó suavemente por el estilo de todas y cada una de las 32 a 40 flores seleccionadas para cada repetición (20 con y 20 sin emasculación). Terminada la polinización se volvió a aislar la panícula. A los 8 días se procedió a realizar el conteo de las flores fertilizadas.

A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza para determinar si hubo efecto de la emasculación en la fertilización de las flores al momento de polinizar, considerando que la variable de respuesta fue la cantidad de flores efectivas fertilizadas.

2. Evaluación de la herramienta de polinización. En este experimento se usó un diseño estadístico de bloques completos al azar con 2 tratamientos (uso de pincel fino y punta de pipeta) y 5 repeticiones (días diferentes), con 32 a 40 flores como unidad experimental.

Para realizar el ensayo, se procedió de la misma



Figura 2. Diseño de embolsado de la panícula de teca para su aislamiento de polinizadores.

Figure 2. Teak panicle bagging design for pollinator isolation.



Figura 3. Proceso de emasculación de flores en la polinización controlada de teca.

Figure 3. Process of flower emasculation in the controlled pollination of teak.

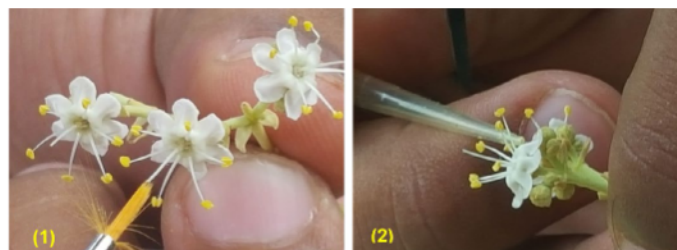


Figura 4. Aplicación de polen con pincel (1) y punta de micropipeta (2) en flores de teca (*Tectona grandis*).

Figure 4. Pollen application with brush (1) and micropipette tip (2) on teak (*Tectona grandis*) flowers.

manera para seleccionar y aislar la panícula, como se explicó en el experimento anterior, donde se marcaron con gasas de colores grupos de 10 flores. Una vez constituidos los grupos, se les colocaron gasas de diferentes colores, para indicar la herramienta a utilizar en la polinización. Posteriormente se realizó la polinización entre las 11 am y la 1 pm. Primero se polinizó utilizando el pincel, el cual se impregnó de polen y luego se pasó suavemente por el estilo de los 4 o cinco grupos de flores correspondientes. Luego se siguió con la punta de pipeta, la cual se impregnó con polen, al polinizar se procuró introducir el estilo de las flores dentro de la punta para asegurarse de

la aplicación (Figura 4). Terminada la polinización se volvió a aislar la panícula. De manera semanal posterior a la fecha de polinización, se procedió a realizar el conteo de flores fertilizadas desde los primeros 8 días.

Los datos obtenidos se ordenaron y se analizaron con un análisis de varianza, para determinar si hubo efecto en la fertilización de las flores al aplicar el polen con pincel o punta de micropipeta. Así también se analizó la existencia de diferencias entre repeticiones, para identificar la magnitud de las diferencias, producto del cambio de donadores de polen (machos).

3. Efecto del corte terminal del estilo en la polinización. Esta técnica busca eliminar una posible barrera biológica en la recepción del polen en el estilo, donde se conoce que dependiendo del genotipo del polen, la estructura femenina podría eliminar o no aceptar al polen [21]. En este experimento se usó un diseño estadístico de bloques completos al azar con 2 tratamientos (con y sin corte) y 2 repeticiones (días diferentes con machos diferentes), con 32 flores como unidad experimental. Este ensayo consistió en comparar el efecto en la fertilización, al polinizar flores con corte de estilo versus flores completas.

Un día anterior a la realización de todos los ensayos, se seleccionó una panícula que estuviera accesible y que tuviera una cantidad suficiente de flores para aplicar todos los tratamientos planeados.

Se organizaron 4 grupos de 8 flores por ramillete para un total de 32 flores por tratamiento, a los que se colocaron gasas de diferentes colores, para indicar la presencia o ausencia de corte del estilo (figura 5). Posteriormente se realizó la polinización a todas las flores con pincel, entre las 11:00 am y la 1:00 pm, periodo del día en que las flores de teca están más receptivas. Concluida la polinización se volvió a aislar la panícula.

De manera semanal posterior a la fecha de polinización, se procedió a realizar el conteo de flores fertilizadas cada 8 días hasta completar un mes. La flor fertilizada es de fácil detección como se muestra en la figura 6, en la foto a la derecha.

El procedimiento experimental en todos los ensayos se realizó diariamente con polen procedente de 4 o 5 machos. Con el lote de polen se polinizó en grupos de 8 flores (ramillete) hasta completar de 32 a 40 flores receptivas. Por lo tanto, estadísticamente cada día de polinización se constituyó en una repetición. Todos los ensayos de polinización se repitieron de nuevo en días diferentes, a veces con árboles receptores (hembra) y machos (polen) diferentes y en años diferentes. Por tanto, cada uno de los ensayos de polinización fue repetido en el tiempo al menos 4 a 5 veces. Con



Figura 5. Corte de estilo de flores de teca para realizar la polinización controlada.

Figure 5. Cutting of teak flower style for controlled pollination.



Figura 6. Proceso de apertura y cierre floral en teca. La flor inicia su apertura entre 6 y 7 am (izquierda); flor con máxima receptividad de polen entre 9 y 1 pm (centro); flor ya polinizada entre 2 y 3 pm (derecha) (Fotos Zúñiga 2018).

Figure 6. Process of flower opening and closing in teak. The flower starts opening between 6 and 7 am (left); flower with maximum pollen receptivity between 9 and 1 pm (center); flower already pollinated between 2 and 3 pm (right) (Photos Zúñiga 2018).

esto, cada experimento se basó en el resultado de la polinización de 32 a 40 flores que constituyen una repetición estadística.

Por tanto, el modelo estadístico experimental consistió entonces, en un diseño de bloques completos al azar como se muestra:

$$Y = T + R + TR + e \quad (1)$$

Donde, Y es el vector de los datos y corresponde con la variable de respuesta (flores fertilizadas); T es el efecto de la técnica de polinización evaluada o tratamiento (considerado como fijo); R es el efecto de la repetición, que corresponde con el día en que se polinizó (aleatoria); T x R es el efecto de la interacción Técnica x Repetición (unidad experimental, aleatoria); finalmente, e corresponde a los efectos del error experimental (aleatorios).

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza convencional y un análisis complementario no paramétrico de chi cuadrado.

Resultados

Los resultados se presentan a continuación para cada uno de las tres técnicas evaluadas.

Efecto de la emasculación

Los principales resultados de los ensayos de polinización controlada de teca, con respecto a la emasculación, dieron como resultado un promedio general de flores fertilizadas de un 24,14 %. Sin embargo, cuando las flores fueron emasculadas se obtuvo una media de 20,83 % versus un 27,45 % sin emasculación. En el cuadro 1, se muestra el análisis de varianza de los resultados obtenidos, en donde se registraron diferencias significativas entre la aplicación de esta técnica vs no hacerlo (con emasculación y sin emasculación). Cuyo resultado indica que la emasculación disminuye ligeramente el porcentaje de flores fertilizadas. Es importante mencionar que se obtuvo también, diferencias significativas entre las repeticiones (días), así como levemente en la interacción Tratamiento x Repetición.

El tiempo de polinización con pincel y sin emasculación, fue de aproximadamente 90 a 100 flores por hora. Mientras que con emasculación, el rendimiento fue de aproximadamente 50-60 flores por hora.

Uso del pincel vs punta de micropipeta

Con el uso del pincel se obtuvo un 25,86 % de fertilización, mientras que aplicado con la punta de la micropipeta, el resultado disminuyó levemente a un 22,49 %. El ANDEVA respectivo (Cuadro 2), no determinó la existencia de diferencias significativas entre los dos instrumentos que se utilizaron. Sin embargo, si se obtuvieron diferencias significativas entre las repeticiones o día de fertilización.

El rendimiento en polinización fue prácticamente idéntico con el uso de ambos instrumentos, con aproximadamente 90 a 100 flores por hora.

Corte de estilo

Los resultados obtenidos aplicando el corte del estilo en la polinización controlada de teca, produjeron un promedio de 17,5 % de fertilización. Sin embargo, como se puede observar con la prueba de Chi² (cuadro 3), no se logró determinar diferencias entre las dos técnicas.

El rendimiento en polinización con esta técnica, fue de aproximadamente 50 a 60 flores por hora.

Discusión

La polinización controlada es esencial para el avance de los programas de mejoramiento genético, hacia

Cuadro 1. Análisis de varianza para la aplicación de la técnica de emasculación en la polinización controlada de *Tectona grandis*, La Cruz, Guanacaste, Costa Rica.

Table 1. Analysis of variance for the application of the emasculaton technique in the controlled pollination of *Tectona grandis*, La Cruz, Guanacaste, Costa Rica.

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Valor de F	Valor de P
Tratamiento	1	3,840	0,053000*
Repetición (día)	4	9,256	0,000003*
Interacción Tratam x Repetición	4	0,258	0,904000
Error	90		
Total	99		

Cuadro 2. Análisis de varianza entre el uso de pincel y la punta de pipeta en la polinización controlada de *Tectona grandis*, La Cruz, Guanacaste, Costa Rica.

Table 2. Analysis of variance between the use of brush and pipette tip in the controlled pollination of *Tectona grandis*, La Cruz, Guanacaste, Costa Rica.

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Valor de F	Valor de P
Tratamiento	1	0,989	0,3230
Repetición (día)	4	9,137	0,0001
Interacción Tratam x Repetición	4	0,802	0,5270
Error	90		
Total	99		

Tabla 3. Valores esperados de la prueba de Chi², para la técnica de corte de estilo en la polinización controlada de *Tectona grandis*, La Cruz, Guanacaste, Costa Rica.

Table 3. Expected values of the Chi² test for the pistil cutting technique in the controlled pollination of *Tectona grandis*, La Cruz, Guanacaste, Costa Rica.

Tratamiento	Macho		Valor de P
	1	2	
Con Corte	3,43	6,57	17,50
Sin Corte	8,57	16,43	17,50
Total	12,00	23,00	35,00
Chi 2	1,27		P = 0,260 n.s.

las siguientes generaciones de mejora. En estas investigaciones, se tomó como base la amplia experiencia desarrollada con eucaliptos [22]. De manera convencional, las tres principales técnicas que se han utilizado son el Método Convencional [23], One Stop

Pollination (OSP) [22], [24] y la técnica de Protoginia Artificial Inducida (AIP) o corte del estilo [21], [25]. Tanto el método convencional, como el OSP, requieren la emasculación y aislamiento de las flores para evitar la fertilización con polen indeseable, tal y como se practicó en estos experimentos con teca.

Efecto de la emasculación

La técnica de emasculación es costosa, requiere mayor cantidad de mano de obra, tiene menor rendimiento y requiere de mayor precisión. Ya que se corre el riesgo de dañar alguna estructura floral y reducir la tasa de fertilización efectiva. La emasculación se fue popularizando en los programas de mejora genética, por su uso potencial para evitar la autofertilización en especies con flor perfecta. Esta técnica se ha aplicado con éxito en eucaliptos y otras especies de flor perfecta o completa [25]. Sin embargo, tiene un costo mayor de polinización y un riesgo de daño mayor a escala operativa. En programas de polinización controlada, este riesgo es prácticamente mínimo, en especial si se garantiza un aislamiento completo de la panícula. Ya que, sin presencia del insecto visitador, no hay posibilidad de que ocurra ninguna polinización natural o polinización abierta.

Los principales resultados muestran diferencias significativas entre aplicar o no la técnica de la emasculación. Este experimento se repitió al menos en 5 días diferentes, con distintas fuentes de polen (machos), diferentes panículas y también, distintos árboles como receptores del polen. Debe recordarse que se utilizó como unidad experimental grupos de 32 a 40 flores por cada día en cada tratamiento. El experimento se repitió al menos 4 veces más, con lo cual se aumentó sustancialmente, la representatividad de los resultados. Esto explica el registro de una diferencia altamente significativa entre repeticiones (cuadro 1). La base experimental empleada es sumamente robusta y representativa para la especie, que aporta seguridad en la observancia de un patrón claro y consistente a favor de no emasculación en teca.

Posiblemente, al aplicarse la emasculación pudo ocurrir algún daño físico en el estilo, imperceptible para la vista del operario, favorecido por el tamaño tan pequeño de la flor de teca. El daño al tejido podría fácilmente ocasionar que no ocurra la germinación del polen, o también, la interrupción del evento posterior de fertilización del óvulo.

Por tanto, el posible daño o lesión al emasculación, significó en términos prácticos, una reducción de un 27,45 % hasta casi un 21 %, es decir, de poco más de un 6 %. Esta diferencia fue significativa y en términos relativos significa, que si se aplica la emasculación produce un daño en una flor de cada 16. A pesar de ser un valor bajo, es significativo y por tanto, no recomendable de

aplicar. Debe recordarse que la teca es una especie que produce poca cantidad de frutos por árbol por año. Por tanto, todo elemento que pueda aumentar la eficiencia en fertilización, debe ser incorporada en los protocolos de polinización controlada de esta especie. Si además de la reducción leve pero significativa, en la tasa de fertilización, la emasculación registró también una disminución considerable en el número de flores polinizadas por hora, de aproximadamente un 50 % menos.

En un buen programa de polinización controlada, con un adecuado aislamiento de las panículas dentro de algún sistema de ambiente controlado, es prácticamente imposible que ocurra una polinización no deseada (autopolinización, por ejemplo), producto de la presencia de algún visitador. Por tanto, este experimento tuvo más un carácter de investigación y de dominio de la técnica de emasculación.

Uso del pincel y punta de micropipeta

La realización de este experimento tuvo como objetivos, mejorar la operatividad de la polinización a nivel empresarial, mediante un posible aumento en la tasa de éxito y una disminución esperada en los costos. Así también, para mayor facilidad de mantener la identificación del polen utilizado en cada cruce. En este sentido, el uso potencial de una punta de micropipeta, representa sin duda una mayor facilidad y velocidad de polinización, como se muestra en la figura 4. Además, la punta de pipeta es reciclable ya que puede ser esterilizada y utilizada varias veces, con lo que se podría bajar los costos a nivel operativo.

Al igual que en los demás experimentos, en el uso de estas herramientas de polinización se utilizaron de 32 a 40 flores por tratamiento como unidad experimental. Es decir, en un total de 5 repeticiones (días distintos) x 2 tratamientos x 32 a 40 flores, para un total de 320 a 400 flores. Esta base amplia de experimentación, respalda ampliamente los resultados obtenidos.

Los resultados del cuadro 2 son suficientes para señalar que no hubo diferencias significativas entre el uso de ambos instrumentos en la polinización de la teca. El uso del pincel sin duda, representa un costo levemente superior en la polinización y un mayor cuidado a la hora de querer cambiar de donador de polen (macho). Ya que sería prácticamente imposible volver a utilizar el mismo pincel con machos diferentes. Lo mismo sucede con el uso de la pipeta, pero como se mencionó, puede ser reutilizada posterior a una debida esterilización. Además, la punta de pipeta se puede marcar fácilmente con la identidad de cada fuente de polen.

Las diferencias altamente significativas entre repeticiones (machos diferentes) son esperadas. Como

se explicó, la amplia base experimental empleada con distintos donadores de polen y días de polinización también distintos, explican claramente estas diferencias entre repeticiones. La base experimental amplia tuvo como objetivo garantizar un resultado preciso y representativo a la hora de comparar entre ambas herramientas. En un análisis posterior y cuidadoso de los datos, podría revisarse la presencia de mecanismos de incompatibilidad, entre algunos de los genotipos empleados en el experimento.

Corte de estilo

Los resultados obtenidos con la aplicación de esta técnica, muestran que no hubo diferencias significativas con su utilización. El uso de esta técnica en eucaliptos ha tenido algún éxito, en la idea de eliminar posibles barreras de incompatibilidad temprana a nivel genotípico, entre la hembra (receptor) y el macho como donador de polen [21]. Por tanto, el dominio de la técnica de corte del estilo abre una opción más de polinización controlada para un programa avanzado de mejora genética con teca.

Sin embargo, de manera general, los experimentos con esta técnica produjeron valores de fertilización promedio de poco más de un 17 %, evidentemente menores al promedio general de un 24 %, registrado con las técnicas convencionales. De manera clara, existe un mayor riesgo de daño en las estructuras florales, producto del uso de esta técnica. Sin embargo, puede señalarse que se cumplió el objetivo experimental, al demostrarse el dominio de la técnica y un resultado positivo en su utilización, para casos complejos de incompatibilidad genotípica.

De manera general, los ensayos de polinización controlada fueron exitosos en cuanto al dominio de las técnicas empleadas, y en la obtención de una tasa inicial de fertilización relativamente aceptable (promedio de un 25 %). Es importante resaltar que en general, en los ensayos realizados con las diferentes técnicas, se obtuvo un promedio general de fertilización de las flores con respecto a la emasculación de 21 y sin emasculación del 27 %, con uso del pincel se tuvo un 25 y con punta de 22 %, además con el corte del estilo se obtuvo un promedio de flores fertilizadas de poco más de un 17 %. Estos resultados superan los reportados en otras investigaciones con teca [20], donde obtuvo una efectividad en la polinización abierta de 0,4 – 5,1 % (con un promedio 1,3 %). Kertadikara y Prat [26] reportan una tasa de cruces efectivos en teca de 0,92 – 0,98, mientras que Bryndum y Hedegart [2] reportan una efectividad de fertilización de flores de teca de 6-60 %, con un promedio de 20 % en la polinización cruzada. Palupi et al. [20] reportan valores de un 30 % de fertilización con polinización controlada, que superó ampliamente

la tasa de polinización abierta o natural en huertos semilleros en Indonesia.

Producto de que los árboles polinizados se encontraban al aire libre, el efecto de las fuertes lluvias y el viento, causaron una disminución hasta en más de un 75 % en la tasa final de frutos obtenidos. Lo cual sugiere la necesidad de realizar esfuerzos por desarrollar tecnología de polinización controlada en condiciones de ambiente protegido.

A nivel operativo, es posible realizar hasta 100 cruzamientos controlados en una hora efectiva, asumiendo que se tiene buen acceso a la panícula. Las mejores horas de polinización ocurren entre las 8:30 am y 2:00 pm en sincronía con la máxima apertura floral, con lo que es posible fertilizar durante al menos 5 horas efectivas por día. La tasa de fertilización con polinización controlada puede alcanzar hasta un 90 %. Sin embargo, efectos ambientales y posiblemente la acción de mecanismos de autoincompatibilidad postcigóticos, reducen el número de frutos efectivos en más de 25 % al final del periodo reproductivo.

Gracias a la amplia base experimental empleada, fenómenos de incompatibilidad genotípica pudieron tener un efecto mínimo en los resultados obtenidos.

Conclusiones

El mejor protocolo de polinización controlada de teca a escala operativa, es mediante el uso de pincel #0, sin emasculación de flores.

La técnica de corte del estilo es viable, registró una tasa de fertilización de poco más de un 17 %, y puede ser empleada en casos de incompatibilidad genotípica, en un programa de mejoramiento genético avanzado.

Con el desarrollo de estas técnicas, se logró una tasa de fertilización promedio de un 25 %. Para lograr aumentar la tasa de producción efectiva de frutos, es necesario el desarrollo de tecnología de polinización controlada en ambiente protegido.

Referencias

- [1] H. Keiding, «Seed Leaflet No. 4 *Tectona grandis*,» Danida Forest Seed Centre, Humebaek, Dinamarca, 1993.
- [2] T. Bryndum y T. Hedegart, «Pollination of teak (*Tectona grandis* L.f.),» *Silvae Genetica*, vol. 18, pp. 77-80, 1969.
- [3] L. Egenti, «The Danish FAO International provenance trials of *Tectona grandis* in Nigeria,» *Indian Forester*, vol. 104, nº 4, pp. 227-235, 1978.
- [4] L. P. Zúñiga, «Manejo de polen de teca (*Tectona grandis* L.f.), Tesis de Licenciatura,» Instituto Tecnológico de Costa Rica, 2018.

- [5] M. A. F. Akram, «Fruit size and sampling sites effect on dormancy, viability and germination of teak (*Tectona grandis* L.f) seeds,» *Pakistan Journal of Botany*, vol. 48, n° 2, pp. 511-518, 2016.
- [6] S. Tangmitcharoen y J. Owens, «Pollen viability and pollen-tube growth following controlled pollination and their relation to low fruit production in teak (*Tectona grandis* Linn.f.),» *Annals of botany*, vol. 80, n° 4, pp. 401-410, 1997.
- [7] E. Palupi y J. Owens, «Pollination, fertilization and embryogenesis of teak (*Tectona grandis* L.f.),» *International journal of plant sciences*, vol. 158, n° 3, pp. 259-273, 1997.
- [8] R. Keogh, «Does teak have a future in tropical America?,» *Unasylva*, vol. 31, pp. 13-39, 1974.
- [9] G. Schnell e Schuhli y E. Paludzyszyn, «O cenário nacional da silvicultura de teca e perspectivas para o melhoramento genético,» *Pesquisa Florestal Brasileira*, vol. 30, n° 63, pp. 217-230, 2010.
- [10] I. Pires, R. Resende, R. da Silva y M. Resende, *Genética Florestal, Viçosa: Universidad Federal de Viçosa*, 2011.
- [11] O. Murillo, J. Wright, O. Monteuis y F. Montenegro, «Mejoramiento Genético de la teca en América Latina,» de *Las plantaciones de teca en América Latina*, Turrialba, Cartago: CATIE, 2013, pp. 86-111.
- [12] M. Espitia, O. Murilo y C. Castillo, «Ganacia genética esperada en teca (*Tectona grandis*, L.f.) en Córdoba (Colombia),» *Colombia Forestal*, vol. 14, n° 1, pp. 81-93, 2011.
- [13] R. M. J. D. Moya, O. Murillo y L. Leandro, «Wood physical properties, color, decay resistance and stiffness in *Tectona grandis* clones with evidence of genetic control,» *Silvae Genetica*, vol. 62, n° 3, pp. 142-152, 2013.
- [14] Y. Badilla, A. Xavier y O. Murillo, «Resgate vegetativo de árvores de *Tectona grandis* Linn F. pelo enraizamento de estacas,» *Revista Nativa*, vol. 4, n° 2, pp. 91-96, 2016.
- [15] O. Murillo, M. Resende, Y. Badilla y J. Gamboa, «Genotype by environment interaction and selection in teak (*Tectona grandis* L.) in Costa Rica,» *Silvae Genetica*, vol. 68, pp. 116-121, 2019.
- [16] M. Moncur, G. Rasmussen y O. Hasan, «Effect of paclobutrazol on flower-bud production in *Eucalyptus nitens* espalier seed orchards,» *Canadian Journal of Forest Research*, vol. 24, n° 1, pp. 46-49, 1994.
- [17] J. Harbard, A. Griffin y J. Espejo, «Mass controlled pollination of *Eucalyptus globulus*: a practical reality,» *Canadian Journal of Forest Research*, vol. 29, pp. 1457-1463, 1999.
- [18] A. Hine, A. Rojas, A. Suárez, O. Murillo y M. Espinoza, «Optimization of pollen germination in *Tectona grandis* (teak) for breeding programs,» *Forests*, vol. 10, n° 10, p. 908, 2019.
- [19] A. Hine, A. Rojas, L. Suárez, O. Murillo y L. Sánchez, «Efecto de productos bioactivos sobre la germinación de granos de polen de teca criocconservados,» *Cultivos Tropicales (Cuba)*, vol. 4, p. 41, 2020.
- [20] E. Palupi, J. Owens, S. Sadjad Sudarsono y S. D.D, «The importance of fruit set, fruit abortion, and pollination success in fruit production of teak (*Tectona grandis*,» *Can.J. For. Res.*, vol. 40, pp. 2204-2214, 2010.
- [21] E. Indira y K. Mohanadas, «Intrinsic and extrinsic factors affecting pollination and fruit productivity in teak (*Tectona grandis* Linn.f.),» *Indian J. Genet.*, vol. 62, n° 3, 2002.
- [22] T. Hedegart, «Pollination of teak (*Tectona grandis* Linn. f.),» *Silvae Genetica*, vol. 22, n° 4, pp. 124-128, 1973.
- [23] T. Assis, P. Warburton y C. Harwood, «Artificially induced AIP: an advance in the controlled pollination of *Eucalyptus*,» *Australian Forestry*, vol. 68, pp. 27-33, 2005.
- [24] M. Ellis, M. Sedgley y J. Gardner, «interspecific pollen-pistil interaction in *Eucalyptus* L'Hér. (Myrtaceae): the effect of taxonomic,» *Annals of Botany*, vol. 68, pp. 185-194, 1991.
- [25] M. Sedgley y R. Smith, «Pistil receptivity and pollen tube growth in relation to the breeding systems of *Eucalyptus woodwardii* Maiden (Symphyomyrtus),» *Annal Botanical*, vol. 64, pp. 21-31, 1989.
- [26] D. Williams, B. Potts y P. Black, «Testing single visit pollination procedures for *Eucalyptus globulus* and *E. nitens*,» *Australian Forestry*, vol. 62, pp. 346-352, 1999.
- [27] S. Fonseca S., M. Resende, A. Alfnas, L. Guimarães, T. Assis y D. Grattapaglia, *Manual Prático de Melhoramento Genético do Eucalipto*, Viçosa: Editorial UFV, 2010, p. 200.
- [28] A. Kertadikara y D. Prat, «Isozyme variation among teak (*Tectona grandis* L.f) provenances,» *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 90, pp. 803-810, 1995.
- [29] D. Méndez, *Determinación de tolerancia en genotipos de Gmelina arborea a la enfermedad marchitez del Ceratocystis*, Tesis de maestría, Cartago: Instituto Tecnológico de Costa Rica, 2020.
- [30] T. Horsley, S. Johnson y A. Myburg, «Comparison of different control-pollination techniques for small-flowered eucalypts,» *New Forest*, vol. 39, pp. 75-38, 2010.