

Evaluación de la viabilidad y germinabilidad del polen durante la labor de polinización asistida en campo*

Evaluation of the Feasibility and Germinability of Pollen during Assisted Pollination in Oil Palm Crops

CITACIÓN: Guataquira, S., Mesa-Fuquen, E., Ruiz-Romero, R., & Romero, H. M. (2019). Evaluación de la viabilidad y germinabilidad del polen durante la labor de polinización asistida en campo. *Palmas*, 40(1), 13-20.

PALABRAS CLAVE: palma de aceite, polinización asistida, germinación *in vitro*.

KEYWORDS: Oil palm, assisted pollination, *in vitro* germination.

RECIBIDO: noviembre de 2018.

APROBADO: diciembre de 2018.

* Artículo de investigación científica y tecnológica.

STEPHANY GUATAQUIRA GARCÍA

Auxiliar de Investigación. Programa de Biología y Mejoramiento, Cenipalma

ELOÍNA MESA FUQUEN

Investigadora Asociada. División de Validación, Cenipalma

RODRIGO RUIZ ROMERO

Investigador Titular. Programa de Biología y Mejoramiento, Cenipalma

HERNÁN MAURICIO ROMERO ÁNGULO

Director de Investigación, Cenipalma
Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia.
hromero@cenipalma.org

Resumen

La polinización asistida es una labor prioritaria en el cultivo del híbrido interespecífico OxG que permite mantener su rendimiento y mejora la conformación de los racimos. El polen utilizado en esta labor proviene de la palma africana (*Elaeis guineensis*) y es aplicado por parte de operarios capacitados, quienes realizan esta actividad durante aproximadamente las ocho horas de una jornada laboral. Dada la importancia que tiene el polen para la polinización asistida en el cultivo del híbrido OxG, se monitoreó su capacidad de mantenerse vivo (viabilidad) y de germinar (germinabilidad) durante las 8 horas de una jornada de trabajo en campo. Para esto, el polen fue puesto a germinar *in vitro* en medio agar-agar en cajas Petri, las cuales fueron incubadas a 37 °C durante 120 min. La germinación fue comprobada mediante inspección visual

al microscopio. En esta evaluación, que se realizó en la zonas palmeras Suroccidental (Tumaco) y Central (Barrancabermeja) de Colombia, se observó que el porcentaje de viabilidad entre el inicio y el final de la jornada de trabajo no varió más allá de 10 %, mientras que la germinabilidad no superó el 25 % de variación entre el inicio y el final de las ocho horas de trabajo. Teniendo en cuenta este rango de variación, se recomienda evitar el uso de polen con germinabilidad inferior a 50 % y asegurar la calidad de este insumo usando polen con germinabilidad cercana o superior a 70 % para la polinización asistida del híbrido OxG.

Abstract

Assisted pollination is a priority task in the cultivation of the interspecific OxG hybrid that allows to maintain its yield and improve the formation of bunches. The pollen used in this work comes from African palm (*Elaeis guineensis*) and it is applied by trained operators who perform this activity during approximately eight hours of a working day. Given the importance of pollen on assisted pollination in the cultivation of the OxG hybrid, the ability of this compound to stay alive (viability) and to germinate (germinability) during 8 hours of a field work day was monitored. To do this, pollen was put to germinate *in vitro* in agar medium in Petri dishes. The dishes were incubated at 37 ° C for 120 min and germination verified by visual inspection under a microscope. In this evaluation, carried out in the Colombian Southwestern (Tumaco) and Central oil palm zones (Barrancabermeja), it was observed that the percentage of viability between the start and the end of the working day did not vary beyond 10%, while the germinability did not exceed 25% variation between the start and end of eight hours of the work day. Taking into account this range of variation, it is recommended to avoid the use of pollen with germination below 50% and ensure the quality of this input using pollen with germination close to or greater than 70% for the assisted pollination of OxG hybrids.

Introducción

El híbrido interespecífico OxG, resultante de la palma de aceite americana nolí (*Elaeis oleifera* Kunth-Cortés) y de la palma de aceite africana (*Elaeis guineensis* Jacq.), presenta una baja tasa de crecimiento del estípote y un buen desempeño en suelos húmedos o inundables (Hurtado, 1969). En las zonas de Colombia devastadas por la Pudrición del cogollo (PC), este se convirtió en la única alternativa de cultivo de palma de aceite debido a su resistencia parcial a la enfermedad (Corley & Tinker, 2003; Restrepo, Navia, Ávila, & Daza, 2012), implementándose de forma masiva en sitios que fueron golpeados por la PC como Tumaco (Nariño). No obstante, se observó durante la etapa productiva del híbrido OxG la exigencia de la polinización asistida con polen de palma africana (*Elaeis guineensis*), para mejorar hasta en 50 % la conformación y el peso de sus racimos (Arnaud, 1979; Alvarado, Bulgarelli, &

Moya, 2000; Forero, Hormaza, Moreno, & Ruíz, 2012; Mantilla, 2015; Sánchez, Daza, Ruíz, & Romero, 2011), considerando las escasas tasas de extracción de aceite, cuando no se polinizan las inflorescencias femeninas (Prada & Romero, 2012).

La polinización que en la palma de aceite africana ocurre natural y eficientemente a través del viento y de los insectos polinizadores, carece de éxito en el híbrido interespecífico OxG debido a que el polen que emiten sus inflorescencias masculinas tiene una germinabilidad inferior a 10 % (Arnaud, 1979; Alvarado *et al.*, 2000; Corley & Tinker, 2003; Sánchez *et al.*, 2011; Sánchez & Romero, 2013, Tandon, Manohara, Nijalingappa, & Shivanna, 2001). De igual manera, las inflorescencias femeninas del híbrido emiten de manera ineficiente el olor atractivo para los insectos polinizadores, sumado a la permanencia de las brácteas pedunculares hasta la madurez del racimo, las cuales en la etapa de antesis impiden o dificultan la entrada de los polinizadores a

la inflorescencia para que ocurra la polinización (Forero, Hormaza, Moreno, & Romero, 2012; Sánchez *et al.*, 2011). Por lo tanto, en las plantaciones sembradas con el híbrido interespecífico OxG, se lleva a cabo de forma prioritaria la polinización asistida para retirar o despejar las brácteas de las inflorescencias femeninas y luego aplicar a las flores en anthesis una mezcla de polen y talco (1:9) (Sánchez *et al.*, 2011; Sánchez & Romero, 2013), que, para el caso del primero, siempre viene acompañado de pruebas de viabilidad o germinabilidad para determinar la calidad del polen que se utilizará durante la labor de la polinización.

Aunque existen varios métodos para verificar la presencia de contenido celular al interior del grano de polen y considerarlo vivo (viabilidad), las tinciones que reaccionan con enzimas polínicas son las más rápidas, económicas y conocidas (Sunilkumar, Mathur, Sparjanbabu, & Reddy, 2013; Mantilla, 2015; Ordoñez, 2014). Tal es el caso de la tinción con acetocarmín al 1 %, que, cuando el grano del polen está vivo, se observa una tinción de color rojo (Marks, 1954), en donde la membrana citoplasmática del polen se mantiene intacta y, por lo tanto, dentro del conteo que se hace, se considera viable. Además de estar vivo, el grano de polen como mínima unidad reproductiva sexual masculina tiene la capacidad de extender su tubo polínico (germinar) para conducir las células espermáticas hasta el ovario de las flores femeninas, para así fecundarlas y formar frutos con semillas (Sunilkumar *et al.*, 2013). Esta característica de germinabilidad puede medirse *in vitro* con relativa facilidad y precisión, al simular las características de los estigmas de las flores (Rodríguez-Riaño & Dafni, 2000) tal como ocurre en palma de aceite para determinar su calidad (Corley & Tinker, 2003; Mantilla, 2015; Sánchez *et al.*, 2011; Sunilkumar *et al.*, 2013).

El polen de *Elaeis guineensis*, que se usa en la producción de semillas comerciales, el mejoramiento genético o para la polinización asistida en el cultivo del híbrido OxG, debe ser monitoreado como insumo biótico, ya que requiere especiales cuidados para su recolección, secado, empaque, transporte, almacenamiento y posterior uso. Por tal motivo, en plantaciones que masivamente requieren la polinización asistida del híbrido OxG, se han planteado inquietudes a través de organizaciones como la Mesa de Polinización de la Zona Suroccidental (Tumaco, Nariño) respecto

al desempeño del polen en el transcurso de toda la jornada de trabajo, ya que se utiliza durante un promedio de ocho horas por día.

Teniendo en cuenta lo anterior, a través del presente estudio se evaluó la viabilidad y la germinabilidad del polen de *Elaeis guineensis* durante una jornada de trabajo de ocho horas tanto en la Zona Suroccidental palmera de Colombia como en la Zona Central.

Materiales y métodos

Ubicación

En la Zona Suroccidental (Tumaco), las mediciones sobre las características de desempeño del polen durante la jornada de trabajo se llevaron a cabo en la plantación del Grupo Manigua, ubicada en el km 49 de la vía Tumaco - Pasto. La temperatura media regional es de aproximadamente 27 °C y su altura de 30 msnm. Por su parte, en la Zona Central palmera (Barrancabermeja) se realizaron las mediciones de desempeño del polen en el Centro Experimental Palmar de La Vizcaína (CEPV), cuya temperatura media regional es de 29 °C y cuenta con una altura media de 75 msnm.

La viabilidad del polen se evaluó al inicio (entre las 7:00 y 7:30 horas) y al final de cada jornada (entre las 14:30 y 15:00 horas), siguiendo el procedimiento reportado por Sánchez *et al.* (2011), en el cual se obtuvo una muestra del polen que se entregó al operario de polinización para su labor y se dispuso sobre una gota de agua en un portaobjetos, al que se agregó una gota de acetocarmín al 1 %. Transcurridos entre cinco y 10 minutos de reacción, se leyó la muestra al microscopio en el objetivo de 10x de aumento, y se contaron los granos de polen teñidos por el acetocarmín (vivos) y no teñidos (muertos) hasta completar 100 granos de polen por muestra.

Medición de germinabilidad *in vitro* del polen

El medio de cultivo para la evaluación *in vitro* de la germinabilidad del polen en Tumaco se preparó siguiendo el método empleado por el Grupo Manigua –modificado del procedimiento descrito por Arnaud (1979) y Sánchez *et al.* (2011)–, agregando 1 g de agar-

agar y 5 g de azúcar blanca por cada 100 ml de agua dentro de un Erlenmeyer, el cual fue posteriormente puesto a fuego alto en una estufa eléctrica hasta punto de ebullición. Esta mezcla se mantuvo durante 15 minutos en ebullición constante, luego de lo cual fue distribuida en máximo 12 cajas Petri. En el CEPV se usó agua desionizada y pura (Milli-Q) con el mismo método de preparación para el medio de cultivo.

La germinación del poles (*Elaeis guineensis*) se midió durante nueve días efectivos en Tumaco y cinco días efectivos en el CEPV. Se sembró por triplicado una muestra de polen y de mezcla comercial con talco (1:9) iniciando entre las 7:00 y 7:30 horas de la mañana, y, a partir de ese momento, cada 90 minutos se sembraron muestras entre dos y tres cajas de Petri, tanto con polen, como con la mezcla comercial hasta el final de la jornada de labor en campo. Cada muestra se llevó a incubación a 37 °C durante 120 minutos, según lo establecido por Arnaud (1979), y, al finalizar el periodo de incubación, se hizo choque térmico de 15 minutos para detener la germinación del polen y evaluar en igualdad de condiciones cada una de las muestras.

En Tumaco, cada caja sembrada se dividió en cuartos y en cada cuarto se leyeron manualmente uno a uno, 200 granos de polen entre germinados (con tubo polínico) y no germinados (Sánchez *et al.*, 2011). Entre tanto, para el conteo en el CEPV se tomó una fotografía en cada tercio de las cajas de Petri sembradas y en estas (Figura 1), con ayuda del *software* de

libre distribución ImageJ, se hizo el conteo de granos de polen germinados (#1) y no germinados (#2). Las fotografías y los datos fueron tabulados y almacenados de forma digital. El porcentaje de germinabilidad se calculó para cada cuadrante o tercio de la muestra, también para cada caja Petri y repetición y en conjunto para cada siembra teniendo en cuenta la cantidad de granos de polen germinados frente a la cantidad total de granos de polen contados (germinados + no germinados):

$$\% \text{ germinabilidad} = (\# \text{ granos de polen contados} / \# \text{ granos de polen germinados}) * 100).$$

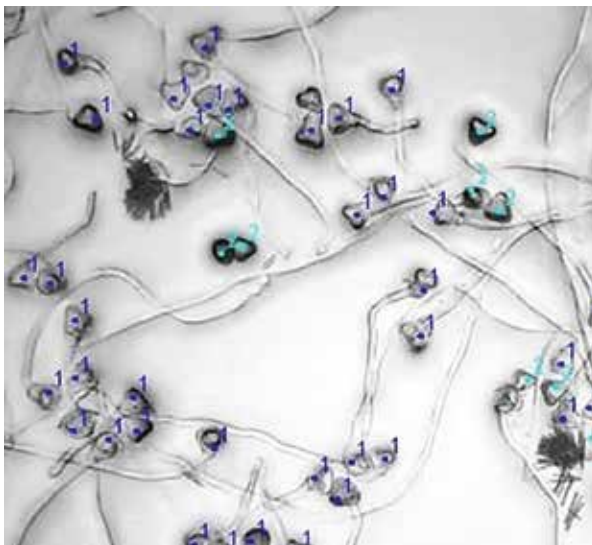
Resultados y discusión

Viabilidad

La viabilidad del polen (*Elaeis guineensis*) se midió con acetocarmín al 1 % al inicio y final de 10 jornadas de polinización asistida en la plantación del Grupo Manigua en Tumaco. Se observó que el porcentaje de granos de polen vivos entre el inicio y el final de la jornada laboral no varió más allá de 10 % (Figura 2). Además, el 96 % de los granos de polen de las muestras se tiñeron con acetocarmín al inicio de la jornada, lo que indica que se usó polen de óptima calidad, el cual se mantuvo hasta el final de la jornada, ya que se observó 94 % de viabilidad. La disminución de la viabilidad entre el inicio y el final de la jornada fue menor a 5 puntos porcentuales, respuesta que no se esperaba,

Figura 1. Fotografía de germinación *in vitro* de polen tomada al microscopio en 10x de aumento.

Nota: sobre esta imagen se hizo el conteo de germinabilidad del polen con el *software* de libre distribución Image J, tomando como 1 los granos de polen germinados, y 2, los no germinados.



considerando las variaciones de temperatura y humedad que presenta la Zona Suroccidental.

Germinabilidad

A través de la medición de la germinabilidad del polen y su mezcla comercial en el transcurso de la jornada

laboral, con un periodo de evaluación cada 90 minutos, se pudo observar que la germinabilidad del polen y la mezcla comercial de *E. guineensis* se mantuvieron relativamente constantes o con variaciones, que en el caso del polen sin mezcla no superaron el 25 % entre el inicio y el final de cada jornada y entre los seis puntos de medición, como se muestra en la Figura 3 y en la Tabla 1.

Figura 2. Porcentaje de viabilidad de polen *Elaeis guineensis* utilizado comercialmente para la labor de polinización asistida, medido al inicio y final de cada jornada con tinción acetocarmín al 1 %.

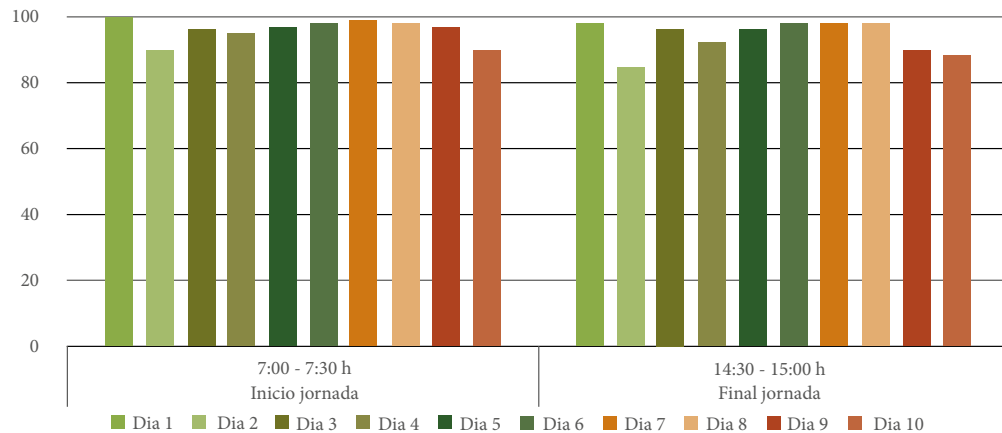


Figura 3. Porcentaje de germinabilidad del polen (barra oscura) y la mezcla comercial con talco inerte (barra clara), evaluado cada 90 minutos desde el inicio hasta el final de la jornada (días) 1, 3, 6 y 10, entre los nueve días muestreados en una plantación de la Zona Suroccidental (Tumaco).

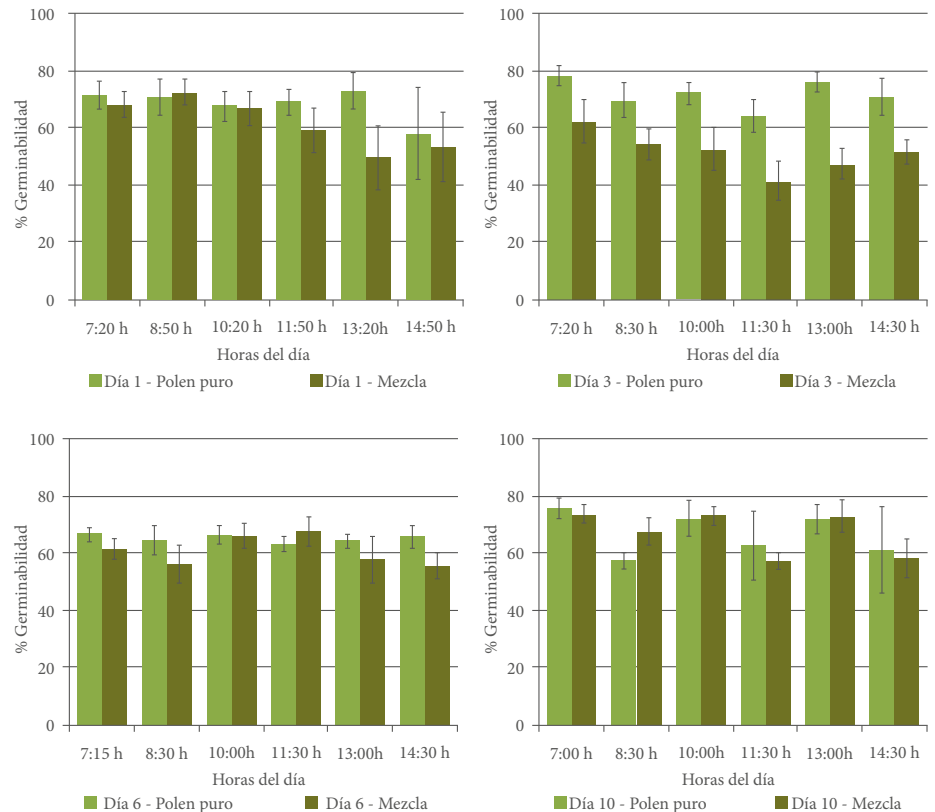


Tabla 1. Rango de germinabilidad, junto con máximos y mínimos observados durante cada una de las nueve jornadas de trabajo en las que se evaluó la germinabilidad del polen.

Día	Mezcla: polen +talco			Polen		
	Mínimo	Máximo	Rango	Mínimo	Máximo	Rango
1	49,8	72,5	22,7	57,7	72,8	15,1
3	41,3	62,1	20,8	64,0	78,1	14,1
4	28,8	51,5	22,7	49,1	65,6	16,5
5	57,0	74,2	17,2	60,6	75,6	15,0
6	55,8	68,3	12,5	63,5	67,0	3,5
7	38,4	59,7	21,3	57,6	70,6	13,0
8	60,4	66,7	6,3	63,2	70,9	7,7
9	55,0	65,6	10,6	61,4	68,5	7,1
10	57,0	73,7	16,7	57,2	75,8	18,6

Este resultado fue contrario a la hipótesis inicial del Comité de la Mesa de Polinización de la Zona Suroccidental, según la cual, conforme transcurre el día de trabajo, el polen, ya fuera puro o en mezcla comercial con el talco inerte, perdería su germinabilidad.

A pesar de que la germinabilidad del polen de *E. guineensis* dentro de la mezcla comercial con el talco o dispersante en proporción 1:9 fue relativamente constante y no presentó tendencia única de aumento o descenso, pero sí se observó que la variabilidad y dispersión de la germinación aumentó. Esto se relacionó con la dificultad inherente al leer las muestras en el microscopio óptico, ya que las partículas asociadas al talco (de la mezcla comercial) se agruparon, lo que dificultó el conteo manual de los granos de polen y sus tubos polínicos, tal como se observa en la Tabla 1.

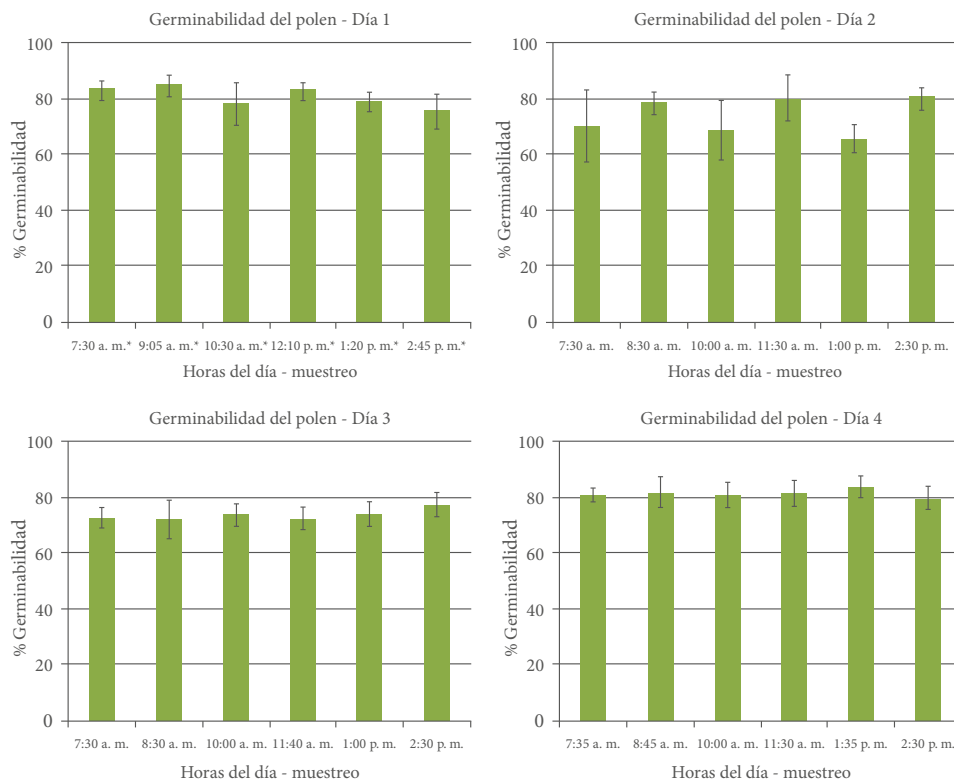
De forma consistente, se observó que el polen en mezcla comercial con el talco (1:9) evaluado en el Campo Experimental Palmar de la Vizcaína, se mantiene relativamente constante en los seis puntos de muestreo a lo largo del día, como se observa en la Figura 4.

Aunque, en general, se observó una mayor germinabilidad del polen (*Elaeis guineensis*) en la Zona Central con respecto a la germinabilidad medida en Tumaco, esto se asoció con el agua desionizada (de Milli-Q) usada en la preparación del medio de cultivo en la Zona Central más que al origen o tipo de polen y su mezcla comercial con talco (datos no publicados).

Además, se observó una menor dispersión de datos en las mediciones hechas en la Zona Central en comparación con las realizadas en Tumaco. Esto se asoció con el método de aplicación de la mezcla de polen y talco que se tiene en el CEPV para la labor de polinización asistida, ya que se obtuvo una dispersión más homogénea en el medio de cultivo, lo que a su vez se reflejó en las cajas de Petri sembradas y facilitó la medición de la germinabilidad; entre otras, porque el talco inerte de la mezcla no se agrupó ni dificultó la lectura del polen germinado. Adicionalmente, la toma de fotografías digitales de varios campos al microscopio de las diferentes muestras, optimizó la verificación y el conteo de los granos de polen, que se hizo a través del *software* de libre distribución ImageJ.

En conclusión, a partir de las mediciones de viabilidad del polen realizadas en la Zona Suroccidental se observó que el polen se mantuvo vivo de forma constante entre el inicio y el final de las ocho horas de cada jornada de trabajo, lo cual es un indicativo de calidad de este insumo. También se observó que, tanto en la Zona Suroccidental como en la Central, de manera consistente, el polen de origen *E. guineensis*, utilizado para la polinización asistida del híbrido interespecífico OxG, presenta variaciones que no superan el 25 % entre el registro más alto y el más bajo de germinabilidad en una misma jornada de trabajo, lo cual fue contrario a la hipótesis inicialmente planteada por la Mesa de Polinización de la Zona Suroccidental.

Figura 4. Porcentaje de germinabilidad del polen en mezcla comercial (polen talco en relación 1:9) evaluado durante la jornada de trabajo en el Campo Experimental Palmar de la Vizcaína.



Teniendo en cuenta el rango de variabilidad que puede presentarse en la germinabilidad en el transcurso de la jornada de trabajo, se recomienda eludir el uso de polen con germinabilidad cercana o inferior a 50 %, para también evitar la pérdida de la calidad de este insumo de la polinización asistida y usar solo polen con germinabilidad cercana o superior a 70 %.

En adelante, es necesario evaluar la eficiencia en los métodos de aplicación del polen sobre las inflorescencias femeninas, así como el despeje de las brácteas en la inflorescencia, como factores de impacto en la labor de polinización asistida.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los ingenieros Manuel Marín y Esmeralda Matute, así como al resto del equipo de la plantación Central Manigua y a los colaboradores del Campo Experimental Palmar de la Vizcaína por su colaboración en el desarrollo de este trabajo. Finalmente, se agradece a Colciencias y al Fondo de Fomento Palmero por su financiación, al igual que a los integrantes de las mesas de trabajo de la Zona Suroccidental, por su interés e iniciativa en torno al cultivo del híbrido OxG, que plantea numerosos e interesantes retos al sector palmicultor colombiano.

Referencias

- Alvarado, A., Bulgarelli, J., & Moya, B. (2000). Germinación del polen en poblaciones derivadas de un híbrido entre *Elaeis guineensis* Jacq. y *E. oleifera* HBK, Cortes. *ASD Oil Palm Papers*, 20, 35-36.

- Arnaud, F. (1979). Polinización asistida en las plantaciones de palma aceitera (1). *Palmas*, 1(1), 33-38.
- Corley, R. H. V., & Tinker, P. B. (2003). *The Oil Palm*. Oxford: John Wiley & Sons.
- Forero, H. D. C., Hormaza, M. P. A., Moreno, C. L. P., & Ruiz, R. R. (2012). *Generalidades sobre la morfología y fenología de la palma de aceite*. Bogotá: Cenipalma.
- Hurtado, M. J. R. (1969). *Estudio de la palmera Nolí (Elaeis melanococca Gaert.) y preliminares de su fitomejoramiento en Colombia* (tesis de grado). Universidad Nacional de Colombia, Palmira.
- Mantilla, V. E. P. (2015). *Evaluación de la viabilidad y compatibilidad de polen de distintos materiales híbridos de palma aceitera (Elaeis oleifera x Elaeis guineensis)* (trabajo de grado). Universidad de las Américas, Quito.
- Marks, G. E. (1954). An aceto-carminic glycerol jelly for use in pollen-fertility counts. *Stain technology*, 29(5), 277.
- Ordoñez, B. (2014). *Determinación de la viabilidad y fertilidad del polen*. Lima: Centro Internacional de la Papa.
- Prada, F., & Romero, H. M. (2012). Muestreo y análisis de racimo en el cultivo de la palma de aceite. En Cenipalma, *Tecnologías para la agroindustria de la palma de aceite: Guía para facilitadores* (p. 158). Bogotá: Cenipalma.
- Restrepo, E. F., Navia, E. A., Ávila, R. A., & Daza, E. S. (2012). Use of epidemiological tools to differentiate the ability of various oil palm materials to respond to the bud rot disease under field conditions. *International Seminar on Breeding for Oil Palm Disease Resistance*. Bogotá, Colombia.
- Rodriguez-Riano, T., & Dafni, A. (2000). A new procedure to assess pollen viability. *Sexual Plant Reproduction*, 12(4), 241-244.
- Sánchez, A., Daza, E. S., Ruíz, R., & Romero, H. M. (2011). Polinización asistida en palma de aceite. En Cenipalma, *Tecnologías para la agroindustria de la palma de aceite: Guía para facilitadores* (p. 167). Bogotá: Cenipalma.
- Sánchez, R., & Romero, H. (2013). Viabilidad y morfología del polen de diferentes materiales de palma de aceite. *Ceniavances*, Cenipalma, 171, 1-4.
- Sunilkumar, K., Mathur, R. K., Sparjanbabu D. S., & Reddy, A. G. K. (2013). Pollen viability and vigour in interspecific hybrids (*E. guineensis* x *E. oleifera*) of oil palm. Short Scientific Report. *Journal Plantation Crops*, 41(1):91-94.
- Tandon, R., Manohara, T. N., Nijalingappa, B. H. M., & Shivanna, K. R. (2001). Pollination and pollen-pistil interaction in oil palm, *Elaeis guineensis*. *Annals of Botany*, 87, 831-838. doi: 10.1006/anbo.20011421