

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



Estudio Comparativo de Viabilidad y Germinación de Polen en Variedades  
Polinizadoras de Manzano (*Malus domestica* Borkh)

Por:

**EDITH VÁZQUEZ BAXCAJAY**

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN**

Saltillo, Coahuila, México. Octubre 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Estudio Comparativo de Viabilidad y Germinación de Polen en Variedades  
Polinizadoras de Manzano (*Malus domestica Borkh*)

Por:

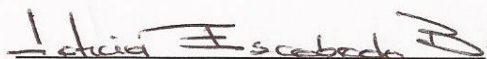
**EDITH VÁZQUEZ BAXCAJAY**

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN**

Aprobada



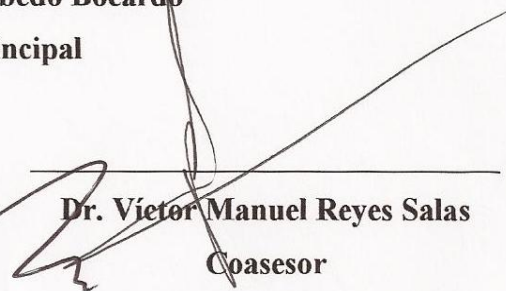
**M.C. Leticia Escobedo Bocardo**

**Asesor Principal**



**Dr. José Antonio Vázquez Ramos**

**Coasesor**



**Dr. Víctor Manuel Reyes Salas**

**Coasesor**

**Dr. Leobardo Bañuelos Herrera**

**Coordinador de la División de Agronomía**

Saltillo, Coahuila, México. Octubre de 2012

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios y a la Virgencita de Guadalupe. Porque me han conservado con vida, salud, me dan inteligencia, me han guiado y cuidado hasta hoy. Por haberme dado la sabiduría y la fortaleza para que fuera posible alcanzar este triunfo.*

*A la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” por abrirme sus puertas y por haberme dado la oportunidad y ofrecerme todo para realizar mis estudios superiores, y formarme como profesionista en su seno.*

*Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias C. E Saltillo por el apoyo para la realización y elaboración de esta investigación de Tesis.*

*Al Dr. José Antonio Vázquez Ramos por su confianza, gran apoyo y el tiempo dedicado para poder culminar con este proyecto, gracias por sus consejos y enseñanzas.*

*Al M.C. Leticia Escobedo Bocardó y Dr. Víctor M. Reyes Salas, por sus comentarios y críticas durante las revisiones.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado para la realización de esta investigación.*

## DEDICATORIA

### *A Dios y a la Virgen de Guadalupe*

*Porque me han conservado con vida y salud. Por haberme dado la sabiduría y la fortaleza para que fuera posible alcanzar este triunfo.*

### *A mis padres*

#### *Hortencia Inés Baxcajay Cerroblanco*

*A ti mamita hermosa, por ser mi ángel de la guardia siempre me das fuerzas para seguir adelante. Porque desde pequeña siempre estuviste conmigo velando y cuidando mis sueños, Por esas lágrimas que vi caer sobre tus mejillas cada que me alejaba de casa pero de las cuales me daban fuerza para seguir luchando día a día. Por eso y mucho más te doy gracias mamita.*

#### *Jerónimos Vázquez Toquilla*

*A ti papito hermoso por enseñarme a no tener miedo a fracasar, a nunca decir no puedo, a enfrentar los problemas de la vida y sobre todo por el apoyo económico que me has brindado.*

*A mis padres, porque creyeron en mí y me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, por su comprensión y ayuda en momentos malos y buenos. Me*

*han enseñado a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia, mi empeño y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mí fue lo que me hizo ir hasta el final. Gracias por el apoyo moral, económico e incondicional que me brindaron en cada tropiezo que tuve Esta tesis va por ustedes por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí. Los amo papitos.*

#### ***A mis hermanos***

*Bulmaro, Sulpicio, Pablo, Liberia, Irene, Rogelio y Carolina*

*Quienes siempre estuvieron apoyándome en todo momento y supieron darme un consuelo cuando la ausencia de los míos se hacía notar. Sin ustedes este merito no se hubiese conseguido. Gracias por confiar en mí, por su comprensión, por su cariño, apoyo incondicional y económico. Los adoro.*

#### ***A mi hijo y a su papá***

*Ángel Jesús Cabrera Vázquez (†)*

*Querido hijo nunca voy a ser la misma porque no estás a mi lado. Trato de buscarte entre los chicos que veo*

*diariamente y sin embargo no te descubro. Miro las caritas de los niños recordando cuando eras chiquito y vuela mi mente pero me quedo vacía porque sé que no estamos juntos. Hubiese dado todo por irme yo, pero la vida te llevó a tí primero y me quedo sola con tu recuerdo. No olvido cuando te bañábamos, cuando calmábamos tus lagrimitas y más cuando te robábamos besitos tu papá y yo, cuando todo era felicidad contigo. A pesar de todo tengo que agradecerte el haberte conocido y nada me puede quitar la sublime sensación y emoción al tenerte a mi lado poco después de haber dado a luz.*

*Querido hijo. Un día nos vamos a encontrar pero mientras tanto siempre estarás vivo en mis maravillosos recuerdos. Te amo Ángel Jesús Cabrera Vázquez por toda la eternidad.*

*José Juan Cabrera López*

*Primero que nada gracias por darme la dicha de ser madre además de ser el papá de nuestro dulce y eterno amor, pedacito de cielo Ángel Jesús Cabrera Vázquez†. Muchas gracias de aquellos buenos y malos momentos de triunfos y fracasos que pasamos juntos. Gracias por haber sido mi compañero, amigo y sobre todo mi amorcito. Y en su momento tú también fuiste mi gran inspiración y mi apoyo para culminar mis estudios. Te quiero mucho y siempre te recordare.*

### *A mi sobrina*

*Cristal Cruz Vázquez*

*Por ser mi alegría, el renacimiento del amor en mi familia y porque a pesar de mis ocupaciones, siempre tienes esa invitación para estar conmigo y jugar.*

### *A Mis Abuelitos*

*José Vázquez<sup>†</sup>, Virginia Toquilla<sup>†</sup>*

*Yo sé que aunque no están en la tierra físicamente, sí están con nosotros. Dios los ilumine donde quiera que estén y gracias por el gran papá que me regalaron.*

*Gregoria Cerroblanco Peña, Agapito Baxcajay Cantha*

*Gracias por la mamá más linda del mundo que me regalaron. Por su cariño especial y su confianza de siempre.*

### *A mis tíos y primos*

*Gracias porque de una u otra manera estuvieron pendientes de mí a lo largo de mi estancia en saltillo, brindándome su cariño y su apoyo.*

### *A mis mejores amigos*

*Por estar en los mejores momentos y hacer que los malos se pasen rápido. En especial a: Yesenia R. G., Gumercindo C. M., Erika A. M., Iván C. A., Javier M. H., Josué P. M.,*

*Verónica V. A., Nahúm B. B., Hermenegildo A. A., Juan Carlos L. R. y Gerardo R. H. Porque en cada uno de ustedes hay una persona muy especial. He aprendido y disfrutado con ustedes mis horas de estudio, por la ayuda cuando en ocasiones me he sentido perdida, por aquellas lágrimas y esas risas que un día compartimos juntos y por esa amistad sincera que me brindaron. Recuerden siempre los llevaré en mi corazón. Los quiero mucho a todos. Cynthia V. J., Daniela A. A., Nidia P. V., Isaías A. A., Claudio J. C., Crescenciano G. M., Facundo G. B., Sandra C. C., Viviani B. L., José Luis P. C., Elia de la R. H., Abiram G. Z., y Diana C. L.*

#### ***A la generación 2007-2011 de Ing. Agrónomo en Producción***

*Gracias a cada uno de mis compañeros, por su simpatía y amistad, por sus bromas que cada día le daban un matiz cálido a nuestra vida estudiantil.*

*No me puedo ir sin antes decirles, que sin ustedes a mi lado no lo hubiera logrado, tantas desveladas sirvieron de algo y aquí está el fruto. Les agradezco a todos ustedes con toda mi alma el haber llegado a mi vida y el compartir momentos agradables y momentos tristes, pero esos momentos son los que nos hacen crecer y valorar a las personas que nos rodean. Los quiero mucho y nunca los olvidaré.*



## RESUMEN

Se realizó este experimento para evaluar en laboratorio el potencial de viabilidad y germinación del polen de diferentes variedades polinizadoras de manzano de la Sierra de Arteaga Coahuila, Gale Gala, Corail, Pacific Gala, Buckeye Gala, Golden Verde, Golden Vigas, Imperial Gala, John Dawnee, Top Red, Selección III, Cameo, Golden Tunal, Selección II, Manchurian, durante Marzo y Abril del 2011 y 2012. El polen se colectó en San Antonio de las Alazanas, Arteaga, Coahuila y se mantuvo en refrigeración. Las pruebas de viabilidad se realizaron utilizando tres métodos de tinción: Acetocarmín 1%, Naphthol Blue Black (Búfalo Black) 0.1% y Safranina 1%. Se realizaron tinciones con tres repeticiones de cada genotipo y se observaron cinco campos al microscopio en 10X y 40X. Golden Vigas, John Dawnee, Selección III, Top Red y Golden Verde, presentaron los porcentajes más altos de viabilidad con 89.22, 88.02, 88.55, 87.41 y 86.26%, respectivamente. En cuanto a la germinación, se probaron cinco concentraciones de sacarosa (5, 10, 15, 20, 25%) en una disolución con agar al 1% a diferentes tiempos (4, 8, y 12 hrs.), donde las variedades Selección II, Selección III y Top Red, presentaron altos porcentajes con 71.69, 88.55, 87.41%. Se concluye que no hubo diferencia para los tres colorantes utilizados en la tinción de los granos de polen; Acetocarmín, Safranina y Búfalo Black ya que todos tiñeron correctamente el grano del polen, sin embargo, Acetocarmín tiñe al grano de polen con mayor calidad para su observación en el microscopio. Entre los diferentes tratamientos probados de 5, 10, 15, 20 y 25% de sacarosa en el medio de cultivo, podemos concluir que no presentaron diferencia estadística entre ellos. En cuanto a los diferentes tiempos de observaciones realizadas; 4, 8 y 12 horas podemos concluir que el tiempo con la mayor cantidad de polen germinado de las variedades polinizadoras de manzano fue a las 12 horas con 48.30% de polen germinado.

**Palabras clave:** Manzano, Polen, Viabilidad, Germinación.

## ABSTRACT

This experiment was conducted for evaluation in laboratory of viability and germination potential of pollen of different apple variety pollinators in the Sierra de Arteaga Coahuila; Gale Gala, Corail, Pacific Gala, Buckeye Gala, Golden Verde, Golden Vigas, Imperial Gala, John Dawnee, Top Red, Selection III, Cameo, Golden Tunal, selection II and Manchurian, during March and April of 2011 and 2012. Pollen was collected in San Antonio de las Alazanas Arteaga Coahuila and placed in refrigeration. Viability tests were carried out using three methods of staining: Acetocarmine 1%, Naphthol Blue Black (Black Buffalo) 0.1% and Safranin 1%. Staining with three replications of each genotype were performed and observed five fields under the microscope at 10 X and 40 X, Golden Vigas, John Dawnee, Selection III and Top Red showed the highest percentages of viability with 89.22, 88.02, 88.55 and 87.41%, respectively. For germination, five concentrations of sucrose (5, 10, 15, 20, 25%) in a solution were tested with agar to 1% at different times (4, 8, and 12 hrs.), where the varieties selection II, Golden Tunal, selection III, because is Top Red, showed high percentages with 87.41 88.55 71.69, 48.89%. It is concluded that the best staining technique is that of Acetocarmine 1% and the concentrations of sucrose not showed differences. We concluded that not have difference for tinction treatments and all painted correctly the pollen grain although Acetocarmine paint the pollen grain with best quality for observation in the microscope. Between different treatment of saccharine in the cultivation media we concluded that not showed statistical differences between it. In the different times for observation, 4, 8, and 12 hours we can conclude at the best time with more pollen germination was to 12 hours with 48.30% percent.

**Key word:** Apple, Pollen, Viability, Germination.

## ÍNDICE GENERAL

<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>x</b>
<b>ÍNDICE GENERAL .....</b>	<b>xi</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS .....</b>	<b>xiv</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>xvi</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
Objetivo General.....	3
Objetivos Específicos .....	3
Hipótesis .....	3
<b>REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
Historia y origen .....	4
El manzano en Coahuila.....	5
Clasificación y descripción botánica.....	7
Descripción taxonómica .....	7
La reproducción .....	8
Floración.....	9
Organogénesis floral.....	9

Inducción Floral en Manzano .....	11
Fases de la inducción floral .....	11
Antesis (Apertura floral) .....	12
Morfología y anatomía de la flor de manzano .....	12
Formación del grano de polen (Microsporogenesis).....	15
Formación del saco embrionario (Megaesporogénesis).....	17
El polen.....	19
Recolección y manejo de polen .....	20
Pruebas de laboratorio en polen.....	21
Viabilidad y germinación del polen .....	21
Fecundación en las plantas con flor .....	23
Receptividad estigmática.....	24
Polinización .....	26
Periodo efectivo de polinización de manzano.....	26
Tubo polínico y fecundación.....	27
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
Área de estudio .....	29
Material de laboratorio utilizado:.....	29
Reactivos utilizados: (Tinciones).....	30
Equipo de laboratorio utilizado.....	30
Material vegetativo .....	31
Colecta de botones florales en campo .....	31
Obtención del polen en el laboratorio .....	32
Viabilidad de polen de variedades polinizadoras de manzano .....	32

Preparación de las soluciones de Tinción con Acetocarmín, Naphtol Blue Black (Búfalo Black) y Safranina .....	32
Solución de Acetocarmín (Carmín acético).....	32
Solución de Búfalo Black 0-01% (Naphtol Blue Black).....	33
Solución de Safranina .....	33
Tinción de polen.....	33
Análisis estadístico para viabilidad del polen .....	35
Germinación del polen de variedades polinizadoras de manzano .....	36
Preparación del medio de cultivo para germinación del polen .	36
Potencial de germinación del polen.....	37
Análisis estadístico para germinación del polen .....	38
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>40</b>
Viabilidad de polen de variedades polinizadoras de manzano .....	40
Viabilidad del polen de las variedades polinizadoras de manzano para el ciclo agrícola 2009-2010 .....	40
Viabilidad del polen de las variedades polinizadoras de manzano para el ciclo agrícola 2010-2011 .....	44
Germinación de polen de variedades polinizadoras de manzano .....	49
Germinación del polen de variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2009-2010 .....	49
Germinación de polen de variedades polinizadoras de manzano para el ciclo agrícola 2010-2011 .....	53
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>61</b>
Viabilidad del polen de las variedades polinizadoras de manzano .....	61
Germinación del polen de las variedades polinizadoras de manzano .....	61
<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>63</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Material vegetativo utilizado. ....	31
<b>Cuadro 2.</b> Análisis de varianza para la viabilidad de polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2009-2010. ....	40
<b>Cuadro 3.</b> Prueba de comparación de medias de Tukey para viabilidad del polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2009-2010. ....	41
<b>Cuadro 4.</b> Prueba de comparación de medias de Tukey para viabilidad del polen utilizando medio de cultivo con 15, 20, y 25% de sacarosa como tratamiento de tinción de polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2009-2010. ....	43
<b>Cuadro 5.</b> Análisis de varianza para viabilidad del polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011. ....	44
<b>Cuadro 6.</b> Prueba de comparación de medias de Tukey para viabilidad por tinción del polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011. ....	45
<b>Cuadro 7.</b> Prueba de comparación de medias de Tukey para viabilidad por tratamientos de tinción del polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011. ....	47
<b>Cuadro 8.</b> Análisis de varianza para la germinación del polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2009-2010. ....	49
<b>Cuadro 9.</b> Prueba de comparación de medias de Tukey para la germinación del polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2009-2010. ....	50
<b>Cuadro 10.</b> Prueba de comparación de medias de Tukey para la germinación del polen utilizando medio de cultivo con 15, 20 y	

25% de sacarosa como tratamientos en las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2009-2010. ....	52
<b>Cuadro 11.</b> Análisis de varianza para la germinación del polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011.....	53
<b>Cuadro 12.</b> Prueba de comparación de medias de Tukey para la germinación de polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011. ....	54
<b>Cuadro 13.</b> Prueba de comparación de medias de Tukey para la germinación del polen utilizando medios de cultivo con 5, 10, 15, 20, 25% de sacarosa como tratamiento en las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011. ....	56
<b>Cuadro 14.</b> Prueba de comparación de medias de Tukey para la germinación del polen por observaciones en las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011. ....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Flor del manzano. (Coutanceau, 1971).....	13
<b>Figura 2.</b> Morfología de una flor hermafrodita (Sánchez, 2005). .....	14
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida de una angiosperma. (Sánchez, 2005). .....	14
<b>Figura 4.</b> Partes de un estambre y corte de una antera (Sánchez, 2005).....	15
<b>Figura 5.</b> Partes de polen (Sánchez, 2005).....	15
<b>Figura 6.</b> Grano de polen. (Rallo, 1986). .....	16
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática de una microsporogenesis típica de angiospermas. (Modificado de McCormick, 1993). .....	17
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática típica de una megasporogénesis. (Cuevas, 2009). .....	18
<b>Figura 9.</b> Rudimento seminal óvulo (Sánchez, 2005) .....	18
<b>Figura 10.</b> Saco embrionario, Sánchez, 2005). .....	18
<b>Figura 11.</b> Formación del tubo polínico, (Sánchez, 2005).....	24
<b>Figura 12.</b> Fecundación, (Sánchez, 2005). .....	24
<b>Figura 13.</b> Observación del polen en el microscopio digital.....	34
<b>Figura 14.</b> Estados del polen: A) Polen viable, B) Polen no viable C) Polen colapsado. ....	34
<b>Figura 15.</b> Preparación del medio de cultivo para germinación de polen.....	37
<b>Figura 16.</b> Potencial de germinación del polen evaluado en Laboratorio. ....	38
<b>Figura 17.</b> Viabilidad del polen de variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2009-2010. ....	42
<b>Figura 18.</b> Viabilidad del polen de variedades polinizadoras de manzano utilizando medio de cultivo con 15, 20 y 25% de sacarosa como tratamiento de tinción del polen en el ciclo agrícola 2009-2010.....	43
<b>Figura 19.</b> Viabilidad del polen de variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011. ....	46



<b>Figura 20.</b> Viabilidad del polen de variedades polinizadoras de manzano con diferentes tratamientos de tinción en el ciclo agrícola 2010-2011.....	47
<b>Figura 21.</b> Germinación del polen para variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2009-2010.....	51
<b>Figura 22.</b> Germinación del polen por tratamientos (medio de cultivo con 15, 20 y 25%) para variedades polinizadoras de manzano durante el ciclo agrícola 2009 - 2010. ....	52
<b>Figura 23.</b> Germinación del polen de las variedades polinizadoras de manzano para el ciclo agrícola 2010-2011.....	55
<b>Figura 24.</b> Germinación del polen de los tratamientos (medio de cultivo con 5, 10, 15, 20 y 25% de sacarosa) para variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011.....	56
<b>Figura 25.</b> Germinación del polen por observaciones para las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011.....	58

## INTRODUCCIÓN

En la región manzanera del estado de Coahuila, se presenta un problema muy marcado en la calidad de la manzana, el cual es generado de la baja acumulación de frío, las granizadas y por la mala polinización.

La mala polinización es ocasionada por la incompatibilidad en los tiempos de brotación de los materiales polinizadores y las variedades comerciales de manzano y provoca bajo porcentaje de amarre de fruto, forma del fruto irregular generada por el aborto de semillas, siendo un factor determinante en el rendimiento final de la manzana de la región.

Esta situación afecta a la fruticultura complicando la producción, incrementando los costos y obligando a los productores a utilizar diferentes técnicas para lograr que los árboles cumplan los requerimientos de frío necesarios, si se toma en cuenta que las temperaturas al momento de floración aparentemente afectan la producción de polen, el problema se acentúa. En el caso de floraciones tardías, provoca baja brotación y aborto de flores por lo que se pierde hasta un 80% de la producción potencial (Reyes, 1977).

Las variedades polinizadoras de mayor uso en la sierra de Arteaga, Coahuila son Manchurian que poliniza las variedades comerciales Vigas y Brotador y las variedades Top Red, Rome Beauty, Red Shiff y Red Ace que polinizan las variedades comerciales más tardías como Golden Verde, Aguanueva y Golden Normal.

La disyuntiva de un uso correcto de los polinizadores para dichas variedades ha generado la necesidad de determinar de manera más certera cual es

el polinizador idóneo para cada uno de las variedades que se utilizan en los diferentes cañones de la sierra de Arteaga.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Evaluar en laboratorio el potencial de viabilidad y germinación del polen de diferentes variedades polinizadoras de manzano de la Sierra de Arteaga Coahuila.

### **Objetivos Específicos**

Determinar la viabilidad del polen de genotipos polinizadores en manzano aplicando diferentes colorantes de polen.

Estimar el potencial de germinación del polen de genotipos polinizadores en manzano utilizando diferentes concentraciones de sacarosa en el medio nutritivo.

### **Hipótesis**

Los genotipos polinizadores del manzano de la Sierra de Arteaga presentan diferentes niveles de viabilidad y potencial de germinación.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Historia y origen

El cultivo del manzano se remonta al origen de toda civilización. Los restos más antiguos de manzana corresponden a la época más reciente de la Edad de Piedra, entre 8000 y 2500 años a C., se reportan cultivos de manzano en el periodo de Hallstatt, correspondiente a la primera época de la Edad de Hierro.

La manzana ha sido un fruto simbólico a lo largo de la historia, se cita en la Biblia como el fruto prohibido que provocó la expulsión del ser humano del paraíso. Incluso sin conocer su composición química y sus propiedades nutricionales, la sabiduría popular siempre le ha atribuido virtudes saludables. (Ramírez y Cepeda, 2001).

Hace miles de años que se cultiva este frutal. En el siglo XII a.C. el manzano era plantado en los fértiles valles del Río Nilo en tiempos del faraón Ramsés III. En la mitología griega, la manzana de oro que París entrega a la diosa Venus y que provoca la enemistad entre Atenea y Hero, pasó a la historia como la conocida "manzana de la discordia" desatando la guerra de Troya. Se desconoce el origen exacto del manzano. El *Malus sieversii* (Ledeb.) Roem, es una especie silvestre que crece en las regiones montañosas de Asia central y podría ser el manzano del cual hace 15.000 ó 20.000 años aparecieron las primeras especies cultivadas de este árbol.

La manzana fue introducida en la península Ibérica por los romanos y los árabes. Este frutal fue traído por primera vez a América, a principios de 1600, por pobladores Europeos. Su expansión por este continente se realizó por los desplazamientos de los europeos o por sus descendientes. (Ramírez y Cepeda, 1993).

### **El manzano en Coahuila**

El manzano es un frutal caducifolio de clima templado que se cultiva en las partes altas de México. Su producción ha aumentado notablemente debido a la demanda que tiene esta fruta en consumo fresco y en su industrialización. La manzana en nuestro país, se coloca en el décimo lugar en producción con el 1.99% del volumen total de los productos frutícolas perennes y es una de las frutas más consumidas con 6.5 kg por persona al año. (SAGARPA, 2007).

En el estado de Coahuila, la Sierra de Arteaga es la principal zona productora de manzana (SAGARPA, 2007). Para obtener rendimientos altos en el manzano se requiere de un buen amarre de fruto (Dennis, 1996), el cual es el resultado de una serie de eventos en el periodo de floración como la transferencia del polen viable y compatible a la superficie estigmática receptiva (polinización), la emisión y crecimiento del tubo polínico a través del pistilo hasta llegar a realizar la fecundación del óvulo (Childers, 1982).

El manzano florece abundantemente, sus flores son hermafroditas pero con la tendencia a la autoincompatibilidad, de todas formas, incluso para las variedades parcialmente auto fértiles, la actividad de las abejas resulta esencial si se requiere obtener una buena cosecha. Por ejemplo, la variedad Golden puede producir frutos por autofecundación e incluso por partenocarpia (menos del 1%), pero en general debe considerarse como auto compatible (Rallo, 1986).

Normalmente el número de semillas de una manzana auto polinizada no suele superar las dos o tres semillas, mientras que por polinización cruzada alcanza las ocho o nueve, con todas las ventajas que ello implica sobre la calidad del fruto (Rallo, 1986).

El período de floración en el manzano es susceptible a diversos factores que afectan el período crítico de la polinización, como daños por heladas a principios de primavera, horas frío insuficientes, heladas tardías, granizadas, polinización inadecuada, altas temperaturas que causan deshidratación de la superficie estigmática provocando el aborto de las flores y problemas nutricionales como niveles bajos de boro que ocasionan que el tubo polínico y el óvulo no se desarrollen adecuadamente, repercutiendo en un bajo amarre de fruto. De modo que si no hay polinización y posterior fecundación de los óvulos, la flor o el fruto pequeño abortan y caen (Razeto, 1999).

Por el contrario, si la polinización es compatible y las condiciones son propicias, el grano de polen queda adherido al estigma y comienza a absorber agua y nutrientes de la superficie estigmática, se observa la hidratación del grano de polen con la ruptura de la exina e intina. Posteriormente se presenta la germinación del grano de polen la cual es acompañada por cambios rápidos y dramáticos, como es la síntesis de almidón y cambios en la escala de respiración. (Shivanna, 1982; Esau, 1987; Fosket, 1994).

El crecimiento del grano de polen implica la formación del tubo polínico (Fosket, 1994), mientras que el ovario incrementa la velocidad de su desarrollo y a su vez estimula el crecimiento del tubo polínico (Mulcahy y Mulcahy, 1986), finalmente al llegar a una célula sinérgida, el tubo polínico detiene su crecimiento, se rompe y libera a los gametos masculinos (Esau, 1987; Fosket, 1994). Una de las células espermáticas fecunda a la célula central, ocurriendo dos fecundaciones (Kapil y Bhatnagar, 1975).

Si la fecundación tiene éxito, se inicia el desarrollo del fruto, en caso contrario la flor se seca, se torna necrótica y cae (Moncur, 1988).

Para que el proceso de polinización sea efectivo, es necesario que el estigma sea receptivo cuando el polen viable llegue a este, para culminar la formación de semillas en un fruto. (Mac Daniels y Hildebrans, 1940).

### **Clasificación y descripción botánica**

El manzano pertenece a la familia de las Rosáceas, subfamilia Pomoideas, y al género *Malus*. Este género comprende principalmente 25 especies de pequeños árboles y arbustos caducifolios, nativos de las zonas templadas del Hemisferio Norte. Las variedades de manzanos cultivadas para la comercialización pertenecen a la especie (*Malus x domestica* Borkh). Las variedades de manzano aparecen en dos grupos cromosómicos: diploides ( $2n=34$  cromosomas) y triploides ( $3n=54$  cromosomas) (Westwood, 1982); sin embargo, debido a las modificaciones que el hombre ha realizado a través del tiempo no se sabe con exactitud el número de especies que lo componen debido a la gran cantidad de híbridos naturales y variedades obtenidas por el hombre mediante la selección a lo largo de miles de años. A modo de ejemplo, el manzano de cultivo o jardín (*Malus pumila* Mill=*Malus domestica* Borkh=*Pyrus malus* L.) posee más de mil variedades. (Ramírez y Cepeda, 2001).

### **Descripción taxonómica**

Escobar (1981) considera que el manzano es un árbol caducifolio, su porte es erguido y extendido, tendiendo a inclinarse con el paso de los años. La corteza



del tronco es agrietada, de color marrón grisáceo y con numerosas lenticelas que se vuelven de color rojizo en la madera vieja.

Nombre Común: Manzano

Nombre Científico: *Malus communis* (Linnaeus)

Familia: Rosaceae

Sinónimos: *Malus domestica* (Baumg); *Pyrus malus* (Linnaeus); *Malus pumila* (Mill); *Malus acerba* (Merat.); *Malus communis* (D.C.); *Malus domestica* (Borkh).

### **La reproducción**

La reproducción tiene por objetivo la procreación de nuevos individuos a partir de los existentes. Es un fenómeno por el cual los seres vivos producen a expensas de su propio cuerpo una célula o un grupo de células que mediante un proceso de desarrollo se transformarán en un nuevo organismo semejante al de origen. En los seres vivos se dan formas muy diversas de reproducción. No obstante, se pueden agrupar en dos modalidades diferentes:

Reproducción asexual

Reproducción sexual

En la reproducción asexual no existe ni fecundación ni gametos. Se lleva a cabo a partir de células somáticas ya que del organismo progenitor se separan determinadas partes de su cuerpo, puede ser también una sola célula, que están destinadas a formar un nuevo individuo completo. La reproducción asexual fue, probablemente, el primer mecanismo de reproducción que tuvieron los seres vivos, pues no requiere procesos tan complejos como los que se necesitan en la reproducción sexual. La reproducción asexual se presenta principalmente en los organismos vegetales y en los unicelulares, mientras que en los animales se da, sobre todo, en los menos evolucionados.

La reproducción sexual se caracteriza por la producción de células especializadas haploides: las células sexuales o gametos. Normalmente estas células no pueden desarrollarse por sí mismas y dar un nuevo individuo, necesitan unirse para formar una célula mixta de núcleo diploide, el cigoto o célula huevo. El proceso de fusión de ambos gametos para formar el cigoto recibe el nombre de fecundación.

La reproducción sexual es la forma más extendida e importante de reproducción. Prácticamente todos los seres vivos, incluso los organismos unicelulares, tienen reproducción sexual. La reproducción sexual está íntimamente relacionada con la evolución de los organismos. (Mertens y Stevenson 1978).

### **Floración**

Las plantas con flor reciben el nombre de fanerógamas. La producción de flores y frutos de (*Malus communis* Linnaeus) generalmente pueden verse desde finales de marzo hasta primeros de mayo, dependiendo de las variedades (Coutanceau, 1971).

### **Organogénesis floral**

Luckwiil (1974), propone que el principal prerequisite para la iniciación de yemas florales en manzano es la formación de un número crítico de nudos, el cual debe alcanzarse en un período relativamente breve, posteriormente a la brotación de primavera. Luckwiil y Silva (1979) reportan que en la variedad Golden Delicious la tasa de producción de nudos es similar en todas las yemas hasta las 10 semanas post-antesis. A partir de ese momento, la producción

desciende y se detiene en 16 nudos en las yemas que se mantienen vegetativas, mientras que aumenta hasta 21 nudos en las reproductivas.

En el mismo sentido, McLaughlin y Greene (1991a) estudiaron el desarrollo morfológico de las yemas de manzano y reportan que el crecimiento en extensión de los brotes debe cesar antes de iniciarse las yemas de flor. Nueve primordios de hojas forman las nueve escamas basales que cubren la yema, le siguen tres hojas de transición, seis hojas verdaderas, tres brácteas y se forma la yema terminal.

Adicionalmente se forman flores laterales en las axilas de tres brácteas y tres hojas verdaderas distales. El brote debe formar en conjunto 16 a 20 nudos en el ápice de la yema antes de que una flor pueda ser formada, por lo tanto, para determinar la sincronización exacta de la iniciación de la flor, debe estimarse la duración del plastocron (Monselise y Goldshmidt, 1982; McLaughlin y Greene, 1991a). El número de nudos crítico y el patrón de su formación varía con el cultivar (Hoover *et al.*, 2004).

El período crítico parece estar después de la iniciación de la hoja verdadera y antes de la iniciación de la primera bráctea. Durante ese período, se produce la transición al estado reproductivo.

En manzanos (*Malus domestica* Borkh.), la formación de yemas florales coincide temporalmente con la formación de brotes y con la etapa de división celular de los frutos. Esto implica que la fructificación influya sobre el metabolismo de las yemas jóvenes, llegando incluso a inhibir la floración de la próxima temporada (Forshey y Elfving, 1989).

## **Inducción Floral en Manzano**

El cambio fisiológico que se produce en las primeras semanas después de la floración y condiciona la evolución de una yema vegetativa a floral se denomina inducción floral (Buban y Faust, 1982; Faust, 1989). Se produce al final del período de crecimiento primaveral, en el período junio, julio y agosto en nuestros climas. (Rom, 1985).

La iniciación foliar es el primer cambio morfológico, es el ensanchamiento en el ápice de la yema debido al crecimiento de los primordios florales, que son los sépalos, pétalos. Tras un corto período, este cambio fisiológico es seguido por otro morfológico, que conduce a la aparición de primordios florales, recibiendo el nombre de diferenciación floral (Gil-Albert, 1991).

En manzanos (*Malus domestica* Borkh.), la formación de flores coincide temporalmente con la formación de brotes y frutos. Esto implica que la fructificación influya sobre el metabolismo de las yemas jóvenes, llegando incluso a inhibir la floración de la próxima temporada (Li *et al.*, 1995).

### **Fases de la inducción floral**

La inducción floral consta de dos fases fundamentales: una reversible, durante la cual la interrupción de los factores inductores anula la programación reproductiva de las yemas y otra irreversible, en la cual la evolución endógena no podría ser alterada, aunque eventualmente, sucesivos cambios de los mecanismos fisiológicos que controlan el proceso podrían modificarla, sobre todo en lo referido a la expresión de la sexualidad (Faust, 1989; Pessarakli, 2001).

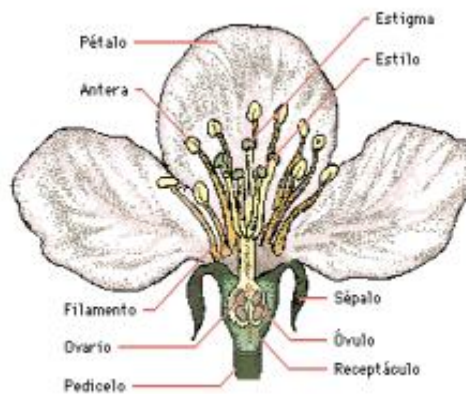
La inducción se hace irreversible unas cuatro a cinco semanas antes de iniciarse el cambio morfológico o diferenciación floral. El primer síntoma corresponde a un aplanamiento del ápice meristemático, al cual le sigue una fase caracterizada por la aparición de los primordios de sépalos, período en el cual el ápice adquiere una característica cóncava. Las etapas posteriores del proceso morfogénico consisten en la diferenciación de los últimos primordios de pétalo, estambre y, por último, del carpelo (Buban y Faust, 1982; Bernier *et al.*, 1981; Faust, 1989).

### **Antesis (Apertura floral)**

En la primavera del año siguiente, cuando la temperatura aumenta, el crecimiento y el desarrollo de las flores finaliza. Las flores abren cerca de un año después de que la inducción floral ocurrió. (Rom, 1985).

### **Morfología y anatomía de la flor de manzano**

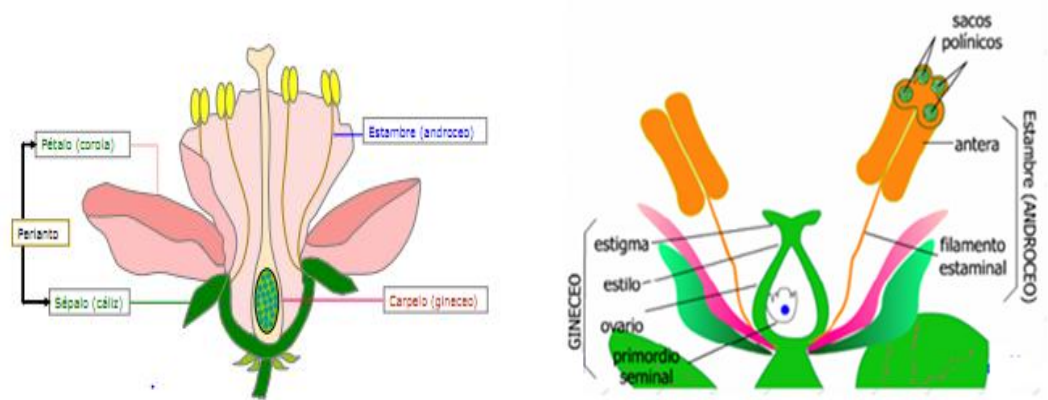
La flor se define como el aparato reproductor de las fanerógamas. Una flor es un tallo de crecimiento determinado que tiene hojas especialmente adaptadas para la reproducción. Estas hojas florales no están distribuidas a intervalos a lo largo del tallo si no que se encuentran agrupadas y carecen de yemas axilares y dan origen al polen y otras a los óvulos. (Rallo, 1986).



**Figura 1.** Flor del manzano. (Coutanceau, 1971)

La flor consta de un pedicelo, un cáliz persistente con cinco sépalos velludos y blanquecinos, que componen la base del fruto, una corola caduca de cinco pétalos blancos en el interior y rosados por fuera, y 15 - 20 estambres compuestos por filamentos amarillos que están coronados por una antera; el gineceo está compuesto por cinco estilos que están soldados en su base. El ovario que es ínfero, posee cinco lóculos, cada uno de los cuales alberga uno o dos óvulos, por lo que el fruto puede tener hasta diez semillas (Figura 1).

La inflorescencia es un corimbo que tiene entre ocho y once flores, hermafroditas, en el que las centrales se abren antes, siendo a priori, consideradas de mejor calidad (Coutanceau, 1971).



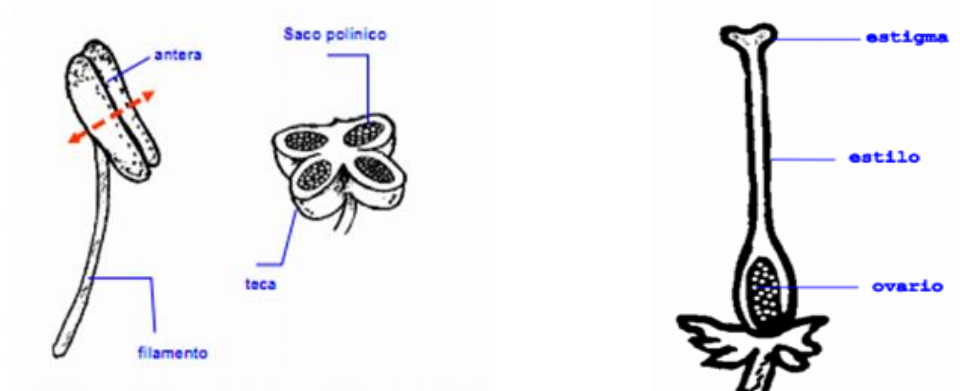
**Figura 2.** Morfología de una flor **Figura 3.** Ciclo de vida de una hermafrodita (Sánchez, 2005). angiosperma. (Sánchez, 2005).

En esencia, la flor es un tallo sobre el que se disponen una serie de órganos que tienen diferentes aspectos según la función que realizan. Todos estos órganos se encuentran situados sobre un ensanchamiento del pedúnculo floral llamado receptáculo. En una flor hermafrodita típica vamos a encontrar las siguientes partes: empezando con los verticilos florales formados por cáliz y corola. La primera envoltura o verticilo recibe el nombre de cáliz y está constituida por hojitas de color verde que se le denominan sépalos y la segunda envoltura o verticilo se le denomina corola formada por hojas de colores vistosos llamados pétalos.

Cáliz y corola forman el perianto y son piezas estériles que envuelven a los órganos sexuales: los estambres y los carpelos (Figura 2). Al conjunto de los estambres se denomina: el androceo. (Sánchez Guillen, 2005).

El androceo es el aparato reproductor masculino (Figura 3). Cada estambre consta, a su vez, de un filamento por el que está unido al resto de la flor y de una antera. Cada antera está formada por dos tecas repletas de granos de polen (Figura 4).

Los carpelos forman el gineceo o aparato sexual femenino de la planta. En un carpelo distinguiremos tres partes: Ovario, estilo, estigma (Figura 5). En el interior del ovario se encuentran los rudimentos seminales que contienen el gameto femenino u óvulo (Rallo, 1986).

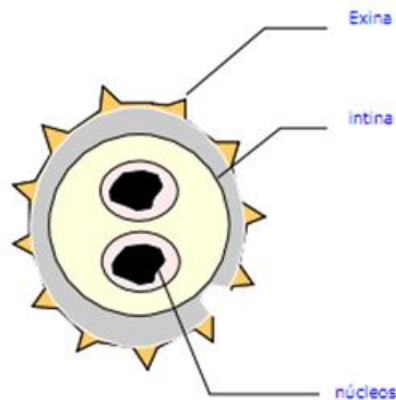


**Figura 4.** Partes de un estambre y corte de una antera (Sánchez, 2005). **Figura 5.** Partes de un carpelo (Sánchez, 2005).

### Formación del grano de polen (Microsporogenesis)

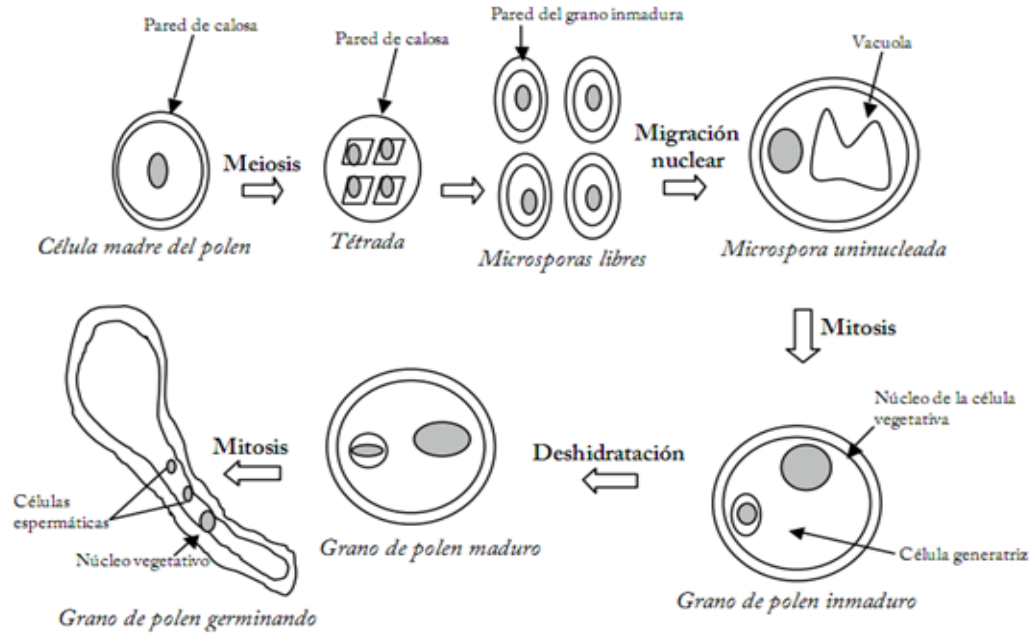
El desarrollo de los granos de polen es un proceso complejo que requiere de la interacción coordinada entre el esporofito y el gametofito en desarrollo (Chaubal *et al.*, 2000). En el inicio de la formación de los granos de polen, estos comienzan siendo células esporógenas ubicadas en las tecas, que se dividen por meiosis dando lugar a tétradas de células haploides para ello se rodea de dos verticilos; uno más interno y delgado, la intina, y otro muy grueso, la exina, Figura 6, (Sánchez, 2005).





**Figura 6.** Grano de polen. (Rallo, 1986).

Las células de las tétradas que antes estaban unidas se separan y se les conoce como microsporas libres. Posteriormente, las microsporas uninucleadas se dividen asimétricamente por mitosis, dando como resultado granos de polen con dos células: una célula grande llamada vegetativa y una pequeña célula generatriz. Es en esta condición bicelular como se liberan los granos de polen de las anteras maduras en aproximadamente el 70% de las angiospermas McCormick (1993). Es importante mencionar que el destino de estas dos células es muy distinto. La célula vegetativa ya no volverá a dividirse y su papel será proporcionar el material necesario para que el tubo polínico pueda crecer. Mientras que la célula generatriz volverá a dividirse para dar lugar a dos células espermáticas, una de las cuales será la encargada de fusionarse con la célula huevo del óvulo y la otra célula se fusionará con uno de los núcleos polares del óvulo y formará el endospermo (Figura 7).



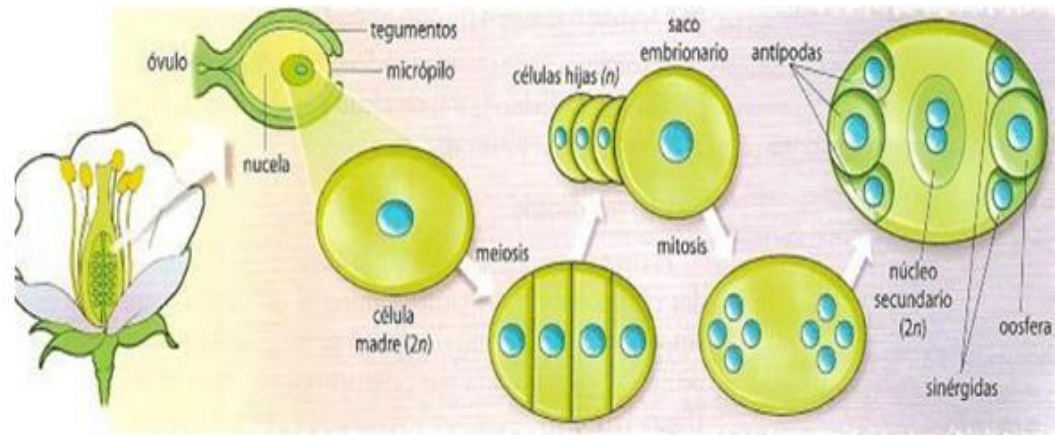
**Figura 7.** Representación esquemática de una microsporogénesis típica de angiospermas (Modificado de McCormick, 1993).

Una vez que el grano de polen ha sido liberado de la antera y llega a un estigma receptivo, el tubo polínico inicia su crecimiento a través del estilo. Es en este momento cuando la célula generatriz se divide por segunda vez.

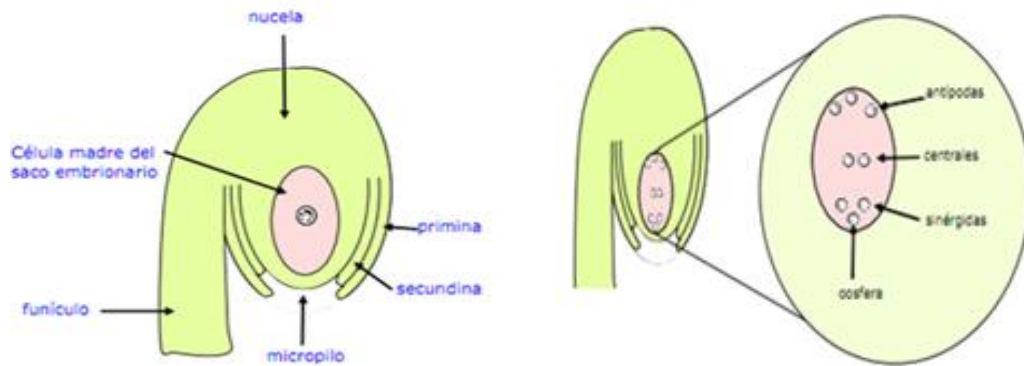
### **Formación del saco embrionario (Megaesporogénesis).**

En los carpelos, en el interior de los ovarios, se encuentran los rudimentos seminales u óvulos. Cada uno está unido al ovario por el funículo y protegido por dos cubiertas celulares: una más externa, la primina, y otra más interna, la secundina. Ambas lo rodean dejando un orificio: el micrópilo (Figura 9). Más al interior encontramos una masa de células: la nucela es la célula madre del saco embrionario, se desarrolla considerablemente y por meiosis da cuatro células con  $n$  cromosomas. Generalmente, tres de ellas degeneran y la que perdura se divide

varias veces (tres, normalmente) formando el saco embrionario (Figura 10). Cada saco embrionario contiene ocho células ( $n$ ). Las tres superiores son las sinérgidas, una de las sinérgidas, la central, es el gameto femenino u oosfera; otras dos son las centrales, y en la parte opuesta a las sinérgidas, se encuentran las antípodas. Las dos sinérgidas y las tres antípodas no tienen ninguna función y después de la fecundación desaparecen (Figura 8), (Rallo, 1986).



**Figura 8.** Representación esquemática típica de una megasporogénesis. (Cuevas, 2009).



**Figura 9.** Rudimento seminal óvulo **Figura 10.** Saco embrionario, Sánchez, (Sánchez, 2005) (Sánchez, 2005).

## El polen

Los granos de polen son las células vegetales de estructura simple o haploide y la formación del tubo polínico es un buen modelo simple de crecimiento y desarrollo (Taylor - Hepler 1997).

La primera condición en la formación de la semilla y el fruto es el desarrollo saludable de los órganos masculino y femenino de la flor, excepto para el caso de algunos cultivares con aparente partenocarpia. El desarrollo del polen incluye su formación en la flor, la homogeneidad morfológica, germinación y desarrollo del tubo polínico, todos ellos son factores importantes sucedidos por la fertilización en el árbol frutal (Thompson 2004; Janick, Moore 1996; Hedly *et. al.*, 2004).

Aunque los factores ambientales y las características genéticas son importantes, en el caso de cultivo de árboles frutales, una abundante cosecha de frutas depende de una conclusión exitosa de una secuencia de eventos reproductivos. Una falla o deficiencia de cualquier aspecto dentro de este proceso puede resultar en una reducción de los rendimientos o la pérdida total de la cosecha.

El primer requisito es la disponibilidad de una fuente adecuada de polen viable y compatible. En segundo lugar, debe haber una transferencia efectiva de polen cuando los estigmas están receptivos. En tercer lugar, los tubos polínicos debe crecer hacia abajo del estilo y entrar en el óvulo cuando han madurado los sacos embrionarios. Y por último, deben producirse la doble fecundación y posterior crecimiento del embrión y el endospermo para proporcionar el estímulo necesario para el desarrollo de frutos (Thompson 2004).

## **Recolección y manejo de polen**

La mayoría de las especies poseen un periodo de floración muy corto. Si el frío invernal es continuo y este es seguido por un periodo invernal cálido, la floración suele ocurrir en pocos días, de lo contrario, dicho periodo puede extenderse por varias semanas (fenómeno muy común en las zonas altas subtropicales).

Normalmente se recomienda tener un suministro adecuado de polen antes de que se inicie la floración en el campo. Pues su recolección suele tomar bastante tiempo y limitar considerablemente el número total de cruces a realizar. Afortunadamente el polen de la gran mayoría de las especies de origen templado es muy longevo y puede comprarse e intercambiarse a un por carta, sin pérdida considerable de su viabilidad (Robles, 1985).

Si el polen se recolectó previamente, el periodo de floración podrá dedicarse a realizar las hibridaciones programadas. En general, el procedimiento empleado para la recolección de polen es el siguiente:

Recolección de brotes sanos y con abundantes yemas florales, unas dos o tres semanas antes del periodo normal de su floración.

Colocarlos en recipientes con sus bases sumergidas en agua (el corte basal deberá ser de 45 °C para permitir una mejor absorción de agua) y dejarlos en un cuarto, con temperaturas próximas a los 22 °C y sin exponerlas directamente al sol.

Cada 2 o 3 días, dependiendo de la especie, deberán cortarse nuevamente las bases de los ramos y cambiarles el agua.

Normalmente se requiere un máximo de 10 a 14 días para que las yemas florales inicien su apertura y puedan recolectarse las anteras. En las especies de menor porte, el control de la floración puede facilitarse plantándolas en macetas o colectando plantas completas durante el reposo y forzándolas a florecer en el invernadero o en una cámara de crecimiento.

Las anteras pueden recolectarse un poco antes de la antesis y depositándose en un cuarto, con poca humedad y a temperaturas cercanas a los 22 °C en estas circunstancias las anteras liberan el polen después de 24 o 36 horas.

Las anteras abiertas con todo y polen se pueden vaciar en pequeños tubos de plástico (que cierren herméticamente para evitar la entrada de humedad) y colocarse en un desecador con CaSO<sub>4</sub> en el refrigerador a 5 °C para poder conservar el polen durante 7 a 9 semanas (EL CaSO<sub>4</sub> cambia de azul a rosa al hidratarse deberá ser remplazado). El polen extra para usar durante el siguiente ciclo podrá guardarse a -18 o -20 °C sin pérdida notable de su viabilidad.

Es recomendable realizar pruebas de viabilidad para asegurarse de la efectividad de la polinización. Dichas pruebas pueden ser *in vitro* utilizando la tinción con tetrazolium o por medio de la germinación en un medio nutritivo gelificado. (Allen *et al.*, 1973).

### **Pruebas de laboratorio en polen**

### **Viabilidad y germinación del polen**

La viabilidad del polen puede ser evaluada por diferentes métodos como la tinción con colorantes nucleares y no vitales o en las pruebas de germinación *in*

*vitro* (Parfitt-Ganeshan, 1989; Heslop-Harrison *et al.*, 1984; Koyuncu *et al.*, 2000; Voyiatsiz, Paraskevopoulou-Paroussi, 2002). El objetivo de las técnicas de tinción es determinar la actividad enzimática de polen, integridad de la membrana y colorabilidad del núcleo (Norton 1966; Vizintín-Bohoney, 2004). Las pruebas de viabilidad son, más rápidas y fáciles que las pruebas de germinación de polen, pero, en algunos casos, diferentes resultados pueden obtenerse en muchas especies frutales o cultivos.

La viabilidad del polen se traduce como el poder germinativo que éste tenga, es decir, el número de granos de polen que germinen de un total dado. La viabilidad del polen está dada por varios factores como son: la variedad, su estado de madurez, la forma de recolección, almacenamiento y transporte, entre otros (Guerrero, 2005).

La viabilidad, homogeneidad morfológica y el crecimiento del tubo polínico son las propiedades más importantes en la fertilización del manzano; sin embargo, un método fácil para determinar la viabilidad del polen es necesario para aumentar la eficiencia del programa de cría y selección de polinizadores adecuados cuando se establece un huerto (Tehrani-Lay, 1991; Brown *et al.*, 1996).

La viabilidad del polen puede evaluarse por diferentes métodos como la tinción con colorantes nucleares no vitales o pruebas de germinación *in vitro* (Parfitt-Ganeshan 1989; Heslop-Harrison *et al.*, 1984; Voyiatsiz-Paraskevopoulou-Paroussi, 2002).

Las pruebas de tinción son más rápidas y más fáciles que las pruebas de germinación del polen, pero en algunos casos, pueden obtenerse resultados diferentes con ellos en muchas especies frutales o cultivares; por lo tanto, para determinar la calidad del polen viable, son necesarias pruebas de germinación. La técnica de agar en caja petri es una prueba que generalmente se utiliza para determinar la tasa de germinación del polen *in vitro* (Vizintin - Bohoney, 2004).

Las pruebas de germinación son necesarias por lo tanto para determinar la cantidad real de polen viable. La técnica de agar en caja petri es una prueba que generalmente se utiliza para determinar la tasa de germinación del polen in vitro (Koyuncu *et al.*, 2000; Vizintín-Bohónc, 2004).

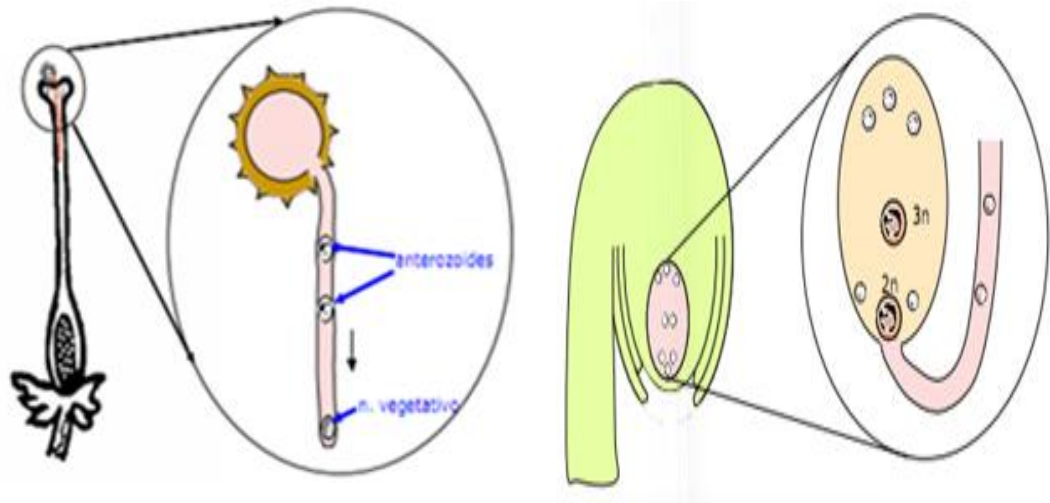
La germinación del polen y el crecimiento de los tubos polínicos son materiales de investigación importante para estudios biológicos morfológicos, fisiológicos, biotecnológicos, ecológicos, evolutivos, bioquímicos y moleculares (Ottavio 1992; Dane *et al.*, 2004).

### **Fecundación en las plantas con flor**

Una vez que el grano de polen ha llegado al estigma de la flor ésta produce sustancias que van a provocar la formación por parte del grano de polen de un largo tubo: el tubo polínico. Éste penetra por el estigma y se dirige hacia el micrópilo. Por el interior del tubo polínico se trasladan el núcleo vegetativo y el núcleo generativo. Este último, según va descendiendo al encuentro de la oosfera, se divide por mitosis en dos núcleos; se forman así los dos anterozoides o gametos masculinos (Figura 11).

Una vez que el tubo polínico ha contactado con uno de los sacos embrionarios presentes en el ovario, el núcleo vegetativo desaparece y ambos anterozoides pasan al interior del saco embrionario. Uno de los anterozoides se fusiona con la oosfera y formará un núcleo  $2n$  que dará lugar al embrión; el otro se une con los dos núcleos centrales del saco embrionario formando un núcleo  $3n$  que dará lugar al tejido nutritivo de la semilla llamado: albumen o endospermo. Vemos que en el interior del saco embrionario se produce una doble fecundación (Figura 12).





**Figura 11.** Formación del tubo polínico, **Figura 12.** Fecundación, (Sánchez, 2005).

### Receptividad estigmática

La receptividad estigmática es un parámetro floral que determina el tiempo en que los estigmas mantienen la capacidad de generar un ambiente propicio para la germinación de los granos de polen, afectando directamente al éxito reproductivo y repercutiendo en la cosecha, cuando se trata de especies cultivadas, sin embargo, se desconocen los factores que la determinan.

El periodo en que los estigmas son receptivos a los granos de polen influye directamente en el amarre de frutos (Gonzales y Herrero, 1994), en el manzano los estigmas se consideran receptivos en el estado fenológico “botón rosa”, manteniéndose la receptividad hasta tres días después de la apertura floral. (Rallo, 1986) al igual que en otras especies como es la receptividad de los estigmas del

guanábano se puede apreciar por la presencia de un exudado brillante y viscoso en la superficie estigmática (Escobar *et al.*, 1986).

Este exudado (néctar) contiene una mezcla de lípidos, carbohidratos, compuestos fenólicos y enzimas (Heslop-Harrison y Shivanna, 1977; Ryugo, 1988), los cuales en su conjunto son responsables de la retención, hidratación y germinación del grano de polen (Sedgley y Scholefield, 1980).

Cornell (1981) y Nakasone - Paull (1977) mencionaron que la presencia de lluvias y la alta humedad durante los días de floración favorecen la producción de frutos, previniendo la deshidratación de los estigmas, prolongando su periodo de receptividad e incrementando el amarre de frutos y el crecimiento inicial del mismo.

Las abejas recolectan gustosamente el néctar de las flores de manzano cuando su contenido alcanza los 0.5 mililitros de azúcar. Al aumentar la humedad relativa del aire se incrementa también la cantidad de néctar secretado disminuyendo a su vez la concentración de azúcar.

Las reservas más considerables de néctar se localizan en las flores de los manzanos jóvenes y en los adultos con crecimiento vegetativos medios comprendidos entre 30 y 50 cm anuales. Una flor de manzano puede secretar de 5 a 7 ml de néctar por día pudiendo superar concentraciones de azúcar del 50%. A medida que se incrementa la secreción del néctar se multiplica también el número de insectos polinizadores (Rallo, 1986).

## **Polinización**

La polinización es un proceso natural muy importante dentro de la cadena de eventos para lograr una buena producción de frutos de manzana. La polinización es el transporte de los granos de polen de la antera al estigma de la flor o de otra flor de la misma especie. Una vez depositado en el estigma, el polen debe de germinar para lo cual debe tener una viabilidad adecuada y formar el tubo polínico para llegar a fecundar a los óvulos.

La fertilización exitosa de manzano depende de la transferencia de polen compatible por las abejas, ya que los cultivares más comerciales son auto incompatibles (Janick - Moore 1996; Thompson, 2004).

La polinización se define como la transferencia de granos de polen, situado en los microesporangios de las anteras, a la superficie receptiva del carpelo (estigma) (Kapil y Bhatnagar, 1975). Para que el proceso de polinización sea efectivo, es necesario que el estigma sea receptivo cuando el polen viable llegue a este, para culminar la formación de semillas en un fruto. (Mac Daniels y Hildebrans, 1940). De modo que si no hay polinización y posterior fecundación de los óvulos, la flor o el fruto pequeño abortan y caen (Razeto, 1999).

### **Periodo efectivo de polinización de manzano**

Williams (1965) definió al periodo efectivo de polinización como el tiempo durante el cual una polinización influye en un aumento del amarre de frutos y está determinado por el periodo en que los óvulos permanecen viables, menos el periodo durante el cual los granos de polen pueden ser depositados en los estigmas. Sedgley y Griffin (1989) agregaron que el periodo de receptividad de los

estigmas también es un factor limitante para alcanzar una buena polinización y una posterior fecundación.

Gazit *et al.*, (1969) indicaron que un grave problema para la producción de frutos en las anonáceas es la falta de una buena polinización. Mosca *et al.*, (1997b) consideraron que existen factores ambientales que limitan la polinización en estas especies, la lluvia obstruye el transporte de los granos de polen, y bajas temperaturas disminuyen la actividad de los insectos polinizadores.

Nakasone y Paull (1997) indicaron que temperaturas superiores a 30 °C y porcentajes de humedad relativa ambiental menores al 30% contribuyen a una pobre polinización, incluso empleado la técnica de polinización manual, y que temperaturas cercanas a 25 °C y una humedad relativa próxima al 80% favorecen una alta polinización. Mientras que Higuchi *et al.*, (1998). Afirmaron que en chirimoya, el problema de la visibilidad del grano de polen es más significativo que la falta de receptividad de los estigmas.

### **Tubo polínico y fecundación**

Si la polinización es compatible y las condiciones son propicias, el grano de polen queda adherido al estigma comienza a absorber agua y nutrimentos de la superficie estigmática, se observa la hidratación del grano de polen con la ruptura de la exina e intina. Posteriormente se presenta la germinación del grano de polen la cual es acompañada por cambios rápidos y dramáticos, como es la síntesis de almidón y cambios en la escala de respiración. (Shivanna, 1982; Esau, 1987; Fosket, 1994).

El crecimiento del grano de polen implica la formación del tubo polínico (Fosket, 1994); y es posible que influenciado por la polinización, e incluso el tipo

de la misma, el ovario incrementa la velocidad de su desarrollo y a su vez estimula el crecimiento del tubo polínico (Mulcahy y Mulcahy, 1986).

El estilo de la mayoría de los frutales es de tejido sólido (Pimienta, 1987), por lo tanto, el tubo polínico crece entre las paredes de las papilas estigmáticas, atravesando el estigma, para entrar al tejido conductor dentro del estilo. Lleva consigo a las células espermáticas hacia el saco embrionario; la dirección que sigue el tubo polínico está influenciada por moléculas que se encuentran en su superficie (Fosket, 1994). Al llegar a la cavidad del ovario, se ponen en contacto con el ovulo, penetrándolo por el micrópilo para llegar al saco embrionario.

Finalmente al llegar a una célula sinérgida, el tubo polínico detiene su crecimiento, se rompe y libera a los gametos masculinos (Esau, 1987; Fosket, 1994). Una de las células espermáticas fecunda a la célula central, ocurriendo dos fecundaciones (Kapil y Bhatnagar, 1975). Si la fecundación tiene éxito, se inicia el desarrollo del fruto, en caso contrario la flor se seca, se torna necrótica y cae (Moncur, 1988). En *Anona muricata* L, se ha observado que después del desprendimiento de los estambres del receptáculo floral y si han ocurrido los fenómenos de polinización y fecundación, la flor entra a una fase de reposo o quiescencia, caracterizada por el oscurecimiento de la zona de abscisión floral (Worrell *et al.*, 1994).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Área de estudio**

El experimento se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, localizado en Bulevar Antonio Narro 1923. Buenavista. Saltillo Coahuila, código postal 25315, México. Ubicada geográficamente en los 25° 21' 03.23'' Latitud Norte y en 101° 1' 39.69'' Longitud Oeste, con 1791 msnm.

Para el establecimiento del experimento se utilizó equipo y material de laboratorio, además de material vegetativo.

### **Material de laboratorio utilizado:**

1. Porta objetos y cubre objetos
2. Asa
3. Mecheros
4. Porta objetos
5. Cubre objetos
6. Cajas Petri de vidrio y de plástico
7. Cubre bocas
8. Termómetro
9. Pinceles

10. Libreta
11. Marcador y lapicero
12. Algodón
13. Cinta masking
14. Matraz de 500 ml
15. Tela Tul
16. Papel estraza
17. Vaso de cristal
18. Cinta Parafilm

#### **Reactivos utilizados: (Tinciones)**

1. Acetocarmín 1% (Sigma C-1022)
2. Naphtol Blue Black (Búfalo Black) 0.1%
3. Safranina 1%

#### **Equipo de laboratorio utilizado**

1. Cámara de siembra
2. Microscopio electrónico con cámara digital integrada
3. Láp top
4. Refrigerador
5. Autoclave
6. Balanza analítica
7. Potenciómetro
8. Termo agitadores
9. Medidor de pH
10. Horno de microondas

## Material vegetativo

El material vegetativo utilizado para el estudio consistió en polen de quince variedades polinizadoras de Manzano, obtenidos de las localidades de San Antonio de las Alazanas, Huachichil y Los Lirios, pertenecientes a la Sierra de Arteaga, Coahuila.

**Cuadro 1.** Material vegetativo utilizado.

---

Variedades polinizadoras de Manzano	
Gale Gala	John Dawnee
Corail	Top Red
Pacific Gala	Selección III
Buckeye Gala	Cameo
Golden Verde	Golden Tunal
Golden Vigas	Selección II
Imperial Gala	Manchurian

---

## Colecta de botones florales en campo

Se realizó la colecta de botones florales de las diferentes variedades de Manzano en estado de globo en los meses de Marzo y Abril de los ciclos agrícolas 2009-2010, 2010-2011 a campo abierto en la temporada de floración. El trabajo de recolección se realizó de acuerdo a la metodología utilizada por Sharafi (2011),



omitiendo el paso de almacenamiento a 0 °C debido a que la obtención de polen no era para almacenamiento a largo plazo. Estas se depositaron en vasos desechables que posteriormente fueron llevados a un laboratorio para realizar la extracción de las anteras.

### **Obtención del polen en el laboratorio**

Se realizó la separación de las anteras a través de la malla de tela Tul sobre la boca de un frasco y se depositaron en un papel estraza para secarlas por un tiempo de 48 horas a temperatura ambiente (18 a 21 °C), siguiendo la metodología descrita por Robles (1986). Después del tiempo de secado, se colocaron las anteras dentro de un recipiente de plástico obscuro y se agitaron para separar el polen, posteriormente, se cribó en un tamiz de 100 mallas, se identificó y cerrando herméticamente el recipiente se colocó en refrigeración.

### **Viabilidad de polen de variedades polinizadoras de manzano**

#### **Preparación de las soluciones de Tinción con Acetocarmín, Naphtol Blue Black (Búfalo Black) y Safranina**

##### **Solución de Acetocarmín (Carmín acético)**

En un matraz Erlenmeyer se disolvieron 45 ml de ácido acético al 100% y 55 ml de agua destilada y se mantuvieron en ebullición durante 4 minutos, luego se añadieron 100 ml de Acetocarmín (1%) (Sigma C-1022) y se continuó con la ebullición durante 1 minuto y al final se filtró.

### **Solución de Búfalo Black 0-01% (Naphthol Blue Black)**

En un matraz Erlenmeyer se disolvieron 45 ml de ácido acético al 100% y 55 ml de agua destilada y se mantuvieron en ebullición durante 4 minutos, luego se añadieron 100 ml de Búfalo Black (Naphthol Blue Black) (0.01%) y se continuó con la ebullición durante 1 minuto y finalmente se filtró.

### **Solución de Safranina**

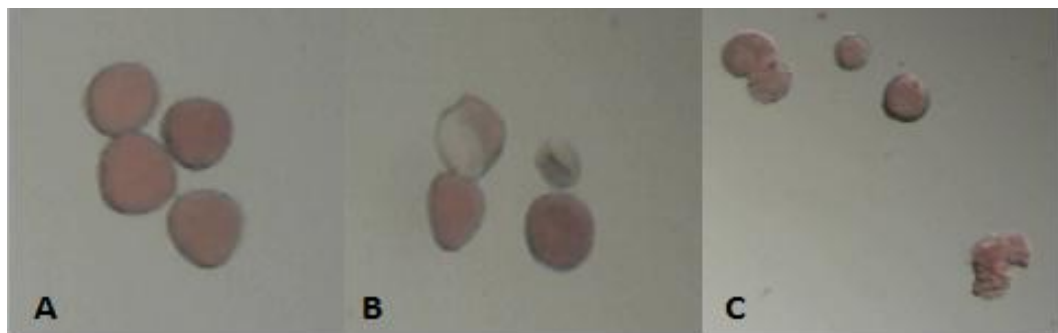
En un matraz Erlenmeyer se disolvieron 45 ml de ácido acético al 100% y 55 ml de agua destilada y se mantuvieron en ebullición durante 4 minutos, luego se añadieron 100 ml de safranina (1%) y se continuó con la ebullición durante 1 minuto y finalmente se filtró.

### **Tinción de polen**

Para observar la viabilidad del polen de las diferentes variedades de manzano se realizó un frotis con polen y se observó en el microscopio, para ello se tomó un pincel y se impregnó con polen para depositarlo sobre un portaobjetos procurando que la distribución fuera de manera uniforme, enseguida se le adicionó una gota de las soluciones (colorantes) de Acetocarmín (1%), Naphthol Blue Black (Búfalo Black (0.1%)) y Safranina (1%) como se muestra en la imagen (Figura 13) y pasados 5-10 segundos se observó al microscopio (40X) y se procedió al conteo del polen que presentó coloración, clasificándolos como viables, no viables y colapsados. Como se muestra en las microfotografías de la Figura 14.



**Figura 13.** Observación del polen en el microscopio digital.



**Figura 14.** Estados del polen: A) Polen viable, B) Polen no viable C) Polen colapsado.

## Análisis estadístico para viabilidad del polen

Para la evaluación de viabilidad del polen de las variedades polinizadoras de manzano en ciclo agrícola 2009-2010 se utilizaron siete variedades polinizadoras de manzano; John Dawnee, Golden Verde, Golden Tunal, Selección II, Golden Vigas, Imperial Gala, y Manchurian, con tres tratamientos de tinción; Acetocarmín, Búfalo Black y Safranina con tres repeticiones.

Para la evaluación de viabilidad del polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011 se utilizaron ocho variedades polinizadoras de manzano; Gale Gala, Corail, Pacific Gala, Buckeye Gala, John Dawnee, Top Red, Selección III y Cameo con tres tratamientos de tinción; Acetocarmín, Búfalo Black y Safranina con cuatro repeticiones.

Los parámetros a medir en ambos ciclos agrícolas fueron; granos de polen Viables, No Viables y Colapsados.

Se utilizó un diseño completamente al azar. Los resultados se analizaron estadísticamente en el software SAS V. 9.0

$$Y_{ijk} = \mu + V_i + T_j + R_k + VT_{ij} + VR_{ik} + TR_{jk} + E_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = Variable observada.

$\mu$  = Efecto de la media general.

$V_i$  = Efecto de la  $i$ -ésima variedad.

$T_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo tratamiento.

$R_k$  = Efecto de la  $k$ -ésima repetición.

$VT_{ij}$  = Interacción de la  $i$ -ésima variedad con el  $j$ -ésimo tratamiento.

VRik = Interacción de la i-ésima variedad con la k-ésima repetición.

TRjk = Interacción del j-ésimo tratamiento con la k-ésima repetición.

Eijk = Error experimental.

## **Germinación del polen de variedades polinizadoras de manzano**

### **Preparación del medio de cultivo para germinación del polen**

Para la germinación del polen se utilizaron diferentes concentraciones de sacarosa como fuente de carbono, para ello se establecieron matraces Erlenmeyer para cada una de las concentraciones de sacarosa (5, 10, 15, 20 y 25 gramos), siguiendo la metodología utilizada por Sharafi (2011), modificándola, pues se eliminó el ácido bórico.

El medio para la germinación del polen se preparó de la siguiente manera:

Disolver la sacarosa contenida en el matraz en 100 ml de agua destilada

Aforar la solución con una probeta a 500 ml

Ajustar el pH a 5.8 con un potenciómetro

Agregar 1g de agar y hervir en una plancha magnética por 5 min.

Vaciar el medio en cajas Petri esterilizadas y sellar con cinta Parafilm

Esterilizar en autoclave a temperatura de 120 °C por 15 minutos (Figura 15).

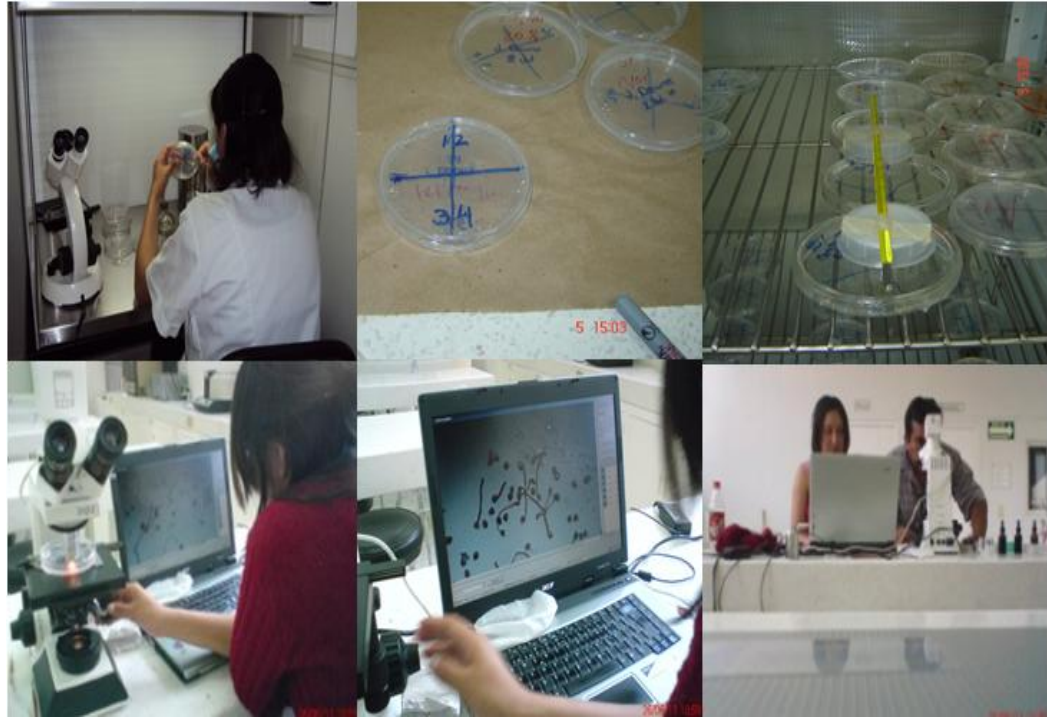


**Figura 15.** Preparación del medio de cultivo para germinación de polen

### **Potencial de germinación del polen**

La siembra del polen de las diferentes variedades de manzano se realizó en una campana de flujo laminar, el polen se impregnó en un pincel y se sacudió sobre el medio contenido en una caja Petri. Las cajas se fraccionaron en cuatro partes, considerando cada fracción como una repetición. La incubación de las cajas se efectuó en la oscuridad a 20 °C, el conteo del polen germinado se realizó en diferentes tiempos (4, 8, y 12 horas), se obtuvo el porcentaje de germinación de las diferentes variedades de polen y se tomó una muestra del polen germinado de cada

repetición y se depositó en un portaobjetos, se le agregó una gota de Acetocarmín y se llevó a observación en el microscopio. Figura 16.



**Figura 16.** Potencial de germinación del polen evaluado en Laboratorio.

### **Análisis estadístico para germinación del polen**

Para la evaluación de germinación del polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2009-2010 se utilizaron cuatro variedades polinizadoras de manzano; John Dawnee, Manchurian, Selección II y Golden Tunal con tres tratamientos de sacarosa; 15%, 20% y 25% con cinco repeticiones.

Para la evaluación de germinación del polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011 se utilizaron ocho

variedades polinizadoras de manzano; Gale Gala, Corail, Pacific Gala, Buckeye Gala, John Dawnee, Top Red, Selección III y Cameo con cinco tratamientos de sacarosa; 5, 10, 15, 20 y 25%, con tres tiempos de observación; cuatro, ocho y doce horas con cinco repeticiones.

Los parámetros a evaluar en ambos ciclos agrícolas fueron; granos de polen Germinados, No Germinados y Colapsados.

Se utilizó un diseño completamente al azar. Los resultados se analizaron estadísticamente en el software SAS V. 9.

$$Y_{ijkl} = \mu + V_i + T_j + O_k + R_l + VT_{ij} + VO_{ik} + VR_{ik} + TO_{jk} + TR_{jl} + E_{ijkl}$$

Donde:

$Y_{ijkl}$  = Variable observada.

$\mu$  = Efecto de la media general.

$V_i$  = Efecto de la  $i$ -ésima variedad.

$T_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo tratamiento.

$O_k$  = Efecto de la  $k$ -ésima observación.

$R_l$  = Efecto de la  $l$ -ésima repetición.

$VT_{ij}$  = Interacción de la  $i$ -ésima variedad con el  $j$ -ésimo tratamiento.

$VO_{ik}$  = Interacción de la  $i$ -ésima variedad con la  $k$ -ésima observación.

$TO_{jk}$  = Interacción del  $j$ -ésimo tratamiento con la  $k$ -ésima observación.

$TR_{jl}$  = Interacción del  $j$ -ésimo tratamiento con la  $l$ -ésima repetición.

$E_{ijkl}$  = Error experimental.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Viabilidad de polen de variedades polinizadoras de manzano

#### Viabilidad del polen de las variedades polinizadoras de manzano para el ciclo agrícola 2009-2010

El análisis de varianza presentó diferencia altamente significativa entre las variedades para las variables viables y no viables, en tanto que para la interacción variedad\*tratamiento (Acetocarmín, Búfalo Black y Safranina) se encontró alta significancia para la variable viables y significancia para las variables no viables y colapsados, para la interacción variedad\*repetición se encontró significancia en las variables viables, no viables y colapsados. Como lo muestra el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Análisis de varianza para la viabilidad de polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2009-2010.

FV	GL	Viables		No viables		Colapsados	
		CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Variedades	6	699.52	<.0001**	433.80	<.0001**	116.22	0.5243
Tratamientos	2	43.08	0.7360	9.87	0.7940	89.75	0.5153
Repeticiones	2	153.49	0.3365	91.85	0.1187	86.47	0.5279
Varied*tratam	12	558.70	<.0001**	104.47	0.0049*	354.60	0.0025*
Varied*repet	12	438.83	0.0003*	106.23	0.0042*	295.36	0.0125*
Trat*repet	4	68.80	0.7430	56.84	0.2594	75.85	0.6907
Error	276	140.37		42.77		135.04	
Total	314						
CV		14.01		117.51		117.15	

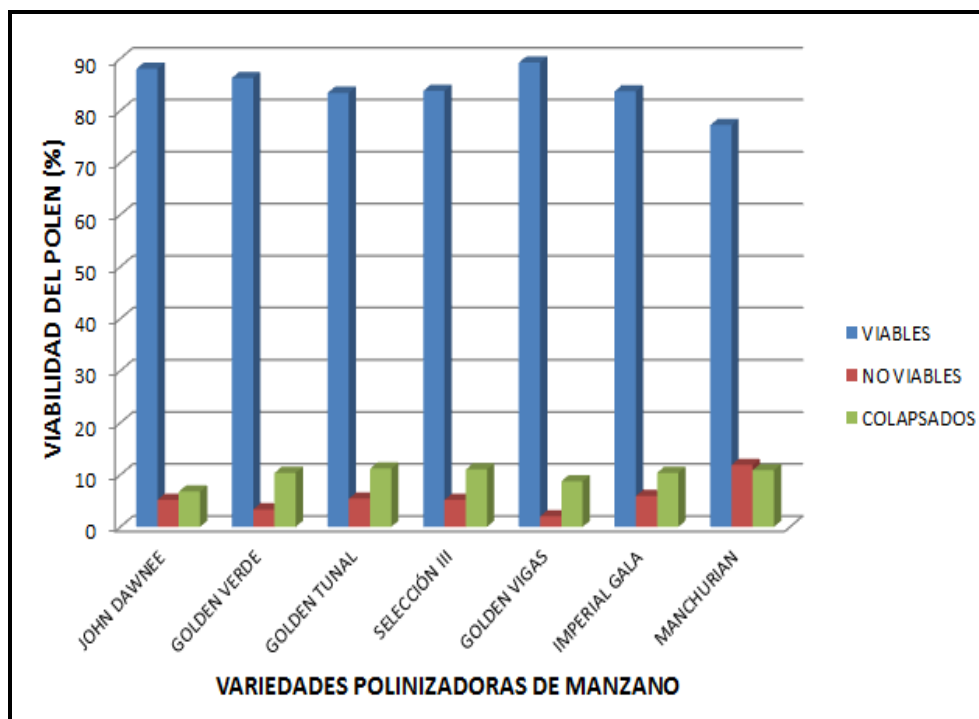
\*\*Alta significancia, \*Significancia.

En la prueba de comparación de medias para tinción de polen evaluando siete variedades polinizadoras de manzano se encontró que las variedades: Golden Vigas, John Dawnee y Golden Verde presentaron altos valores de viabilidad con 89.22, 88.02 y 86.26%, seguidas de Selección II, Imperial Gala y Golden Tunal con 83.78, 83.69 y 83.40%. Manchurian fue la variedad que obtuvo menor porcentaje con valor de 77.21%, misma variedad que presentó mayor porcentaje de polen no viable con valor de 11.88%; el resto de las variedades presentaron valores por debajo de este porcentaje. En cuanto a la variable colapsados, podemos mencionar que esta característica no es atribuible a la variedad, más bien al manejo que el polen recibió. Lo anterior se muestra en el Cuadro 3 y Figura 17.

**Cuadro 3.** Prueba de comparación de medias de Tukey para viabilidad del polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2009-2010.

<b>Variedad</b>	<b>Viables (%)</b>	<b>No viables (%)</b>	<b>Colapsados (%)</b>
John Dawnee	88.02a	5.20b	6.77a
Golden Verde	86.26a	3.35b	10.37a
Golden Tunal	83.40ab	5.40b	11.19a
Selección II	83.78ab	5.18b	11.02a
Golden Vigas	89.22a	2.01b	8.76a
Imperial Gala	83.69ab	5.91b	10.39a
Manchurian	77.21b	11.88a	10.90a
dms	7.41	4.09	7.27

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey  $\leq 0.05$ .



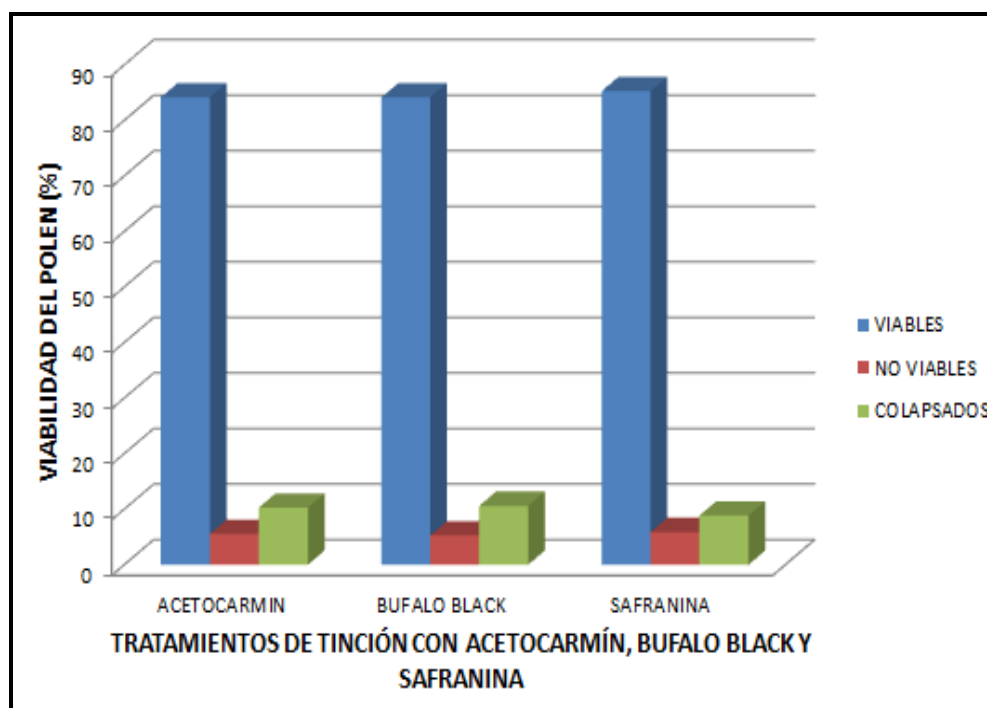
**Figura 17.** Viabilidad del polen de variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2009-2010.

Corroborando la información del ANVA para viabilidad del polen de las variedades polinizadoras de manzano en la comparación de medias, podemos notar que en la evaluación de los tres tratamientos de tinción no se encontró diferencias estadísticas entre los tratamientos de tinción con Acetocarmín, Búfalo Black y Safranina para las variables viables y no viables. Lo anterior se muestra en el Cuadro 4 y en Figura 18, sin embargo, en la práctica pudimos encontrar que las observaciones al microscopio son más claras con Acetocarmín.

**Cuadro 4.** Prueba de comparación de medias de Tukey para viabilidad del polen utilizando medio de cultivo con 15, 20, y 25% de sacarosa como tratamiento de tinción de polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2009-2010.

Tratamientos	Viables (%)	No viables (%)	Colapsados (%)
Acetocarmín	84.16a	5.55a	10.28a
Búfalo Black	84.12a	5.26a	10.60a
Safranina	85.25a	5.87a	8.86a
dms	3.85	2.12	3.77

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey  $\leq 0.05$ .



**Figura 18.** Viabilidad del polen de variedades polinizadoras de manzano utilizando medio de cultivo con 15, 20 y 25% de sacarosa como tratamiento de tinción del polen en el ciclo agrícola 2009-2010.

**Viabilidad del polen de las variedades polinizadoras de manzano para el ciclo agrícola 2010-2011**

El análisis de varianza presentó diferencia altamente significativa entre las variedades polinizadoras de manzano para la variable viables y significancia para la variable no viables, para el factor tratamientos (Medio de cultivo de 5, 10, 15, 20, y 25% de sacarosa), se encontró significancia en las variables viables y no viables, así como también se encontró significancia en la interacción variedad\*tratamientos en la variable viables tanto que para la interacción variedad\*repetición se encontró significancia en la variable no viables. Lo anterior se muestra en el Cuadro 5.

**Cuadro 5.** Análisis de varianza para viabilidad del polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011.

FV	GL	Viables		No viables		Colapsados	
		CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Variedades	7	647.15	<.0001**	124.87	0.0183*	312.70	0.0013*
Tratamientos	2	774.56	0.0021*	170.66	0.0306*	248.43	0.0438*
Repeticiones	3	114.17	0.3768	32.83	0.5403	51.19	0.5601
Varied*tratam	14	360.34	0.0012*	120.02	0.0071	146.03	0.0440*
Varied*repet	21	158.74	0.1410	83.89	0.0426*	120.99	0.0845
Trat*repet	6	108.65	0.4334	61.57	0.2498	59.76	0.5669
Error	42	107.83		45.01		73.62	
Total	95						
CV		13.05		62.53		88.47	

\*\*Alta significancia, \*Significancia.

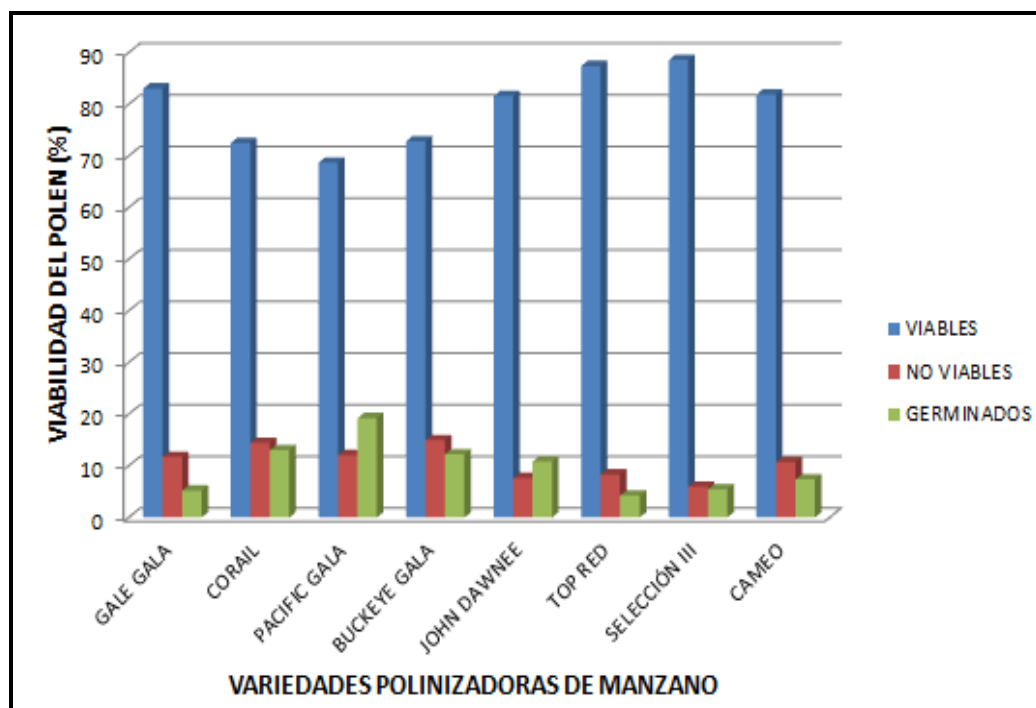
En la prueba de comparación de medias para tinción de polen evaluando ocho variedades polinizadoras de manzano en la variable viables se encontró que las variedades Selección III y Top Red obtuvieron altos valores de viabilidad con 88.55 y 87.41% seguidas de Gale Gala, Cameo, John Dawnee, Buckeye Gala, Corail y el que obtuvo menor porcentaje fue Pacific Gala presentado valores de

83.05, 81.92, 81.58, 72.81, 72.52 y 68.69%, en lo que respecta a la variable no viables la variedad que obtuvo mayor porcentaje de viabilidad fue Buckeye Gala con 14.95% seguido de Corail, Pacific Gala, Gale Gala, Cameo, Top Red, John Dawnee y finalmente Selección III con 14.46, 12.07, 11.72, 10.71, 8.34, 7.61 y 5.95. Con respecto a la discusión a la variable colapsados podemos mencionar que esta característica no es atribuible a la variedad, sino más bien al manejo que el polen recibió. Lo anterior se muestra en el Cuadro 6 y Figura 19.

**Cuadro 6.** Prueba de comparación de medias de Tukey para viabilidad por tinción del polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011.

<b>Variedad</b>	<b>Viables (%)</b>	<b>No viables (%)</b>	<b>Colapsados (%)</b>
Gale Gala	83.05ab	11.72ab	5.22b
Corail	72.52bc	14.46ab	13.00ab
Pacific Gala	68.69c	12.07ab	19.23a
Buckeye Gala	72.81bc	14.95a	12.23ab
John Dawnee	81.58abc	7.61ab	10.80ab
Top Red	87.41a	8.34ab	4.24b
Selección III	88.55a	5.95b	5.48b
Cameo	81.92abc	10.71ab	7.35b
dms	13.51	8.73	11.16

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey  $\leq 0.05$ .



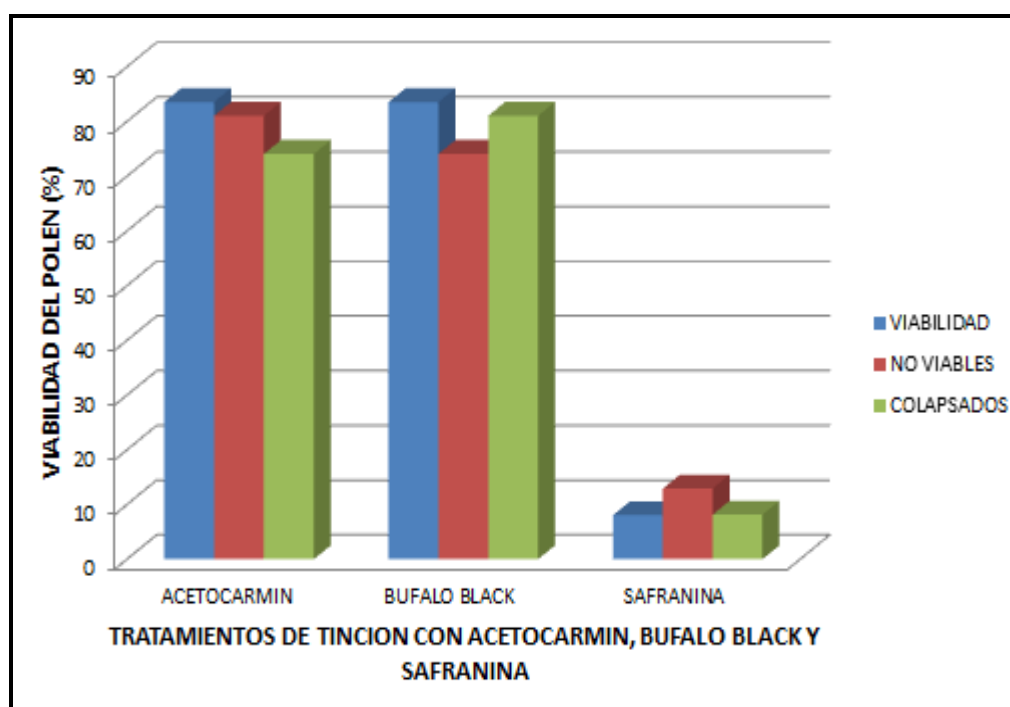
**Figura 19.** Viabilidad del polen de variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011.

En la comparación de medias evaluando tres diferentes tratamientos de tinción que son Acetocarmín, Búfalo Black y Safranina se observó que de acuerdo a la variable viables los tratamientos que obtuvieron altos valores son Acetocarmín y Búfalo Black con 83.56 y 81.06% y el que presentó menor porcentaje fue el tratamiento de safranina con 74.07%, en cuanto a la variable no viable el tratamiento que obtuvo mayor porcentaje fue Búfalo Black con 13.00% seguida de Safranina con 10.79% y el que obtuvo menor porcentaje fue Acetocarmín con 8.39%, lo anterior puede apreciarse en el Cuadro 7 y en Figura 20.

**Cuadro 7.** Prueba de comparación de medias de Tukey para viabilidad por tratamientos de tinción del polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011.

Tratamiento	Viables (%)	No viables (%)	Colapsados (%)
Acetocarmín	83.56a	8.39b	8.04a
Búfalo Black	81.06a	13.00a	12.91a
Safranina	74.07b	10.79ab	8.14a
dms	6.30	4.07	5.21

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey  $\leq 0.05$ .



**Figura 20.** Viabilidad del polen de variedades polinizadoras de manzano con diferentes tratamientos de tinción en el ciclo agrícola 2010-2011.

Los resultados sobre viabilidad en este ciclo son similares a los que obtuvieron Radford *et al* (1974), quienes consideran viables los granos de polen que adquieren un color rojo al ser entintados con Acetocarmín 1%; y no viables los que permanecieron de color café oscuro con la misma tinción de Acetocarmín,



este mismo método ha sido reportado por Malc *et al.*, (2011). Estudios realizados por Guerrero (2005), indicaron que un polen viable puede no germinar en el estigma. La viabilidad expresa el potencial de un grano de polen para germinar (ISTA, 1999).

Por otro lado los resultados de la tinción con Búfalo Black coinciden con lo reportado por (Jackson, 1988), donde los granos no teñidos se consideraron como abortivos o no viables. Rosalinda *et al.*, (2006) trabajando con viabilidad del polen *Helianthus annuus* spp. *Texanus* empleó el mismo método y obtuvo resultados aceptables.

En la literatura revisada no se encontraron reportes técnicos o científicos sobre pruebas de viabilidad de polen de manzano con el uso de estas técnicas de tinción.

## Germinación de polen de variedades polinizadoras de manzano

### Germinación del polen de variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2009-2010

El análisis de varianza presentó significancia entre las variedades polinizadoras de manzano para la variable germinados de los granos de polen en tanto que para el factor tratamientos (medio de cultivo con 15, 20 y 25% de sacarosa) se encontró significancia en el factor no germinados, por otro lado en la interacción tratamientos\*repetición se encontró significancia para la variable germinados y no germinados. Lo anterior se muestra en el Cuadro 8.

**Cuadro 8.** Análisis de varianza para la germinación del polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2009-2010.

FV	GL	Germinados		No germinados		Colapsados	
		CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Variedades	3	2931.74	0.0485*	2149.66	0.0862	248.49	0.5786
Tratamientos	2	3054.26	0.0602	4512.42	0.0134*	436.83	0.3250
Repeticiones	4	2171.83	0.0934	1521.93	0.1722	150.55	0.8023
Varied*tratam	6	2411.27	0.0506	1906.09	0.0795	156.62	0.8567
Varied*repet	12	963.85	0.4783	1169.03	0.2588	299.46	0.6403
Trat*repet	6	3075.16	0.0131*	2436.92	0.0241*	379.40	0.4456
Error	24	964.61		870.03		370.70	
Total	59						
CV		60.20		72.84		243.06	

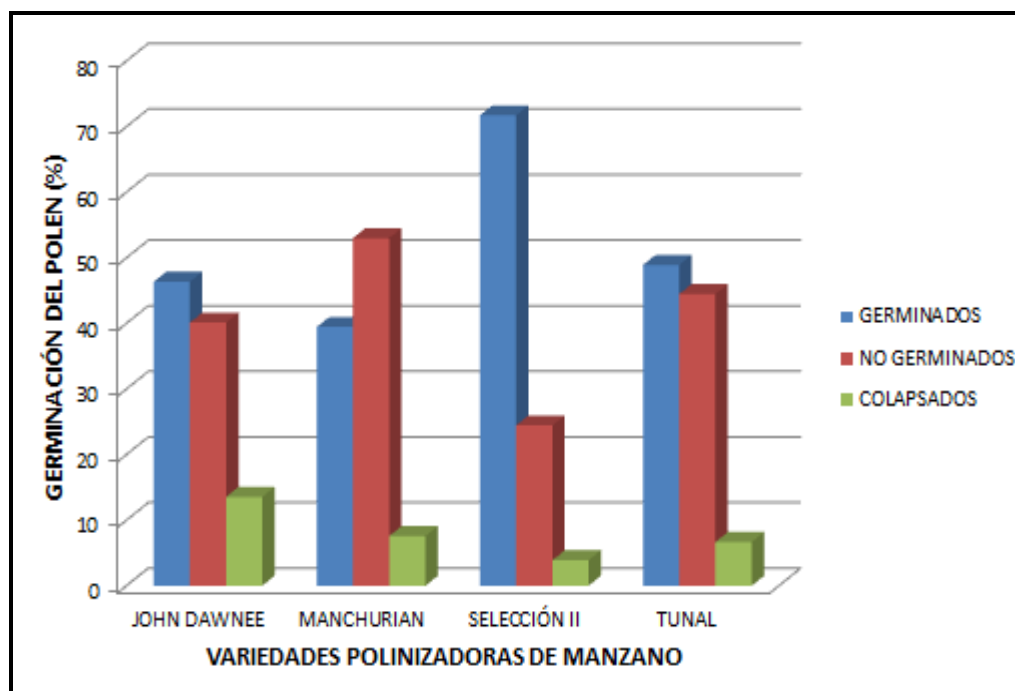
\*\*Alta significancia, \*Significancia.

En la prueba de comparación de medias para la germinación de polen de cuatro variedades polinizadoras de manzano (John Dawnee, Manchurian, Selección II y Golden Tunal) podemos observar que de acuerdo a la variable germinados, la variedad que obtuvo mayor porcentaje de polen fue Selección II con 71.69% seguido de Golden Tunal y John Dawnee con 48.89 y 46.33% y el que obtuvo menor porcentaje fue Manchurian con 39.44% de germinación de granos de polen. En la variable granos de polen no germinados todas las variedades polinizadoras se encuentran en un rango de 24 a 52% y no se encontró diferencia estadísticas entre variedades. Con respecto a la discusión de la variable “colapsados” podemos mencionar que esta característica no es atribuible a la variedad, sino más bien al manejo que el polen recibió. Lo anterior puede apreciarse en el Cuadro 9 y en Figura 21.

**Cuadro 9.** Prueba de comparación de medias de Tukey para la germinación del polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2009-2010.

<b>Variedad</b>	<b>Germinados (%)</b>	<b>No germinados (%)</b>	<b>Colapsados (%)</b>
John Dawnee	46.33ab	40.11a	13.55a
Manchurian	39.44b	52.98a	7.57a
Selección II	71.69a	24.42a	3.88a
Golden Tunal	48.89ab	44.44a	6.66a
dms	31.28	29.71	19.39

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey  $\leq .05$ .



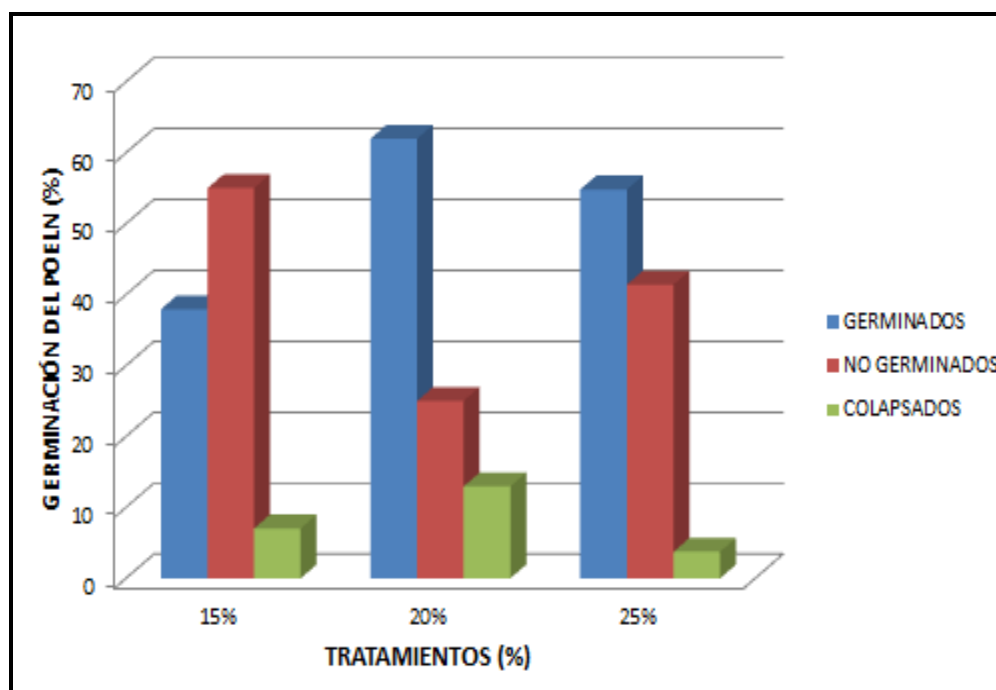
**Figura 21.** Germinación del polen para variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2009-2010

En la prueba de comparación de medias evaluando tres diferentes tratamientos de germinación (15, 20 Y 25% de sacarosa en el medio de cultivo) podemos observar que para la variable germinados no hubo diferencia estadística. Por otro lado, en la variable no germinados el tratamiento 15% es el que presentó mayor porcentaje con valor de 55.02% seguido del tratamiento de 25% con valor de 41.41% y el que obtuvo menor porcentaje fue el tratamiento de 20% con 25.02% de germinación de granos de polen. Lo anterior puede apreciarse en el Cuadro 10 y Figura 22.

**Cuadro 10.** Prueba de comparación de medias de Tukey para la germinación del polen utilizando medio de cultivo con 15, 20 y 25% de sacarosa como tratamientos en las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2009-2010.

Tratamientos	Germinados (%)	No germinados (%)	Colapsados (%)
15% Sacarosa	37.93a	55.02a	7.04a
20% Sacarosa	62.00a	25.02b	12.97a
25% Sacarosa	54.83a	41.41ab	3.75a
dms	24.52	23.29	15.20

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey  $\leq 0.05$ .



**Figura 22.** Germinación del polen por tratamientos (medio de cultivo con 15, 20 y 25%) para variedades polinizadoras de manzano durante el ciclo agrícola 2009 - 2010.

**Germinación de polen de variedades polinizadoras de manzano para el ciclo agrícola 2010-2011**

El análisis de varianza para la germinación del polen presentó diferencia altamente significativa dentro de variedades polinizadoras de manzano viables y no viables, en tanto que para el factor observaciones (4, 8 y 12 horas de observación) se observó significancia en las variables viables y no viables, en las interacciones variedad\*tratamiento (medio de cultivo con 5, 10, 15, 20 y 25% de sacarosa) y variedad\*observaciones se encontró significancia en la variable viables, pero para el factor tratamiento\*observaciones se encontró significancia en las variables viables y no viables. Lo anterior se muestra en el Cuadro 11.

**Cuadro 11.** Análisis de varianza para la germinación del polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011.

FV	GL	Viables		No viables		Colapsados	
		CM	Pr > F	CM	Pr > F	CM	Pr > F
Variedades	7	8782.22	<.0001**	9757.69	<.0001**	224.4417	<.0001*
Tratamientos	4	952.78	0.1623	787.06	0.2862	0.0800	<.0001*
Observaciones	2	1970.11	0.0347*	2371.38	0.0240*	0.0533	<.0001*
Repeticiones	4	439.18	0.5509	265.35	0.7901	0.0800	<.0001*
Varied*tratam	28	1178.82	0.0026*	950.87	0.0524	0.0026	<.0001*
Varied*observ	14	1031.34	0.0422*	1068.06	0.0555	0.0068	<.0001*
Varied*repet	28	580.14	0.4615	588.68	0.5508	0.0026	<.0001*
Trat*observ	8	1289.56	0.0262*	1438.81	0.0219*	0.3200	<.0001*
Observ*repet	8	248.25	0.9015	289.70	0.8799	0.3200	<.0001*
Error	196	576.00		623.55		0.0000	<.0001*
Total	299						
Cv		55.34		48.62		0.00	

\*\*Alta significancia, \*Significancia.

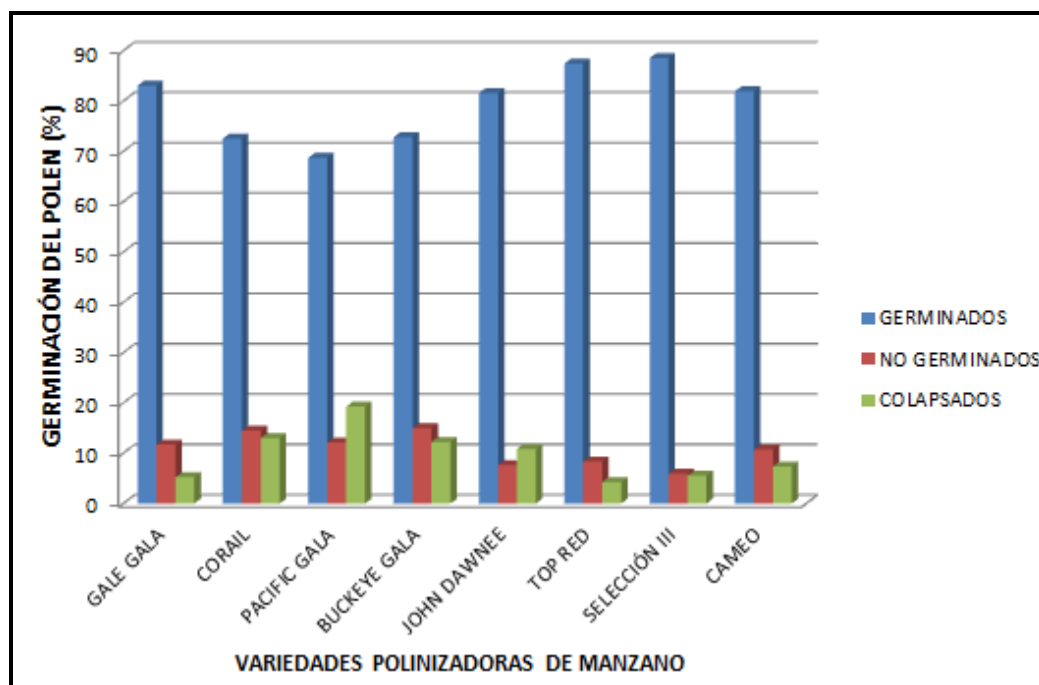
En la prueba de comparación de medias de germinación evaluando ocho variedades polinizadoras de manzano (Gale Gala, Corail, Pacific Gala, Buckeye Gala, John Dawnee, Top Red, Selección III y Cameo) podemos observar que de

acuerdo al porcentaje del polen germinado, las variedades que obtuvieron los mejores y mayores porcentajes fueron Selección III y Top Red con 88.55 y 87.41% seguidos de Gale Gala, Cameo, John Dawnee, Buckeye Gala, Corail y el que obtuvo menor porcentaje fue Pacific Gala con 83.05, 81.92, 81.58, 72.81, 72.52 y 68.69%, en cuanto a la variable no germinados la variedad que obtuvo mayor porcentaje fue Buckeye Gala con valor de 14.95% seguido de Cameo, Gale Gala, Pacific Gala, Corail, John Dawnee y Top Red con valores de 10.71, 11.72, 12.07, 14.46, 7.61 y 8.34% y el que mostro valor más bajo fue Selección III con 5.95% de germinación en los granos de polen. Con respecto a la discusión a la variable colapsados podemos mencionar que esta característica no es atribuible a la variedad, sino más bien al manejo que el polen recibió. Lo anterior puede apreciarse en el Cuadro 12 y Figura 23.

**Cuadro 12.** Prueba de comparación de medias de Tukey para la germinación de polen de las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011.

<b>Variedad</b>	<b>Germinados (%)</b>	<b>No germinados (%)</b>	<b>Colapsados (%)</b>
Gale Gala	83.05ab	11.72ab	5.22b
Corail	72.52bc	14.46ab	13.00ab
Pacific Gala	68.69c	12.07ab	19.23a
Buckeye Gala	72.81bc	14.95a	12.23ab
John Dawnee	81.58abc	7.61ab	10.80ab
Top Red	87.41a	8.34ab	4.24b
Selección III	88.55a	5.95b	5.48b
Cameo	81.92abc	10.71ab	7.35b
dms	13.51	8.73	11.16

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey  $\leq 0.05$ .



**Figura 23.** Germinación del polen de las variedades polinizadoras de manzano para el ciclo agrícola 2010-2011.

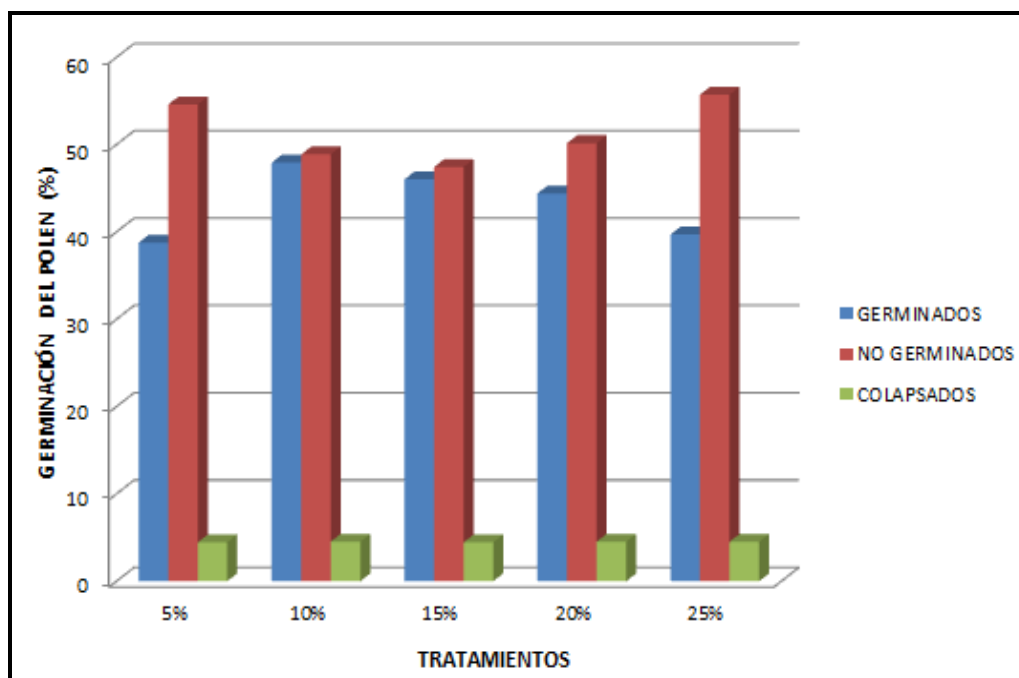
Corroborando los resultados del ANVA la germinación del polen de las variedades polinizadoras de manzano en la prueba de comparación de medias con los diferentes tratamientos (5, 10, 15, 20 y 25% de sacarosa), se muestra que en la variable germinados y no germinados no existió diferencias estadísticas, esto quiere decir que sin importar el porcentaje de sacarosa el polen reacciona de la misma manera. Lo anterior puede apreciarse en el Cuadro 13 y en Figura 24.



**Cuadro 13.** Prueba de comparación de medias de Tukey para la germinación del polen utilizando medios de cultivo con 5, 10, 15, 20, 25% de sacarosa como tratamiento en las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011.

Tratamiento	Germinados (%)	No germinados (%)	Colapsados (%)
5% Sacarosa	38.77a	54.59a	4.46b
10% Sacarosa	47.93a	48.87a	4.53a
15% Sacarosa	46.02a	47.43a	4.46b
20% Sacarosa	44.41a	50.16a	4.53a
25% Sacarosa	39.69a	55.71a	4.53a
dms	12.06	12.55	0

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey  $\leq 0.05$ .



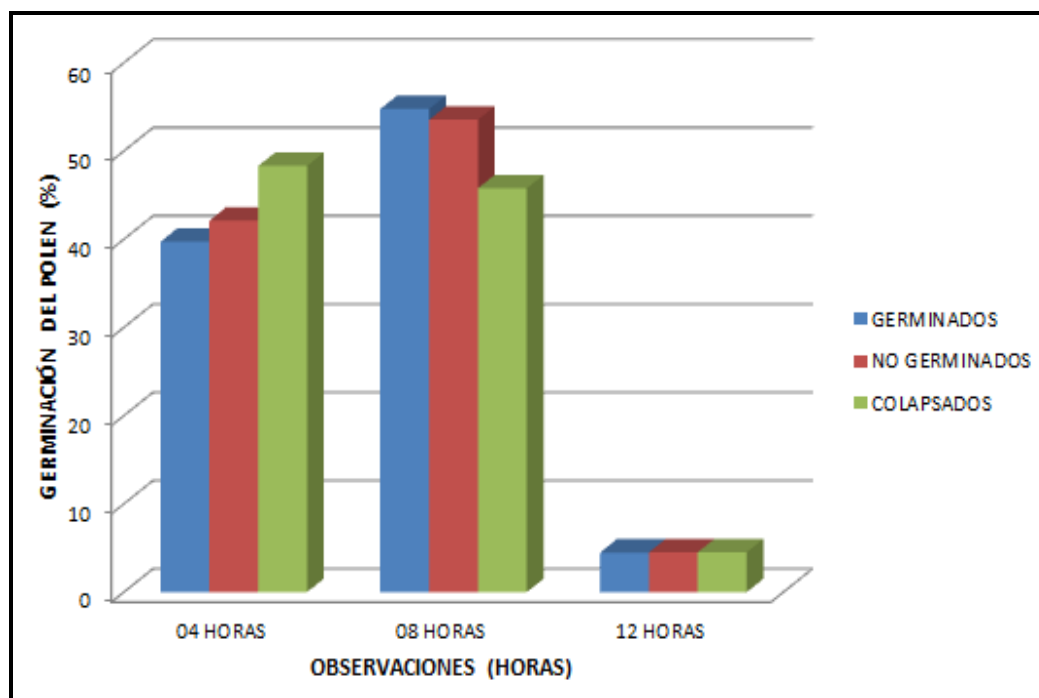
**Figura 24.** Germinación del polen de los tratamientos (medio de cultivo con 5, 10, 15, 20 y 25% de sacarosa) para variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011.

En la evaluación de comparación de medias para las diferentes observaciones (de 4, 8 y 12 horas) de germinación del polen en las variedades polinizadoras de manzano podemos observar que a las 12 horas se presentó el mayor porcentaje con 48.30% seguida de la observación de 8 horas con valor de 42% y el que obtuvo menor porcentaje fue la observación de 4 horas con 39.71%. Para los granos de polen no germinados el que obtuvo mayor porcentaje de los tres observaciones fue la de 4 horas con 54.75%, seguida de la observación de 9 horas con 53.45% y finalmente el que obtuvo menor porcentaje fue la observación de 12 horas con 45.77%. Lo anterior puede apreciarse en el Cuadro 17 y en Figura 25.

**Cuadro 14.** Prueba de comparación de medias de Tukey para la germinación del polen por observaciones en las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011.

<b>Observación</b>	<b>Germinados (%)</b>	<b>No germinados (%)</b>	<b>Colapsados (%)</b>
04 Horas	39.71b	54.75a	4.48b
08 Horas	42.09ab	53.54ab	4.52a
12 Horas	48.30a	45.77b	4.52a
dms	8.01	8.34	0.00

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey  $\leq 0.05$



**Figura 25.** Germinación del polen por observaciones para las variedades polinizadoras de manzano en el ciclo agrícola 2010-2011.

Los resultados anteriores con los porcentajes de germinación encontrados con esta técnica fueron similares a los que reporta Sharafi (2011) en sus pruebas de germinación y longevidad de polen con 5 cultivares de manzano (*Malus Pumila* L.), considerando niveles de temperatura de cultivo en el orden de los 21 °C.

Los rangos de germinación de polen encontrados con la técnica utilizada de sacarosa con agar se ubicaron entre 72.00 y 89.00% entre las variedades polinizadoras de manzano probadas en el ciclo agrícola 2010 – 2011, estos resultados concuerdan con lo que reporta Parveen y Shaukat (2008) en su trabajo de investigación sobre capacidad de germinación de polen de manzano almacenado hasta por 12 semanas en refrigeración, en donde reportan rangos desde 65.10 hasta 76.40% de germinación de polen utilizando un medio de cultivo con la adición de ácido bórico y sucrosa.

Los resultados de germinación encontrados con los tratamientos de sacarosa con período de incubación de 4, 8 y 12 horas en el ciclo agrícola 2010 – 2011 se aproximan a los reportados por Tosun y Koyuncu (2007), quienes reportaron 50.0 y 67% de germinación en sus investigaciones con polen de cerezo y donde además del agar y la sacarosa, utilizaron también ácido bórico, estos resultados también los reportan con tiempos de incubación de 48 horas.

En cuanto a los períodos de incubación del polen para las observaciones de germinación de las variedades polinizadoras de manzano se realizaron observaciones a 4, 8 y 12 horas observando que el periodo de tiempo con mayor germinación fue a las 8 y 12 horas, estos resultados fueron similares a los que reportaron (Yildiz y Yilmaz, 2002), quienes encontraron buena germinación del polen de fresa cultivar Tufts a partir de 1 h a 24 °C, y también concuerdan con lo que mencionan (Vasilakakis y Porlingis, 1985), quienes trabajando con polen de pera cultivar Tsakoniki, detectaron buenos niveles de germinación al inicio de la incubación, es decir a 1 hora con 10 °C.

La germinación deficiente en el estigma se puede deberse a que éste no esté receptivo en ese momento a causa de condiciones del medio ambiente, como altas temperaturas y/o baja humedad, así como vientos fuertes, secos y fríos. Otra causa para la baja germinación del polen es la incompatibilidad de la o las variedades polinizadoras con la variedad o variedades que van a polinizar. En esta situación, el polen germina normalmente, pero el tubo polínico puede detener su crecimiento a mitad de su recorrido y no efectuar la fecundación.

Por último, la causa más común para la baja germinación del polen es cuando éste ha perdido calidad debido a que fue colectado, almacenado y transportado de manera inadecuada. Esto se asemeja con los resultados obtenidos en el porcentaje de germinación del polen de las variedades polinizadoras de

manzano en los ciclos agrícolas 2009 - 2010 y 2010 - 2011 donde podemos comprobar que el polen no germinó al 100%.

Con respecto a la discusión de polen colapsado que se mostraron en los cuadros anteriores dependió del manejo que el polen recibió coincidiendo con Guerrero (2005) donde menciona que la calidad del polen depende de la forma en que fue colectado, almacenado y transportado.

## **CONCLUSIONES**

### **Viabilidad del polen de las variedades polinizadoras de manzano**

Las variedades polinizadoras de manzano que obtuvieron mayores porcentajes de viabilidad del polen para el ciclo agrícola 2009 – 2010 fueron Golden Vigas, John Dawnee y Golden Verde con 89.22, 88.02 y 86.26%. Mientras que las variedades polinizadoras de manzano que obtuvieron mayores porcentajes de viabilidad del polen el ciclo agrícola 2010 – 2011 fueron Selección III y Top Red con 88.55 y 87.41%. Las variedades no coinciden ya que en cada ciclo se utilizaron diferentes variedades.

No hubo diferencia para los tres colorantes utilizados en la tinción de los granos de polen; Acetocarmín, Safranina y Búfalo Black ya que todos tiñeron correctamente el grano del polen, sin embargo, se concluye que Acetocarmín tiñe al grano de polen con mayor calidad para su observación en el microscopio.

### **Germinación del polen de las variedades polinizadoras de manzano**

La germinación del polen de las variedades polinizadoras de manzano para el ciclo agrícola 2009 – 2010, la variedad polinizadora que obtuvo el mayor porcentaje fue Selección II con 71.69%. Para el ciclo agrícola 2010 – 2011 fueron dos variedades los que obtuvieron los valores más altos; Selección III y Top Red con 88.55 y 87.41% de germinación del polen.

Entre los diferentes tratamientos probados de 5, 10, 15, 20 y 25% de sacarosa en el medio de cultivo, podemos concluir que no presentaron diferencia estadística entre ellos.

En cuanto a los diferentes tiempos de observaciones realizadas; 4, 8 y 12 horas podemos concluir que el tiempo con la mayor cantidad de polen germinado de las variedades polinizadoras de manzano fue a las 12 horas con 48.30% de polen germinado.

## LITERATURA CITADA

- Allen, J.R., Mckee, G.W., y McGahen, J.H., 1973, *Leaf number and maturity in hybrid corn*. Agron. J. 65(2): Pags. 233-235
- Bernier, G., J. Kinet , and R. Sachs. 1981. The physiology of flowering. Vol I. The initiation of flowers. 274 p. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA.
- Brown S.K., Lezzoni A.F., Fogle H.W., 1996. Cherries. In: Janick J., Moore J.N. (ed.), Fruit Breeding. Vol. 1. Tree and Tropical Fruits. New York, John Wiley & Sons, Inc.: 213–230.
- Buban, T., and M. Faust. 1982. Flower bud induction in apple trees: Internal control and differentiation. Hort. Rev. 4:174-202.
- Chaubal, R., C. Zanella, M. Trimmell, T. Fox y P. Bedinger. (2000). Two male-sterile mutants of *Zea mays* (Poaceae) with and extra cell division in the anther wall. American Journal of Botany 87: 1193-1201.
- Childers, N. F.1982. Fruticultura Moderna. Editorial Hemisferio Sur. México, D. F. pp. 143-161.



- Cornell W., 1981. Pollination techniques and gibberellin treatments for assistance in chierimoya fruit set. California rare fruit growers Year Book. 13:69-74.
- Countanceau, M. 1971. Fruticultura. Técnicas y economía de los cultivos de rosáceas leñosas productoras de fruta. Oikos- Tau S.A. pp. 46- 47.
- Cuevas G. E., 2009. Revista biológicas No. 11. Laboratorio de Ecología de Interacciones Bióticas, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria. Morelia Michoacán. México.
- Dane F., Olgun G., Dalgic O., 2004. *In vitro* pollen germination of some plant species in basic culture medium. Journal of Cell and Molecular Biology, Halic University, 3: 71–76. (In Turkey).
- Dennis, F. G. 1996. Fruit set. pp. 99-106. En: Tree fruit physiology: growth and development. Good Fruit Grower. Yakima, Wash.
- Esau K. 1987. Anatomía de las plantas con semilla (2ª Reim.) Hemisferio sur. Buenos Aires Argentina. 511 pp.
- Escobar W. T., Zarate R. D. Y Bastidas A. 1986. Biología floral y polinización artificial del guanabano (*annona muricata* L.). en condiciones del valle del Cauca, Colombia. Acta Agronomica. 36(1):7-20.

- Escobar, R., 1981. Enciclopedia Agrícola y de conocimientos afines, 2a. edición, Mexico,
- Faust, M. 1989. Physiology of temperate zone fruit trees. 388 p. John Wiley and Sons, New York, USA.
- Forshey, C. and Elfving, D. 1989. The relationship between vegetative growth and fruiting in apple trees. Hort. Rev., 11: 229-287.
- Fosket D.E. 1994 Plant growth and development. A molecular approach. Academic Press San Diego, Cal, USA. 580 pp.
- Gazit S, E Tomer and D. Einstein. 1969. Use of plant hormones for production of seedles annona fruit. The Division of Subtropical Hort. The Volcan. Inst. of Agric. Research. 1960-1969. Israel. pp 108-112.
- Gehrke Vélez, MR., Castillo Vera, A., Ruiz Bello, C., Moreno Martínez, JL., 2011. Viabilidad y Germinacion del polen en mango (*Mangifera indica* L.) cv. Ataulfo. Interciencia. Vol 36 N° 5. 375-385.
- Gil-Albert, F. 1991. Tratado de arboricultura frutal. Vol N°1: Morfología y fisiología del árbol frutal. 104 p. 4ª ed. Ministerio de Agricultura y Alimentación. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- González M. C., Herrero M. 1994. Stigmatic penols and flower receptibiti in kiwi (actinidia deliciosa). Acta Hort. 381:502-505.

- Hedly A., Hormaza J.I., Herrero M., 2004. Effect of temperature on pollen tube kinetics and dynamics in sweet cherry, *Prunus avium* (Rosaceae). American Journal of Botany, 91: 558–564.
- Heslop-Harrison J., HESLOP HARRISON Y., SHIVANA K.R., 1984. The evaluation of pollen quality and a further appraisal of the flouochromatic (FCR) tests procedTheoretical and Applied Genetics, 67: 367–375.
- Heslop-Harrison Y. and Shivanna L. R. 1977. The receptive surface of the angiosperm stigma. Ann. Bott.41:1233-1258.
- Heslop-Harrisos J., Heslop Harrison Y., Shivanna K.R., 1984. The evaluation of pollen quality and a further appraisal of the flouochromatic (FCR) tests procedure. Theoretical and Applied Genetics, 67: 367–375.
- Higuchi H.,N. Utsunomiya and T. Sakuratani. 1988. High temperature effects on cherimoya fruit set, growth and developmet under greenhouse conditions. Sci. Hort. 77:23-21.
- Hoover, E.; De Silva, N.; McArtney, S. and Hirst, P.2004 Bud development and floral morphogenesis in four apple cultivars. J.Hort.Sci.& Biotech.,79(6): 981-984.
- Ista. 1999. Reglas Internacionales para Ensayos de Semillas. Ensayo topográfico al Tetrazolio. Secretaría de Estado de Agricultura y Ganadería. España.
- Jackson, R. C. 1982. Polyploidy and diploidy: new perspectives on chromosome pairing and *Helianthus* (Compositae). Amer. J. Bot. 75: 609-614.

- Jackson, R. C. 1988. A quantitative cytogenetic analysis of an intersectional hybrid in *Helianthus annuus* (Compositae). Amer. J. Bot. 75: 219-222.
- Janick J., Moore N.J., 1996. Fruit Breeding, Tree and Tropical Fruits. Vol. 1. New York, John Wiley and Sons, Inc.
- Kapil N.R. and A.K. Bhatnagar. 1975. A fresh look at the process of double fertilization in angiosperms. Phytomorphology. 25:334-368.
- Koyuncu F., Yilmaz H., Aşkin M.A., 2000. Bazi çilek çeşitlerinde çiçek tozu üretim miktarları ve çimlenme oranının belirlenmesi üzerinde bir araştırma. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 24:699–703.
- Li, S., Z. Meng, T. Liu, and Y. Tu. 1995. Critical period of flower bud induction in Red Fuji and Ralls Janet apple trees. Gartenbauwissenschaft 60:240-245.
- Luckwill, L.C. 1974. A new look at the process of fruit bud formation in apple. Acta Hort., 3: 237-246.
- Luckwill, L.C. and Silva, J.M. 1979. The effect of daminozide and gibberellic acid on flower initiation, growth and fruiting of apple cv. Golden Delicious. J.Hort.Sci.,54: 217-223.

- Mac Daniels, L. H. E. M. Hildebrandns. 1940. A study of pollen germination upon the stigmas of apple flowers treated with fungicides. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 37:137-140.
- McCormick, S. (1993). Male Gametophyte Development. The Plant Cell 5: 1265-1275.
- McLaughlin, J.M. and Greene, D. 1991(a). Fruit and hormones influence flowering of apple. I. Effect of cultivar. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 116(3): 446-449.
- Mendoza Villareal, R., Reyes Valdés, HM., Espinosa Zapata, C., Villarreal Quintanilla, JA., 2006. Viabilidad de polen en una línea de girasol cultivado, en el girasol silvestre (*Heliantus annuus*. L. Ssp. *Texanus* Herser). Acta Botanica Mexicana. 76, 47-57: ISSN 0187-7151.
- Mertens Thomas R. y Stevenson Forrest F. 1978, Ciclos de vida de las plantas. 1ª Edicion. Editorial Limusa. Mexico.
- Moncur M.W. 1988. Floral developmet of tropical amd subtropical fruit nut species. CSIRI. Australia. 181 pp.
- Monselise, S. and Goldschmidh, E. 1982. Alternative bearing in fruit trees. Hort. Rev., 4:128-173.
- Mosca J.L.,J. Simao A., R.E. Alves, Heloisa Filgueiras and A. Fontanele B. 1997b. Physical, physicochemical and chemical changes during growth and

maturation of sugar apple (*annona squiamosa* L.). *Memorias del Congreso Internacional de Annonaceas UACH*. Chapingo Mexico pp. 304-314.

Mulcahy G.B. and D.L. Mulcahy. 1986. Pollen-pistil interaction. In: Mulcahy D.L. G.B. Mulcahy and E. Octaviano (eds.) *Biotechnology and ecology of pollen*. U.S.A. pp 173-178.

Nakasone H. Y., and Paull R. E., 1977. *Tropical fruits*. CAB-International. U.S.A. pp.45 75.

Norton J.D., 1966. Testing of plum pollen viability with tetrazolium salts. *American Society of Horticultural Science*, 89: 354–356.

Norton J.D., 1966. Testing of plum pollen viability with tetrazolium salts. *American Society of Horticultural Science*, 89:354–356.

Ottavio E., 1992. *Angiosperm Pollen and Ovules*. New York, Springer-Verlag.

Parfitt D.E., Ganeshan S., 1989. Comparison of procedures for estimating viability of *Prunus* pollen. *Horticultural Science*, 24: 354–356.

Parfitt D.E., Ganeshan S., 1989. Comparison of procedures for estimating viability of *Prunus pollen*. *Horticultural Science*,24:354–356.

Pessarakli, M. 2001. *Handbook of plant and crop physiology*. 1000 p. 2nd ed. Marcel Decker Inc., New York, USA.

- Pimienta B.E 1987. Polinizacion y fecundación en frutales perennes. SARH-INIFAP. DF, Mexico. 27 pp.
- Radford AE, Dickison WC, Masey JR, Bell CR (1974) *Vascular Plant Systematics*. Harper and Row. Nueva York, EEUU. 891 PP.
- Radford AE, Dickison WC, Massey JR, Bell CR (1974) *Vascular Plant Systematics*. Harper and Row. Nueva York, EEUU. 891 pp.
- Rallo G Juan. 1986. Frutales y Abejas. Madrid. Editorial Publicaciones de Extensión Agrícola.
- Ramírez R H. y M. Cepeda S.1993, El Manzano, Editorial Trillas. México.
- Ramírez, R.H. y M. Cepeda S. 2001. El manzano. Cuarta Edición. Editorial Trillas. México. pp. 11-79.
- Razeto, B. 1999. Para entender la fruticultura. 3ª edición. Santiago, Vértigo pp. 373.
- Reyes, L. A. 1977. Uso de un sistema de enfriamiento por evaporación de agua en el cultivo del manzano (*Malus silvestris. Mill.*) en la Sierra de Arteaga, Coahuila. Monografía Técnico-científica Vol. 3(10) Saltillo, Coahuila.

Rom, J.L. 1985. Bud development and vigor. In pollination & fruit set. Short course Proceedings Published by Goodfruit Grower. Yakima, Wa. USA.

Ryugo K., 1988. Fruit-culture: ITS ciencia and art. J Wiley & Sons. U.S.A. 334 pp.

Sanchez Guillen J. L. 2005. Biología y Geología de ESO y de Bachillerato. Profesor de Biología y Geología en el I.E.S. Pando Oviedo (España).

Secretaria de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2007. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola.

Sedgley M. and A.R. Griffin. 1989. Sexual reproduction of tree crops. Academic Press. U.K. 378 p.

Sedgley M. and Scholefield P. B., 1980. Stigma secretion in the water melon before and afther pollination. Bot. Gaz. 141 (4): 428-434.

Shivanna K.R. 1982. Pollen –pistil interaction and control of fertilization. In: Jhori B.E. (ed.) Experimental embryology of vascular plants. Springer-Verlag. Germany. pp. 131-174.

Taylor L.P., Hepler P.K., 1997. Pollen germination and tube growth. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48: 461–491.



- Tehrani G., Lay W., 1991. Verification through pollen incompatibility studies of pedigrees of sweet cherry cultivars from Vineland. *Horticultural Science*, 26: 190–191.
- Thompson M., 2004. Flowering, pollination and fruit set. In: Webster A.D., Looney N.E. (eds.), *Cherries, Crop Physiology, Production and Uses*. Wallingford, CABI Publishing: 223–243.
- Tosun F., F. Koyuncu. 2007. Investigations of suitable pollinator for 0900 Ziraat sweet cherry cv.: pollen performance tests, germination tests, germination procedures, *in vitro* and *in vivo* pollinations. *Hort. Sci. (Prague)*, 34, 2007 (2): 47–53.
- Vasilakakis M., Porlingis I.C., 1985. Effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth, effective pollination period, fruit set of pear. *Horticultural Science*, 20: 733–735.
- Vizintin L., Bohonec B., 2004. *In vitro* manipulation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) pollen and microspores: isolation procedures, viability tests, germination, maturation. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica*, 46: 177–183.
- Voyiatsiz D.G., Paraskevopoulou-Paroussi G., 2002. Factors affecting the quality and *in vitro* germination capacity of strawberry pollen. *Horticultural Science and Biotechnology*, 77: 200–203.

- Voyiatsiz D.G., Paraskevopoulou-Paroussi G., 2002. Factors affecting the quality and in vitro germination capacity of strawberry pollen. *Horticultural Science and Biotechnology*, 77: 200–203.
- Williams R.R. 1965. The effect of summer nitrogen applications on the quality of apple blossom. *J. Hort. Sci.* 40:31-41.
- Worrell D.B., C.M.S. Carrington and D.J.Hubert. 1994. Growth maturation and ripening of soursop (*Annona muricata* L.) fruit. *Sci. Hort.* 57:7-15.
- Yavar Sharafi. 2011. Investigation on pollen viability and longevity in *Malus pumila* L., *Pyrus communis* L., and *Cydonia oblonga* L., *in vitro* *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(11), pp. 2232-2236, 4 June, 2011.
- Yildiz K., Yilmaz H., 2002. Effect of jasmonic acid, ACC and ethephon on pollen germination in strawberry. *Plant Growth Regulation*, 38: 145–148.

## NOTAS

## NOTAS