

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas
Licenciatura en Biotecnología**

Informe Escrito Final

**Descripciones morfológicas del polen de teca (*Tectona grandis* L. f) y de
melina (*Gmelina arborea* Roxb.) como herramienta para el
mejoramiento genético**

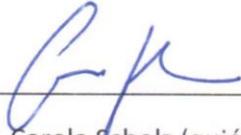
**Pasantía presentada como requisito parcial para optar al grado de
Licenciatura en Biotecnología.**

Belinda Hernández Delgado

**Campus Omar Dengo
Heredia, 2019**

Miembros del tribunal

Este trabajo de graduación fue aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biotecnología.



M.Sc. Carola Scholz (quién preside)

Sustituye al Decano de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



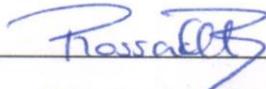
Lic. Nelson Muñoz Simon

Sustituye a la Directora de la Escuela de Ciencias Biológicas



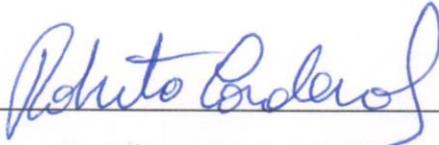
M.Sc. Ana Hine Gómez

Tutora



M.Sc. Rossana Oliva Barboza

Asesora



Dr. Roberto Cordero Solórzano

Invitado especial

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que de alguna u otra forma me ayudaron a elaborar este trabajo de graduación. Además de mi esposo y mis padres que siempre estuvieron a mi lado apoyándome.

A mi comité asesor, *M.Sc.* Ana Hine Gómez, *M.Sc.* Rossana Oliva Barboza y Lic. Rolando Calderón Fallas, por orientarme y guiarme durante el proceso.

Al Laboratorio de Biotecnología Forestal del Instituto de Investigación y Servicios Forestales (INISEFOR) de la Universidad Nacional (UNA) y al proyecto “Desarrollo de la segunda generación de mejoramiento genético de teca (*Tectona grandis L.*) y melina (*Gmelina arborea Roxb.*) en la cooperativa internacional de mejoramiento genético GENFORES (ITCR-UNA)”, en especial a *Ph.D.* Olman Murillo Gamboa, por confiar en mi persona y aportarme un proyecto para desarrollar mi investigación.

A la empresa Novelteak Costa Rica S.A por permitirme utilizar material polínico de sus plantaciones.

Al Laboratorio de Nematología de la Escuela de Agrarias de la Universidad Nacional (UNA), principalmente al Máster Walter Peraza Padilla, por permitirme utilizar el microscopio con el cual desarrolle mi metodología.

Y finalmente pero igualmente importante, a *Ph.D.* Ricardo Jiménez Montealegre por ser un apoyo y guiarme en la escritura del presente documento.

Dedicatoria

Le dedico este trabajo final a mi esposo Maikol Castro Rojas, ya que sin él no habría logrado muchas cosas en mi vida, ni sería la profesional que soy hoy en día. Gracias por apoyarme, por creer en mí y por estar a mi lado cada día.

Índice

Miembros del tribunal	I
Agradecimientos	I
Dedicatoria.....	III
Índice	IV
Índice de cuadros	VII
Índice de figuras	VIII
Abreviaturas o acrónimos.....	IX
Resumen	X
1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Justificación	5
1.3 Planteamiento del problema.....	9
1.4 Objetivos.....	9
1.4.1 Objetivo General	9
1.4.2 Objetivos Específicos.....	9
2. Marco Teórico	10
2.1 Polen	10
2.1.1 Formación del polen.....	11
2.1.2 Taxonomía.....	12
2.1.3 Morfología.....	12
2.1.4 Tamaño.....	15
2.1.5 Viabilidad.....	15
2.2 Teca (<i>Tectona grandis</i>).....	16
2.3 Melina (<i>Gmelina arborea</i>).....	17
2.4 Mejoramiento genético vegetal.....	18
2.4.1 Mejoramiento del polen	19

3. Marco Metodológico	20
3.1 Recolección del polen.....	20
3.2 Fijación y tinción de los granos de polen	21
3.3 Caracterización morfológica de los granos de polen	21
3.4 Determinación del tamaño de los granos de polen	22
3.5 Análisis estadístico	22
3.6 Análisis genético.....	23
4. Resultados.....	23
4.1 Melina	23
4.1.1 Morfología.....	23
4.1.2 Tamaño.....	25
4.1.2.1 Tamaño entre genotipos de la misma especie.....	25
4.1.2.2 Tamaño calculado para la especie	26
4.1.3 Diferencias de forma y tamaño	26
4.1.4 Coeficiente de Variación.....	28
4.1.5 Correlaciones.....	28
4.1.5.1 Correlaciones de rasgos morfológicos	28
4.1.5.2 Correlaciones genéticas	29
4.1.6 Parámetros genéticos.....	30
4.2 Teca.....	31
4.2.1 Morfología.....	31
4.2.2 Tamaño.....	33
4.2.2.1 Tamaño entre genotipos de la misma especie.....	33
4.2.2.2 Tamaño calculado para la especie	34
4.2.3 Diferencias	34
4.2.4 Coeficiente de Variación.....	36

4.2.5 Correlaciones.....	36
4.2.5.1 Correlaciones de rasgos morfológicos	36
4.2.5.2 Correlaciones genéticas	37
4.2.6 Parámetros genéticos.....	38
5. Discusión	39
5.1 Morfología y Tamaño	39
5.2 Diferencias morfológicas.....	41
5.3 Coeficiente de Variación	41
5.4 Correlaciones	42
5.4.1 Correlaciones de rasgos morfológicos	42
5.4.2 Correlaciones genéticas.....	42
5.5 Parámetros genéticos	43
6. Conclusiones.....	44
7. Recomendaciones	44
8. Referencias	46
9. Anexos.....	53
Anexo 1. Clases de formas y relaciones entre el eje polar (P) y la amplitud total (E) de los granos en la vista ecuatorial ¹	53
Anexo 2. Tamaño de los granos basado en el eje más largo ¹	54
Anexo 3. Determinación del tamaño de los granos basado en el índice de área polar o índice de apocolpio ²	55

Índice de cuadros

Cuadro 1. Resultados de la media del eje polar (EP), eje ecuatorial (EE), índice polar (P/E), circunferencia (C), largo (L), ancho (A) y el índice del apocolpio (L/A); y sus respectivos errores estándar, obtenidos para los clones de melina.....	25
Cuadro 2. Tamaño de los granos de polen de melina intraespecie, basado en la longitud del eje más largo.....	26
Cuadro 3. Correlación genética del eje polar (EP), eje ecuatorial (EE), índice polar (P/E), circunferencia (C), largo (L), ancho (A) y el índice del apocolpio (L/A), obtenidos para los datos de melina.	30
Cuadro 4. Resultados de los parámetros genéticos del eje polar (EP), eje ecuatorial (EE), índice polar (P/E), circunferencia (C), largo (L), ancho (A) y el índice del apocolpio (L/A), obtenidos para los datos de melina.	31
Cuadro 5. Resultados de la media del eje polar (EP), eje ecuatorial (EE), índice polar (P/E), circunferencia (C), largo (L), ancho (A) y el índice del apocolpio (L/A); y sus respectivos errores estándar, obtenidos para los clones de teca	33
Cuadro 6. Tamaño de los granos de polen de teca intraespecie, basado en la longitud del eje más largo.....	34
Cuadro 7. Resultados de la correlación genética del eje polar (EP), eje ecuatorial (EE), índice polar (P/E), circunferencia (C), largo (L), ancho (A) y el índice del apocolpio (L/A), obtenidos para los datos de teca.	38
Cuadro 8. Resultados de los parámetros genéticos del eje polar (EP), eje ecuatorial (EE), índice polar (P/E), circunferencia (C), largo (L), ancho (A) y el índice del apocolpio (L/A), obtenidos para los datos de teca.	39

Índice de figuras

Figura 1. Diferentes tipos de polen.....	13
Figura 2. Formas de los granos de polen	14
Figura 3. Tipos polínicos según el número y disposición de las aberturas	14
Figura 4. Tipos de aberturas de los granos de polen	14
Figura 5. Granos de polen de melina vistos al microscopio de luz. Clon 3, imagen 1-4. Clon 6, imagen 5-8. Clon 7, imagen 9-12. Clon 38, imagen 13-16. Clon 114, imagen 17-20. A) grano de polen en vista polar, B) grano de polen en vista ecuatorial, C) grano de polen en vista polar con mediciones y D) grano de polen en vista ecuatorial con mediciones. Barras de escala: 10 μm	24
Figura 6. Índice de forma (P/E) de los cinco clones de melina.....	27
Figura 7. Índice de apocolpio (L/A) de los cinco clones de melina	27
Figura 8. Correlaciones entre las diferentes variables medidas en los granos de polen de melina.	29
Figura 9. Granos de polen de teca vistos al microscopio de luz. Clon 1, imagen 1-4. Clon 18, imagen 5-8. Clon 81, imagen 9-12. Clon 83, imagen 13-16. Clon 103, imagen 17-20. A) grano de polen en vista polar, B) grano de polen en vista ecuatorial, C) grano de polen en vista polar con mediciones y D) grano de polen en vista ecuatorial con mediciones. Barras de escala: 10 μm	32
Figura 10. Índice de forma (P/E) de los cinco clones de teca.	35
Figura 11. Índice de apocolpio (L/A) de los cinco clones de teca.....	35
Figura 12. Correlaciones entre las diferentes variables que fueron medidas para los granos de polen de teca.	37

Abreviaturas o acrónimos

A	Ancho
AP	Apoporo
AM	Ancho de los muros que conforman el retículo
ANDEVA	Análisis de varianza
C	Circunferencia
CG	Célula generatriz
CMP	Células madre del polen
CV	Coefficiente de variación
CVT	Célula vegetativa
DE	Diámetro ecuatorial en vista polar
EE	Eje ecuatorial
EL	Diámetro de las láminas
EP	Eje polar
h^2	Heredabilidad
IAP (L/A)	Índice de área polar, Índice del apocolpio o Índice de tamaño
INISEFOR	Instituto de Investigación y Servicios Forestales
ITCR	Instituto Tecnológico de Costa Rica
L	Largo
LBF	Laboratorio de Biotecnología Forestal
MEB	Microscopio electrónico de barrido
ML	Microscopio de luz
NPC	Número, posición y carácter de la apertura
OIJ	Organismo de Investigación Judicial
P/E	Índice polar o Índice de forma
UNA	Universidad Nacional de Costa Rica

Resumen

A pesar de la importancia económica de la teca y melina en el mundo forestal tropical y de la existencia de programas de mejoramiento genético desde antes de los años 70 en América latina, se reportan avances modestos hacia generaciones avanzadas de mejoramiento. Para esto se requiere desarrollar un programa de cruzamientos controlados entre los genotipos de mejor desempeño, con el fin de continuar obteniendo ganancias genéticas de manera sostenida en las siguientes generaciones de mejoramiento. Por lo anterior, se desarrolla en la actualidad el proyecto “Desarrollo de la segunda generación de mejoramiento genético de teca (*Tectona grandis* L.) y melina (*Gmelina arborea* Roxb.) en la Cooperativa GENFORES (0021-14, ITCR-UNA) (2015-2019)”, el cual posee un componente biotecnológico, que busca dar respuesta a las interrogantes en relación al manejo y conservación de polen de ambas especies con el establecimiento de un banco de polen (criobanco), y en específico con el presente trabajo se busca conocer los diferentes descriptores morfológicos de los granos de polen que permitan una selección temprana de polen viable, con el fin de aumentar la eficacia de la polinización controlada.

Algunos de estos caracteres son la forma, el tamaño y el número de aberturas, debido a que, en el estado de madurez del grano, son constantes dentro de la especie, género e incluso en la familia, lo que les confiere a estos descriptores un alto valor taxonómico y filogenético. En el presente estudio se trabajó con el polen de cinco clones de teca y cinco clones de melina, con el fin de establecer la morfología de cada especie y si existía variación entre genotipos. Se determinó que los granos de polen de ambas especies son mónadas, tricolporados y medianos. Melina mostró granos oblatos-subesferoidales y teca presenta granos subesferoidales. Además, en ambas especies se encontró un alto coeficiente de variación intragenotípica, lo que demuestra una asociación fuerte del polen con el genotipo paterno vegetal. Por lo que se llegó a la conclusión de que, en los granos de polen, tanto de teca como de melina, existe una fuerte asociación de la expresión fenotípica con el genotipo, lo que conlleva a un alto control genético de los caracteres morfológicos.

1. Introducción

1.1 Antecedentes

El estudio del polen ha sido de gran interés en las últimas décadas debido a su función biológica, por lo que diversos investigadores en diferentes países han realizado caracterizaciones morfológicas de algunos géneros y especies, con el fin de establecer singularidades que diferencien o definan características interespecíficas o intergenéricas, así como determinar rasgos evolutivos dentro de las familias vegetales (Garralla & Cuadrado, 2005; López & Rosenfeldt, 2015). Por ejemplo, se reporta el análisis del polen del género *Opuntia* en el que los investigadores se basaron en la técnica de acetólisis, descrita por Erdtman (1952). Las mediciones y observaciones fueron realizadas por medio de un microscopio óptico y complementaron los resultados con observaciones en microscopio electrónico de barrido. Los granos fueron montados en una platina metálica y bañados en oro. Utilizaron muestras de al menos 20 granos de cada especie. Los investigadores determinaron que los granos de polen de *Opuntia* son esferoidales, apolares, radiosimétricos, pantoporados, con poros operculados y esculturados, con exina semitectada o tectada (Garralla & Cuadrado, 2005). Una investigación similar en Venezuela obtuvo polen de varias especies pertenecientes al género *Sterculia* (*S. abbreviata*, *S. amazonica*, *S. apetala* var. *apetala*, *S. multiovula*, *S. parviflora*, *S. pruriens* var. *pruriens*, *S. pruriens* var. *glabrescens* y *S. steyermarkii*). El polen fue extraído de las anteras bajo el microscopio sin utilizar químicos. Los granos fueron colocados sobre papel adhesivo y se cubrieron con una fina capa de paladio, posteriormente se observaron los granos de polen bajo el microscopio de barrido electrónico y se caracterizó la exina del polen de cada una de las especies, determinando que los granos son tricolporados. Aunque no fue posible distinguir una morfología característica entre especies, se logró determinar la posible clasificación en tres subgrupos de tipos polínicos para el género *Sterculia*: polen con ornamentación granulosa, polen con ornamentación reticulada y polen con ornamentación rugulada (Mondragón, 2006).

Por otra parte, la caracterización de los granos de polen de ocho especies del género *Canna*, se realizó con observaciones en el microscopio de luz (ML) y el microscopio

electrónico de barrido (MEB). Los granos fueron teñidos con azul de toluidina 1% y con fucsia básico. Seguidamente fueron montados con glicerina - gelatina y sellados con parafina. Y para la observación en MEB los granos se metalizaron con oro - paladio. Los granos fueron medidos en ML, y en MEB se cuantificó la densidad de las espinas. Se obtuvo que los granos miden entre 55 y 90 μm ; y la ornamentación fue determinada como equina, con espinas cónicas, irregulares, digitiformes o gemiformes (Ciciarelli, Passarelli & Roller, 2010).

Para la determinación de la morfología del polen de cuatro especies del género *Staelia* se utilizó ML y MEB. El material se preparó por medio del método de acetólisis, se montaron con gelatina - glicerina. Posteriormente estos granos se deshidrataron y metalizaron con oro - paladio. Se midieron al menos 20 granos y se determinó que los granos son estefanocolporados, esferoidales, suboblatos, radiosimétricos, isopolares y de ámbito circular, de tamaño mediano (Salas & Cabral, 2014).

Investigadores argentinos realizaron observaciones en el microscopio óptico, con el fin de caracterizar morfológicamente granos de polen del género *Oxalis*, para lo cual montaron la muestra en glicerol y la sellaron con parafina y para microscopía electrónica de barrido trataron las anteras con alcohol 100% y las dejaron secar, posteriormente las metalizaron con oro - paladio durante tres minutos. Los investigadores obtuvieron que la morfología de este género es característica en algunos casos a nivel de especie, repitiéndose la presencia de exina reticulada (López & Rosenfeldt, 2015).

En Chile también se realizó un estudio en el que utilizaron seis clones de *Nothofagus nervosa*, para el análisis morfológico de los granos, por medio de microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido. Los investigadores realizaron observaciones en 100x, 400x y 1000x. Los granos fueron teñidos con azul de anilina y un tinte doble, a base de lignina rosa y carmín acético. Utilizaron la terminología de Erdtman (1952) para efectuar la descripción morfológica. Las mediciones de los granos de polen se realizaron sobre fotografías capturadas desde el microscopio a 400x, utilizando el programa Motic Images Plus 2.0. Los parámetros que tomaron en consideración fueron el número, posición y tipo de aberturas, el índice del área polar (largo / ancho en vista polar), el tamaño (longitud del eje polar), y la forma del polen (eje polar (P) / diámetro ecuatorial (E) en vista ecuatorial), (García, Rivero, & Droppelmann, 2015).

García y colaboradores (2015), obtuvieron que los granos de polen de *N. nervosa* son isopolares, radiosimétricos, mónadas, microespinulados, colpoaperturados, circulares a semiangulares; además encontraron diferencias significativas en el tamaño de los granos, observando variaciones en el diámetro de 39,70 μm a 60,30 μm , con un promedio de siete aperturas por grano. Los colaboradores clasificaron los granos de polen como poli-zonocolpados, según el número, posición y tipo de aperturas, determinando que el tamaño de los granos de polen va de mediano a grande.

En Pakistán se analizó mediante ML y MEB, 14 especies representantes de 12 géneros de la subfamilia Coryphoideae. Las muestras fueron fijadas con alcohol 70% y montadas en glicerina - gelatina con 1% de safranina. Se cuantificaron características de número de apertura (colpos), tamaño y ornamentación de la exina. Para la observación en MEB, los granos se suspendieron en agua, se metalizaron con oro y se dejaron secar. Los granos fueron clasificados como monocolpados y reticulados, con tamaño variable (Rashid, Perveen & Abid, 2017).

Además, investigadores brasileños utilizaron 18 especies de la familia Bromeliaceae, para caracterizar morfológicamente los granos de polen. Los granos fueron fijados con la solución de Karnovsky y posteriormente deshidratados con etanol. Los granos fueron metalizados con oro para su análisis en MEB. Los granos fueron clasificados como de tamaño medio a grande, con simetría bilateral, diporado, tectado, con lado convexo y otro más plano; siendo estas las características comunes entre los especímenes estudiados (Souza *et al.*, 2017).

En Brasil se caracterizó el polen de 19 especies del género *Alcantarea*, para lo que utilizaron 43 especímenes. Las muestras fueron medidas en ML por medio de un micrómetro ocular. Los granos fueron clasificados como heteropolares, elipsoidales, algunos esferoidales, monosulcados con ornamentación reticulada de la exina. Los resultados obtenidos fueron utilizados para mejorar la comprensión de la palinotaxonomía infragenérica, así como contribuir en los análisis filogenéticos que confirman la relación entre las especies del género (Dos Santos, Versieux, Lapa-Wanderley & Pinto Da Luz, 2018).

En Brasil, investigadores clasificaron morfológicamente el polen de 12 especies nativas de la familia Rutaceae. Analizaron en ML y MEB el polen de 20 especímenes. Los granos de polen fueron preparados por acetólisis y se observaron 25 granos de cada muestra, a los cuales se les midió el diámetro. El polen fue clasificado como mónada, apolar o isopolar, con tamaños que van de pequeños a grandes, de forma circular a subcircular, oblato-esferoidal, tricolporado o tetracolporado, con exina reticulada o estriada (Dutra & Gasparino, 2018).

En un estudio equiparable realizado en Colombia y Costa Rica, se trabajó con *Lippia alba*. La caracterización del polen se llevó a cabo en microscopio de luz (ML) y en microscopio electrónico de barrido (MEB). Las muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 2% en buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.2 y la post-fijación fue hecha con tetróxido de osmio OsO₄ durante 24 horas, para posteriormente deshidratarlas con alcohol 10, 25, 50, 70, 90, 100%, por 20 min y después se realizó secado de punto crítico. Los granos se metalizaron con oro - paladio. Se identificó que los granos tienen tres aperturas (triaperturados) que por localización se clasifican los granos en zonoaperturados; además se determinó que las aperturas son compuestas (formadas por colpo y por poro), haciendo al grano tricolporado, además de ser tectado (Muñoz, Caetano, Vallejo & Sánchez, 2006).

En otra investigación, la sección de Biología Forense del Departamento de Ciencias Forenses del OIJ, por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB) se realizó la caracterización morfológica del polen de 25 especies diferentes, pertenecientes a las familias: Acanthaceae, Adoxaceae, Amaryllidaceae, Apiaceae, Apocynaceae, Asteraceae, Bignoniaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Myrtaceae, Passifloraceae, Rubiaceae y Verbenaceae. El objetivo de la investigación fue construir un protocolo para manipular las muestras de polen y así lograr resultados confiables para identificar taxonómicamente muestras cuestionadas que lleguen al laboratorio (Oliva, 2013).

1.2 Justificación

El polen es capaz de brindar información importante acerca de los aspectos biológicos de las plantas, lo que permite el avance de la biotecnología vegetal. Debido a que está ligado a la reproducción sexual de las diferentes especies vegetales, es esencial conocer sus aspectos biológicos para generar entrecruzamientos exitosos que produzcan abundantes semillas.

En el estado de madurez el polen presenta una morfología definida que permite identificar a que especie pertenece, ya que estos caracteres por lo general, son constantes dentro de una misma especie, lo que conlleva un alto valor taxonómico y filogenético (García *et al.*, 2015). Al conocer las características morfológicas del polen se podría realizar una selección temprana de las líneas vegetales, asegurando mayor éxito en el mejoramiento de las hibridaciones (González *et al.*, 2002).

Cuantificar el tamaño del grano de polen de una especie y compararlo con los datos obtenidos entre los clones de la misma especie es preciso para determinar si existe variación entre los clones (estadísticamente existe variación), ya que esta información revelaría que el tamaño del grano es un factor asociado a un marcador morfológico variable entre genotipos; es decir, que se puede hacer un reconocimiento de la presencia de diferentes genotipos en una plantación, con solo analizar el polen bajo el microscopio, sin necesidad de realizar pruebas moleculares a los ejemplares adultos. En el caso de que el coeficiente de variación sea positivo dentro de los clones, se tendría que en un mismo genotipo existen células (granos de polen) con características mejores que otras, lo que podría utilizarse para realizar cultivo de células.

Teca es una especie forestal de interés nacional e internacional, debido a la producción de maderas duras. En Costa Rica se cuenta con 31 500 ha de plantación; sin embargo, no se ha estudiado exhaustivamente (Fernandez-Moya, Alvarado, Fallas, Miguel-Ayánz & Marchamalo-Sacristan, 2017). Por otra parte, melina cuenta con gran potencial energético para utilizarse como biomasa, pero no se cuenta con la información suficiente (Tenorio, Moya, Arias-Aguilar & Briceño-Elizondo, 2016).

La madera de teca por su solidez, resistencia, trabajabilidad y calidades estéticas es considerada una de las más valiosas para el mercado de la mueblería, construcciones navales, muelles o atracaderos, puentes y compuertas en agua dulce, durmientes de ferrocarril, piso de parket, postes de líneas de transmisión eléctrica y de cercas, instrumentos musicales y juguetes (Fonseca, 2004; Keogh, 2013). Es una especie arbórea de gran interés económico, que representa el 4% de toda la madera que se comercializa en todo el mundo y conocida principalmente por su calidad en el mobiliario y la industria naval (Alcântara, Ortega, & Souza, 2016).

Por el valor de su madera, la teca fue introducida en Costa Rica por la compañía bananera en los años 50's, en la zona de Parrita (Pacífico Central), donde alcanza alturas superiores a los 35 m en los mejores sitios. Los mejores crecimientos se dan en altitudes menores a 500 msnm, con una estación seca marcada de 3 a 6 meses, entre 23 y 27 °C de temperatura y una precipitación de 1300 a 2500 mm/año (Fonseca, 2004). En Latinoamérica, el primer programa de mejoramiento genético de teca se dio, probablemente, en Trinidad y Tobago con la participación de científicos británicos (Keogh, 2013). Como en todos los programas de mejoramiento de árboles, el crecimiento y el rendimiento se convirtieron en componentes esenciales de todos los programas de mejoramiento conocidos mundialmente (Murillo, Wright, Monteuis & Montenegro, 2013).

Por su parte, la melina tiene gran importancia en nuestros países debido a su tasa extraordinaria de crecimiento y rendimiento en plantación (Rojas-Rodríguez *et al.*, 2004). Desde su introducción en Costa Rica a finales de los años 60's, su aceptación en el mercado local ha venido en aumento. Se considera como la principal especie para la producción de tarimas, pero las bondades de su madera le han permitido incursionar en numerosos productos de construcción hasta la industria del mueble (Barrantes & Ugalde, 2013). A inicios de los años 90's, algunas empresas reforestadoras como Stone Forestal en Costa Rica y Simpson Company en Guatemala, desarrollaron programas de mejoramiento genético a escala comercial, estableciendo los primeros huertos semilleros en la región (Alfaro & De Camino, 2002; Murillo, 1992; Zeaser, 1998). En los últimos años, GENFORES continuó con los programas de mejoramiento genético de melina en Costa Rica, basado en una estrategia clonal (Chacón & Murillo, 2005). La melina fue la especie de mayor producción en los viveros forestales de Costa Rica en el 2012 y

posiblemente la de mayor reforestación nacional, con cantidades cercanas a los 2,5 millones de plantas (Murillo & Guevara, 2013).

Debido a estos avances se ha llegado a un nuevo desafío científico-tecnológico en relación con el salto hacia la segunda generación de mejoramiento genético de teca y melina (Murillo *et al.*, 2013). Para esto, se requiere desarrollar un programa de cruzamientos controlados entre los genotipos de mejor desempeño (hibridación), con el fin de alcanzar la mayor ganancia genética posible (variación). Sin embargo, esto no será posible sin el desarrollo de capacidades para el manejo del polen de los materiales seleccionados.

El conocer las características morfológicas del polen de una especie de interés permite reconocer rasgos que determinen marcadores genéticos, además de poder inferir si entre variedades distintas dentro de la misma especie en la misma o diferente plantación existen diferencias que favorezcan a las siguientes generaciones, sin necesidad de ir al campo a seleccionar ejemplares adultos, lo que se resume en una selección temprana de caracteres que se quieren obtener en los próximos híbridos con solo observar y clasificar el polen al microscopio de luz. Sin embargo, el polen de diversas especies, incluyendo *Tectona grandis* y *Gmelina arborea*, no ha sido estudiado a profundidad, por lo que se desconoce si estas especies presentan una morfología específica y característica, que permita identificarlos taxonómicamente, así como tampoco hay estudios que determinen las diferencias que puedan existir respecto al tamaño de los granos de polen al comparar diferentes organismos pertenecientes a la misma especie.

Caracterizar morfológicamente es importante principalmente porque brinda descriptores, caracteres y singularidades propios de las familias, géneros o especies vegetales, lo que es útil en la taxonomía. También sirve como base para estudios de conservación y mejoramiento de las diversas especies vegetales. Además, los estudios de viabilidad polínica pueden complementarse con la descripción morfológica para definir rasgos que pueden servir de marcadores genéticos y así generar y apoyar programas de mejoramiento con el fin de preservar características de interés en los nuevos híbridos (Souza *et al.*, 2017).

Algunos investigadores se han interesado en comprender más profundamente la morfología del polen de ciertas familias, debido a que determinados caracteres pueden contribuir a los estudios filogenéticos, estos descriptores podrían brindar información que ayude a comprender de manera más clara la sistemática de los taxones (*Rashid et al.*, 2017). Esta información es útil en estudios ecológicos y paleoecológicos que deseen determinar cómo ha sido la riqueza y diversidad vegetal en determinada zona, a través del tiempo. Además, en el campo de la biología forense también es de utilidad, ya que, por las estructuras de la ornamentación de la exina, el polen es una evidencia traza que se adhiere fácilmente a diversos soportes, además, las plantaciones de teca y de melina son escenas del crimen frecuentes, por lo que conocer la morfología de los granos de polen de teca y melina puede ayudar a identificar indicios traza que lleguen al laboratorio y de esta manera relacionar plantaciones forestales como posibles sitios del suceso.

Los estudios taxonómicos son útiles para determinar filogenias moleculares, que permitan relacionar especies y clasificarlas dentro del mismo género. Debido a esto investigadores interesados en la biodiversidad actual y la pérdida de ambientes naturales se han interesado en los estudios de morfología del polen, con el fin de caracterizar los remantes de especies nativas que queden en las zonas amenazadas por el endemismo y así poder llevar a cabo programas para proteger y conservar las especies prioritarias de las áreas en riesgo y poder con esto preservar la biodiversidad endémica (Dutra & Gasparino, 2018).

Esta investigación pretende realizar una caracterización que permita identificar a nivel de especie el polen de teca (*Tectona grandis*) y de melina (*Gmelina arborea*), por medio de particularidades morfológicas como forma, tamaño, número y posición de las aberturas y otras singularidades específicas del polen de cada especie, con el fin de seleccionar de forma temprana las características más favorables y así poder proceder en un futuro a realizar mejoramiento genético.

1.3 Planteamiento del problema

Debido a la poca información que se tiene acerca del polen de teca y melina, respecto a los aspectos de morfología externa y tamaño de los granos de polen, resulta imposible determinar caracteres que sirvan de marcadores genéticos, o saber a partir de cuales individuos podrían obtener las mejores plántulas, sin tener que ir al campo a observar ejemplares adultos, por lo que en la siguiente investigación se pretende responder a la interrogante: ¿Cuál es la morfología y el tamaño de los granos de polen de diferentes genotipos de teca y melina?

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Desarrollar criterios para la selección temprana de genotipos promisorios de teca (*Tectona grandis*) y melina (*Gmelina arborea*) con fines de mejoramiento genético basados en características morfológicas del polen observables al microscopio de luz.

1.4.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar morfológicamente los granos de polen de teca y de melina, por medio de microscopía de luz.
2. Establecer si existen diferencias en el tamaño de los granos de polen intra y entre genotipos (clones), mediante su medición y posterior análisis estadístico.
3. Determinar si la forma y el tamaño del grano de polen se correlacionan y constituyen características propias de cada genotipo (clon), de tal forma que permita una selección temprana de los materiales.

2. Marco Teórico

2.1 Polen

Por medio del proceso conocido como polinización, el polen (gameto masculino) se transporta de las anteras al estigma de la flor (Florez, 2013). El polen se produce en pequeñas cantidades y se asocia con el néctar (Giovanetti, Ramos & Máguas, 2018). En la naturaleza es recogido por las abejas melíferas, las cuales lo aglutinan por medio de sustancias salivares en conjunto con el néctar. Sin embargo, actualmente debido a la creciente demanda de productos apícolas ha incrementado la producción de polen, como una alternativa alimenticia, promoviéndolo como un producto con propiedades terapéuticas debido a su alto nivel nutricional. En su composición, el polen presenta proteínas, lípidos, azúcares, fibras, minerales, aminoácidos y vitaminas, que lo hacen idóneo para su comercialización (Libonatti *et al.*, 2017).

La palinología es una herramienta botánica que se dedica al estudio del polen y las esporas, principalmente en los aspectos morfológicos externos. El análisis de caracteres como tamaño, forma, ornamentación, simetría, contorno y número de aperturas, es de gran valor taxonómico ya que permite clasificar los granos a nivel de familia, género y en algunos casos especie. Por otra parte, la información brindada en estudios de palinología es útil en ensayos ecológicos, ya que puede relacionar los factores climáticos con el ciclo de vida vegetal (fenología). Además, esta herramienta aporta indicadores geológicos y paleoecológicos del registro fósil, ayudando a identificar cómo han sido los ecosistemas a lo largo del tiempo en cuanto a la flora presente. También permiten identificar la dispersión que puede alcanzar determinada especie en el espacio, lo que actualmente es útil en el campo forense (Farfán-Santillán, Mendoza-Ruiz, Pérez-García & Velázquez-Montes, 2016; Nora, Albaladejo, Martínez, Robledo-Arnuncio & Aparicio, 2011).

La función biológica de los granos de polen es transportar los gametos masculinos desde las anteras (estambres), hasta el estigma (gineceo), con la finalidad de garantizar la

viabilidad y el desarrollo del gametofito masculino. Los granos de polen están provistos de esporodermis que es una cubierta sumamente resistente a la destrucción y con una morfología muy característica que permite identificar la planta que produjo dicho polen (Gutiérrez, Pérez & Cervigón, 2015). Debido a esto, es una prioridad conocer los aspectos de la biología del polen para comprender la reproducción vegetal (García *et al.*, 2015), así como los procesos meióticos, ya que en estos se basa la variabilidad genética (Muñoz, Caetano, Vallejo & Sánchez, 2006).

2.1.1 Formación del polen

Microesporogénesis: este proceso inicia en la meiosis y finaliza con la formación de microesporas haploides. Las células esporógenas son capaces de dividirse previamente a la microesporogénesis o también de manera directa pueden dar origen a las células madres del polen (CMP) o a los microesporocitos. Cuando los microesporocitos entran en meiosis se obtienen tétradas de microsporas haploides (n), estas cuentan con gran cantidad de ribosomas y un sistema membranoso interno extenso. En gran variedad de plantas, las CMP contienen plasmodesmos que las interconectan. Sucede una desintegración de las paredes celulares originales y los microesporocitos toman formas esféricas. Se forman extensos puentes citoplasmáticos que reemplazan los plasmodesmos, encargados de interconectar los microesporocitos por medio de los depósitos de calosa formados durante la profase meiótica. Estos puentes están conformados por canales que transportan y distribuyen nutrientes y reguladores de crecimiento. Antes de la finalización de la meiosis II, se desintegran las interconexiones celulares, por lo que la tétrada de microsporas haploides queda completamente aislada de las demás tétradas del lóculo (Flores, 1999).

Según el tipo de citocinesis, la microesporogénesis puede seguir dos patrones distintos. El tipo sucesivo es usual en las monocotiledóneas y se determina por la formación centrifuga de la placa celular, al completarse la meiosis. Las tétradas de microsporas que se producen en este tipo de citocinesis son tetraédricas o isobilaterales. El tipo simultáneo, se caracteriza porque después de la meiosis I no se forma pared sino un fragmoplasto. Al finalizar la meiosis II, se producen fragmoplasto entre los cuatro núcleos y desde la pared del microesporocito se despliegan constricciones centrípetas que se extienden y unen en

el centro, originando paredes de calosa que separan las microesporas de la tétrada. Este tipo de citocinesis es común en las dicotiledóneas (Flores, 1999).

Microgametogénesis: por medio de la mitosis del polen I la microespora unicelular se divide asimétricamente, originando una célula vegetativa (CVT) grande y una célula generatriz (CG) más pequeña, las cuales son determinante en el desarrollo del grano del polen, el cual consta de varios estadios. El periodo de tétrada consiste en cuatro microsporas rodeadas de una pared de calosa, de la cual salen con una delgada capa de exina. Esta microespora es esférica, con citoplasma denso, sin vacuola y con un poro visible. En el periodo de vacuolización se forma una vacuola esférica con crecimiento constante, que se divide en varias vacuolas pequeñas, antes de que inicie la mitosis. En el periodo de maduración temprana, la microespora se transforma en un grano de polen y posteriormente en el periodo de maduración tardía se da la mitosis del polen II y se obtiene el polen bicelular (Flores, 1999).

2.1.2 Taxonomía

Diversos estudios sobre los compuestos bioquímicos presentes en los granos de polen permitieron crear una biblioteca de espectros para gran cantidad de especies, que sirve para comparar una muestra contra un patrón en esta biblioteca (base de datos) y así identificar a cual planta pertenece la muestra de polen (Depciuch, Kasprzyk, Roga & Parlinska-Wojtan, 2016). Además, se incluyen los aspectos morfológicos específicos de la exina que presentan alto nivel taxonómico (Barrios *et al.*, 2005).

2.1.3 Morfología

En la mayoría de las especies de angiospermas el polen es mónada (célula libre); sin embargo, hay familias que presentan granos compuestos como tétradas (de cero a cuatro granos) o poliadas - polinia (8,16,32, 64 o más granos). Genéticamente se establece la forma del grano de polen según la posición de las microesporas en la tétrada, el número y disposición de las aberturas germinales y, por la expansión celular que ocurre durante el desarrollo del polen (Flores, 1999).

La pared del polen se conforma por una capa de esporopolenina que es externa y ornamentada (exina) y una capa gruesa de polisacáridos lisa e interna (intina). Ambas capas se diferencian entre ellas morfológica, ontogénica y químicamente. La esporopolenina es resistente a la biodegradación. La exina está compuesta por varias capas, primero el tectum (en algunos casos no está presente), bácula y nexina (una capa basal y otra más interna). Además de la exina tectada, hay otro tipo, la pilada que consta de una capa superficial abierta. Por otra parte, la intina queda casi expuesta en las aperturas germinales, donde la exina es muy reducida (Flores, 1999).

Las aperturas germinales están determinadas por la distribución de las microesporas en la tétrada y por el punto de contacto entre las esporas. Las aperturas pueden ser poros o depresiones. Según el tipo de apertura el polen se clasifica en sulcado o colpado. En el polen sulcado las tangentes a las depresiones se ubican en el medio de las depresiones y son paralelas al plano ecuatorial del polen. En el polen colpado las tangentes son perpendiculares al ecuador (Figura 1), (Flores, 1999).

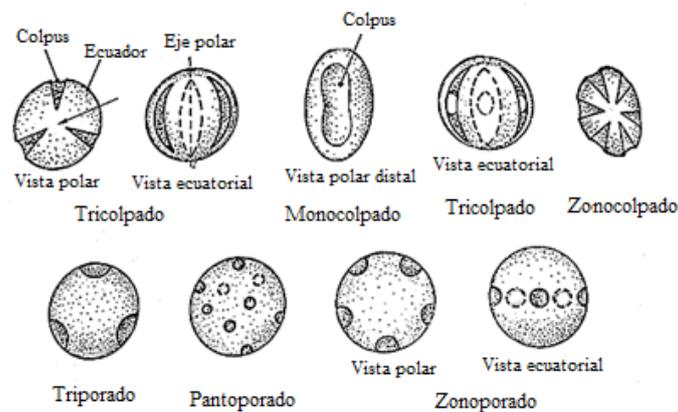


Figura 1. Diferentes tipos de polen (Flores, 1999).

Los granos de polen pueden clasificarse por la forma del grano en prolado, esferoidal y oblado (Figura 2); y según el número y disposición de las aberturas, tomando en cuenta si son poros o colpos, los granos pueden ser inaperturado, monocolpado, diporado, tricolporado, tetraporado, pericolporado, entre otras (Figura 3). Por su parte las aberturas se clasifican en simples si solo presentan un poro o un colpo, y en compuestas si son un poro y un colpo, dos poros o dos colpos (Figura 4), (Belmonte & Roure, 2002).

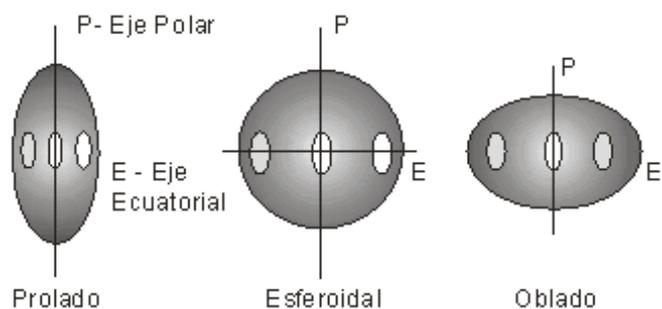


Figura 2. Formas de los granos de polen (Belmonte & Roure, 2002).

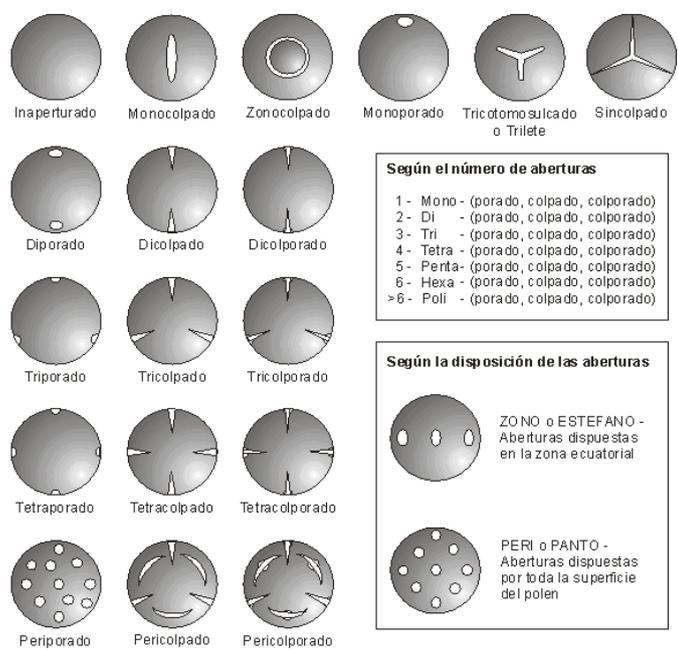


Figura 3. Tipos polínicos según el número y disposición de las aberturas (Belmonte & Roure, 2002).

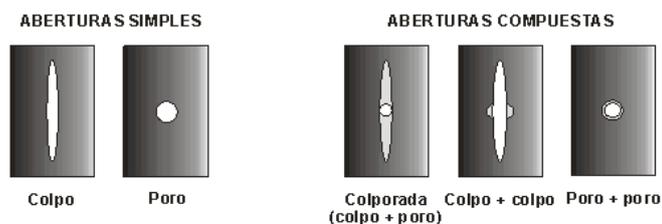


Figura 4. Tipos de aberturas de los granos de polen (Belmonte & Roure, 2002).

2.1.4 Tamaño

El tamaño de los granos también es un dato importante y que ofrece información taxonómica. Los granos de polen que presentan un tamaño menor a 10 μm son considerados muy pequeños, si el tamaño se encuentra en un rango de 10 - 25 μm son pequeños, de 25 - 50 μm son granos medianos, 50 - 100 μm grandes, 100 - 200 μm muy grandes y si sobrepasa los 200 μm se dice que son granos gigantes (Belmonte & Roure, 2002).

Los descriptores morfológicos presentes en el polen se identifican por medio de microscopía de luz. Los granos de polen se miden por lo general con un micrómetro ocular. Los granos se colocan en vista ecuatorial, de donde se obtienen los siguientes diámetros: ecuatorial (EE), el del eje polar (EP) y el de las lúminas (EL), además del ancho de los muros que conforman el retículo (AM). Por otra parte, en la vista polar se mide el diámetro ecuatorial en vista polar (DE) y el apoporo (AP). Después de esto se calcula el índice polar (P/E) para evaluar la forma del grano. El índice del área polar o índice del apocolpio (IAP), se obtiene de AP y EP. El tamaño del grano se define por el eje polar (Barrios *et al.*, 2005). Estos descriptores fueron inicialmente detallados en el libro “Pollen morphology and plant taxonomy” (Erdtman, 1986).

2.1.5 Viabilidad

La viabilidad del polen depende en gran parte de las condiciones ambientales, por lo que la esterilidad en los granos de polen de determinada zona puede utilizarse como un biomarcador de contaminación ambiental antropogénica. La esterilidad del polen se correlaciona con la presencia de plomo (Pb), zinc (Zn) y níquel (Ni) en el ambiente, además de ser un factor que se obtiene debido a alteraciones en la meiosis (Sluchyk, Sluchyk & Shyichuk, 2014). La contaminación del aire provoca la disminución de la viabilidad y producción del polen, además de la generación de granos de polen más pequeños y/o deformes (Depciuch *et al.*, 2016).

2.2 Teca (*Tectona grandis*)

Tectona grandis es un árbol que pertenece a la Clase Equisetopsida, Subclase Magnoliidae, Superorden Asteranae, Orden Lamiales, Familia Lamiaceae y al género *Tectona*, conocido comúnmente como teca. Este árbol puede tener una altura superior a los 50 m, con un diámetro del tronco de hasta 2 m. Presenta una corteza marrón áspera y fisurada, con ramas grandes y delgadas. Las hojas son opuestas, con 11 - 85 cm de largo y 6 - 50 cm de ancho, los peciolo son gruesos y membranosos. Presentan flores con cáliz campanulado amarillo verdoso, el estilo y el estigma son blanco amarillento. Los frutos son aplanados con un exocarpo delgado (Guerra-Centeno, Valdez-Sandoval, Orozco-Acevedo & Fuentes-Rousselin, 2016).

La teca es originaria de la india, del sureste asiático, Malasia, Java, República Democrática Popular Laos y Tailandia (Borja, 2014), pero ha sido introducida en México y Centroamérica, principalmente en zonas de bosque seco. Para que la teca crezca óptimamente requiere de climas cálidos y húmedos tropicales, con un periodo seco de 3 a 5 meses. Comúnmente es utilizada con propósitos maderables (Guerra-Centeno *et al.*, 2016). Además, teca es una especie de fácil propagación vegetativa (Murillo, Espitia & Castillo, 2012).

En Costa Rica, las primeras plantaciones de teca datan de 1926 y 1929, y se reporta que los mayores crecimientos de teca se dan a menos 500 msnm, en zonas con estación seca de cuatro a seis meses, con temperaturas de 23 a 27 °C y con precipitaciones de 1300 a 2500 mm/año. La teca ha sido plantada en zonas de bosque tropical seco de Guanacaste y de bosque tropical húmedo de la zona norte, atlántica, pacífico central y sur del país (Fonseca, 2004).

Debido a la solidez, resistencia, facilidad de trabajo y calidad estética, es ampliamente utilizada en construcciones, ebanistería, elaboración de muebles, pisos, instrumentos musicales, juguetes y sistemas agroforestales como barrera viva, control de la erosión, conservación de los suelos, combustible en forma de leña y carbón vegetal, convirtiéndose en la madera tropical más solicitada y valiosa (Borja, 2014). Además, por la alta calidad de su fina madera, durabilidad, atractivo estético y su resistencia al ataque

de hongos e insectos por medio de aceites naturales, es estimada una de las maderas más valiosas (Fonseca, 2004).

2.3 Melina (*Gmelina arborea*)

Gmelina arborea es un árbol que pertenece a la misma familia que la teca y es conocido comúnmente como melina. Puede medir hasta 30 m de altura y más de 80 cm de diámetro. En campos abiertos exhibe una copa amplia, sin embargo, en plantaciones tiene una copa compacta y densa. La corteza es marrón a grisácea y puede ser lisa o escamosa. Las hojas son de 10 a 20 cm de largo, simples y opuestas, pueden ser enteras o dentadas. Presenta numerosas flores amarillo-anaranjadas, monoicas, perfectas, en racimos y con cáliz tubular. El fruto es ovoide u oblongo, carnoso y succulento, con pericarpio coriáceo y endocarpio óseo. Al madurar el fruto es amarillo brillante (Guerra-Centeno *et al.*, 2016).

La melina es nativa del sureste asiático, sin embargo, actualmente ha sido introducido en varios países, entre ellos; Costa Rica, Colombia, Brasil y Nicaragua. Habita en bosques seco tropical, húmedo tropical y muy húmedo tropical, sin embargo, resiste periodos de sequía. Comúnmente es utilizado para la producción de papel y con fines maderables (Guerra-Centeno *et al.*, 2016), ya que debido a su alta capacidad de renovación y transformación de la madera es una de las especies de mayor potencial comercial (Avila & Betancourt, 2014).

En 1966, se estableció en la zona atlántica, la primera plantación de melina en Costa Rica. A partir de ahí la melina ha sido utilizada para reforestar, debido a que tiene una rotación corta de un periodo de 10 a 12 años, además de su buen desarrollo silvicultural, alcanzando 49 300 hectáreas de plantación para 1997, lo que correspondía al 22% del área total reforestada del país. Por consiguiente, la empresa Celulosa de Turrialba, Ston Forestal, Maderas Cultivadas de Costa Rica S.A y el Centro Agrícola Cantonal de Hojancha han implementado proyectos de reforestación nacional (Rojas-Rodríguez *et al.*, 2004).

La madera de melina es versátil y excelente en la elaboración de productos de calidad de mediano a alto valor, siendo una de las maderas de mayor uso industrial y doméstico, debido a que es suave, sedosa y fácil de trabajar. Se utiliza en tarimas, muebles, artesanías, embalajes, postes, tableros, carpintería, pisos, molduras, tablillas, y muchos otros y variados productos. Es tan ampliamente utilizada debido a que presenta un rápido crecimiento (Avila & Betancourt, 2014).

2.4 Mejoramiento genético vegetal

La variación genética se relaciona con características ecofisiológicas y funcionales que determinan las tasas de crecimiento y productividad. La variación genética se basa en la plasticidad fenotípica, que se define como la capacidad de un organismo de responder a los cambios ambientales generando diferentes fenotipos, relacionado con la interacción genotipo-ambiente (Lobo, 2006; Valladares, Wright, Lasso, Kitajima, & Pearcy, 2000; Villamizar, Rodríguez, & Terraza, 2012).

Se conoce como premejoramiento a la ampliación de la base genética, la determinación del germoplasma, la transferencia de atributos importantes y a todas las demás acciones realizadas antes de llevar a cabo el mejoramiento, en fin, es la incorporación de los genes asociados a las características de interés. Al material genético que aporta unidades heredables se le define como recurso genético y en específico se habla de recursos fitogenéticos, cuando el material es de origen vegetal y aporta valor a la alimentación y a la agricultura. El fitomejoramiento depende de la riqueza genética, ya que es esencial para reducir la vulnerabilidad ante plagas y enfermedades, aumentando el rendimiento de los cultivos y asegurando la alimentación mundial (Lobo, 2006).

La variación genética es la materia prima para que ocurra la evolución de los organismos vivos, ya sea de manera natural o dirigida por el hombre realizando combinaciones de genes por medio de hibridaciones y mutaciones, con el fin de seleccionar características agronómicas de interés. Esta selección puede darse *in vitro* y estar orientada a la adaptación por medio de la tolerancia a los factores ambientales que permitan el cultivo masivo de la especie. Si este procedimiento se realiza sobre los

gametos se le conoce como variación gametoclinal (Gutierrez, Santacruz, Cabrera, & Rodriguez, 2003).

En el mejoramiento genético se debe seleccionar a los árboles parentales con rigor, ya que de la calidad de estos depende el éxito del programa de mejoramiento genético. Además, para obtener buenos resultados se debe tener un buen control genético de los caracteres de interés y de la variabilidad genética presente en la población. En los programas de mejoramiento se debe aumentar la frecuencia alélica favorable, para aumentar la expresión de las características deseadas; sin embargo, esto solo es posible para los caracteres cualitativos, aunque controlando el efecto de los factores ambientales, es posible manipular la heredabilidad (h^2), la cual explica que los genes con efectos aditivos son lo que pasan de una generación a otra. Esto con lleva al aumento del rendimiento, productividad y calidad de las cosechas forestales (Murillo, Espitia, & Castillo, 2012).

2.4.1 Mejoramiento del polen

En la actualidad se realizan diversos estudios para determinar la calidad del polen, debido a que esta influye directamente sobre la reproducción sexual del mismo. Al conocer la calidad del polen se podría realizar una selección temprana de las variedades que aseguren mayor éxito en el mejoramiento de las hibridaciones (González *et al.*, 2002).

La selección de granos de polen puede utilizarse no solo para generar plantas con características de interés por medio de la reproducción sexual, sino que en un medio de cultivo apropiado se puede inducir la formación de células vegetativas a partir de estos granos de polen, obteniendo proembriones o callos haploides, en un proceso llamado androgénesis. Este proceso además ayuda a evitar las complicaciones de compatibilidad del polen con la planta receptora (Gutierrez *et al.*, 2003). Además, para llevar a cabo la reproducción sexual vegetal con éxito, en condiciones del trópico cálido y húmedo, deben realizarse estudios exhaustivos sobre la calidad del polen, debido a que esta es proporcional al éxito de las hibridaciones, lo que asegura un incremento en la eficiencia del mejoramiento (Araméndiz, Cardona & Lugo, 2012; González *et al.*, 2002).

Seleccionar polen con el fin de generar variación y a su vez mejoramiento genético ha llevado a la obtención de granos con resistencia a temperatura, salinidad, metales, herbicidas y otros compuestos tóxicos (Gutierrez *et al.*, 2003) en rangos o concentraciones que resultarían fatales para granos de polen silvestres, reduciendo costos al disminuir la pérdida de algunos cultivos o que la polinización sea insatisfactoria, además de ayudar a conservar el polen con características favorables y que representen una ventaja a los organismos vegetales.

Al final se obtienen plantas conocidas como estirpe, que son entidades genéticas activas capaces de donar o recibir genes de sus ancestros silvestres, es decir un incremento en la variación genética que le confiere una ventaja al individuo híbrido. A este proceso de flujo de genes entre especies cultivadas y silvestres se le conoce como introgresión (Gutierrez *et al.*, 2003).

También se puede realizar la restauración de la fertilidad del polen por medio de la introgresión de genes de una determinada especie en los diferentes híbridos de interés, esto se realiza con el fin de aumentar la capacidad de germinación (Barba, 2016).

3. Marco Metodológico

3.1 Recolección del polen

El área de estudio corresponde a las instalaciones de la empresa Novelteak Costa Rica S.A, miembro de la cooperativa GENFORES, ubicada en La Cruz, Guanacaste, Pacífico Norte de Costa Rica. Como material experimental se utilizó el polen proveniente de la colección de árboles *plus* (árboles de la plantación forestal que han sido seleccionados debido a sus características fenotípicas) de su programa de mejoramiento genético. Se seleccionaron árboles maduros establecidos en ensayos clonales con presencia de inflorescencias. La colecta del polen se realizó entre las 5:00 am y 7:00 am, de acuerdo con lo sugerido por otros autores (Ganeshan, Rajasekharan, Shashikumar & Decruz, 2008; Tangmitcharoen & Owens, 1997; Volk, 2011), con el fin de lograr obtener flores

sin apertura completa y facilitar la captura de polen fresco. Las panículas frescas se mantuvieron en una oficina fresca, donde se le colectaron flores sin abrir y se colocaron en bolsas plásticas con cierre hermético durante una hora para inducir su apertura. Una vez abiertas las flores se procedió a la extracción mecánica de las anteras con ayuda de unas pinzas.

Los análisis de muestras fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Forestal (LBF) del Instituto de Investigación y Servicios Forestales (INISEFOR) de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA), como parte del proyecto “Desarrollo de la segunda generación de mejoramiento genético de teca (*Tectona grandis* L.) y melina (*Gmelina arborea* Roxb.) en la Cooperativa GENFORES (0021-14) (2015-2019)”, desarrollando en forma conjunta con el equipo científico del ITCR y UNA.

3.2 Fijación y tinción de los granos de polen

Una vez extraídas las anteras, se pesó 0.1 g en canastas de papel, posteriormente se colocaron en cámaras de gel de sílice durante dos horas para deshidratar las anteras y facilitar la extracción del polen con ayuda del vórtex, separando el polen de las anteras, las cuales fueron desechadas y el polen se depositó en criotubos, que fueron introducidos en cámaras húmedas durante una hora para rehidratar los granos de polen y que así recuperen su forma normal. Seguidamente, los granos de polen se resuspendieron en 250 μL de agua destilada y 250 μL de acetocarmín. Finalizado el proceso, los criotubos con el polen fijado y teñido, fueron almacenados en refrigeración.

3.3 Caracterización morfológica de los granos de polen

La determinación de la morfología y el tamaño de los granos de polen de teca y melina según genotipo, fue mediante el análisis de 30 granos de polen con tres repeticiones, de cinco clones de teca (*Tectona grandis*) y melina (*Gmelina arborea*), previamente teñidos y fijados con acetocarmín al 1%, los cuales fueron observados en el microscopio de luz con cámara acoplada Modelo Nikon Eclipse 80i.

Se tomaron fotografías a un aumento de 400x, con ayuda del microscopio de luz, sobre las cuales se determinó visualmente las características morfológicas de los granos. Para la determinación morfológica se tomaron en cuenta los parámetros de número, posición y tipo de aberturas, así como la forma del polen (diámetro polar (P) / diámetro ecuatorial (E) en vista ecuatorial).

3.4 Determinación del tamaño de los granos de polen

La medición del tamaño de los granos de polen se realizó sobre fotografías capturadas con aumento 400x en el microscopio de luz, sobre las cuales se determinó el tamaño de los granos de polen (longitud del eje más largo en vista ecuatorial) tomando en cuenta el parámetro, índice del área polar o índice de apocolpio (L/A), (largo / ancho en vista polar). Lo anterior será basado en lo descrito por Flores (1999). Por medio del programa de la cámara Nikon Ds-fi-L2 del microscopio, se analizaron las fotografías y se determinaron valores de medición de cada grano, con los cuales se calcularán los parámetros mencionados anteriormente. En vista ecuatorial se realizaron las mediciones de los ejes polar y ecuatorial; y en vista polar se midieron la circunferencia, largo y ancho de 30 granos con tres repeticiones por clon. Se utilizó la escala de tamaño descrita por Erdtman (1986). Además, se desarrolló una tabla de tamaños para melina y una para teca, basándose en la menor y la mayor medición de los ejes polar y ecuatorial. A la medición mayor se le restó la menor y el resultado se dividió entre tres para obtener la amplitud entre cada tamaño (pequeño, mediano y grande).

3.5 Análisis estadístico

Se calculó la media, desviación estándar, valores mínimos y máximos, para los datos del tamaño de los granos de polen para cada réplica, por clon y por especie. Se determinó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk ($\alpha=0.05$). Se realizó el cálculo del error estándar de la media (es decir, el error debido a la estimación de la media poblacional, a partir de la media de la muestra) y el coeficiente de variación para cada clon y especie. La variación inter-genotípica fue explorada mediante la comparación del índice polar (forma) e índice del apocolpio o de área polar (tamaño) entre genotipos y

especie, a través de la prueba de Bonferroni. Finalmente, se realizó un análisis de correlaciones por el método de Spearman para todas las variables cuantificadas por especie.

3.6 Análisis genético

La información fenotípica de teca y de melina fueron analizadas por rasgo y se eliminaron los efectos ambientales por medio del software SELEGEN-REML/BLUP, con el fin de realizar correlaciones genéticas para cada variable por especie. Se calcularon parámetros de heredabilidad genética individual y media del genotipo, el coeficiente de variación genética individual y del genotipo, así como el promedio de los datos y la exactitud de los resultados, esto para determinar la confiabilidad de los resultados. El programa SELEGEN utilizó procedimientos de Máxima Probabilidad Restringida (REML) y el Mejor Predictor Lineal Insesgado (BLUP) para el análisis de datos y estimaciones de parámetros genéticos (Resende, 2016).

4. Resultados

4.1 Melina

4.1.1 Morfología

Los granos de polen de melina son mónadas y tricolpados, según el número y la posición de las aberturas (Figura 5), (Belmonte & Roure, 2002; Flores, 1999). Además, en general, según el índice polar (P/E) se encontró que los cinco clones poseen forma entre oblato y subesferoidal, en los cuales, en los valores mínimos predomina la forma tipo oblato y en los máximos la forma subprolato. Sin embargo, en el clon 3 la segunda réplica mostró valores mínimos suboblato y la tercer réplica valores máximos oblato esferoidal, en el clon 6 la primera y segunda réplica tuvieron valores máximos de forma prolato esferoidal, en el clon 7 la primer réplica en los granos más grandes se observó forma prolato esferoidal y la segunda réplica mostró en los granos más pequeños forma

suboblato, en el clon 38 en la segunda réplica los granos de valor máximo fueron prolato esferoidal y en el clon 114, en la tercer réplica las valores máximos fueron oblato esferoidal (Cuadro 1, Anexo 1), (Erdtman, 1986).

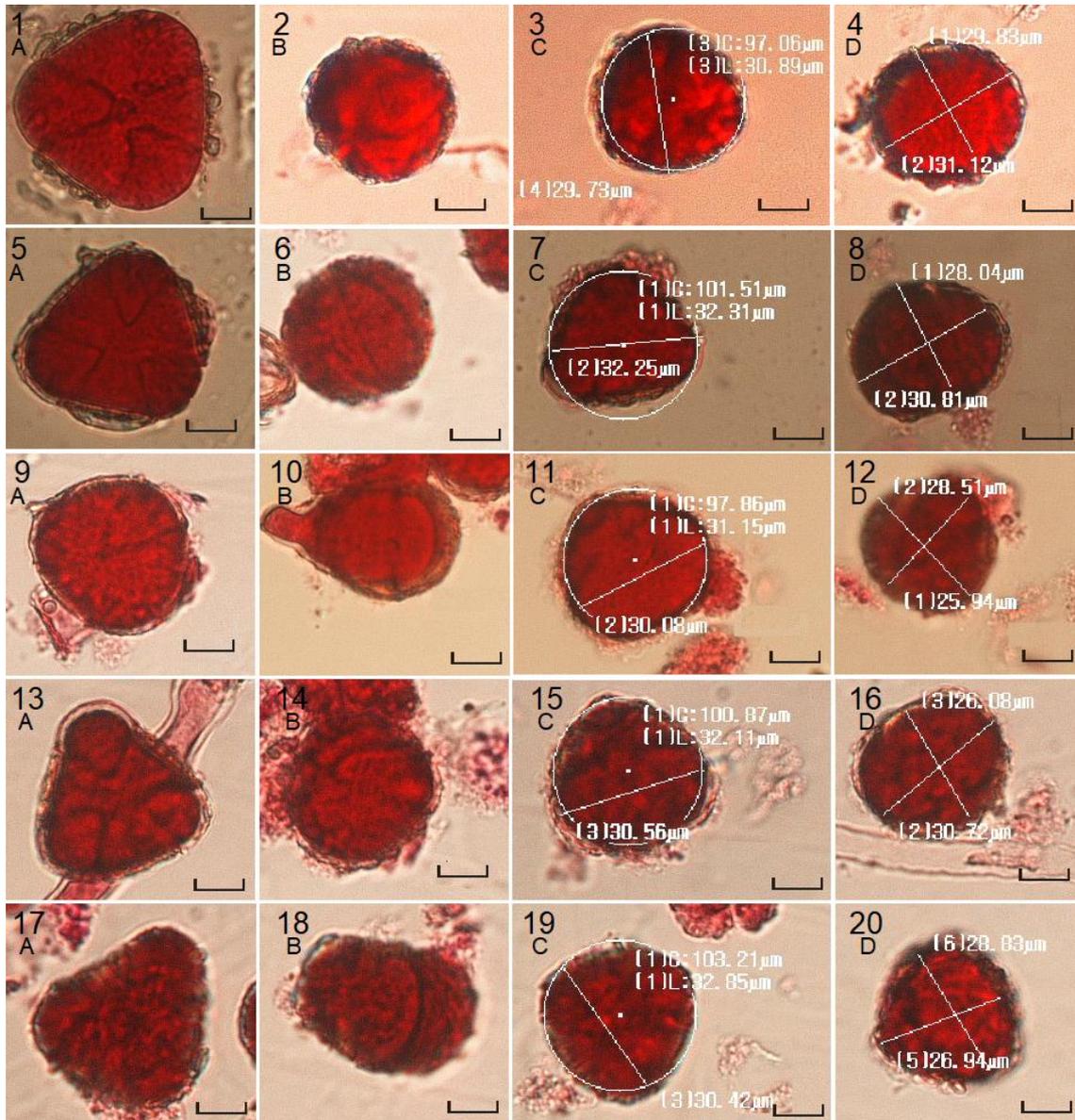


Figura 5. Granos de polen de melina vistos al microscopio de luz. Clon 3, imagen 1-4. Clon 6, imagen 5-8. Clon 7, imagen 9-12. Clon 38, imagen 13-16. Clon 114, imagen 17-20. A) grano de polen en vista polar, B) grano de polen en vista ecuatorial, C) grano de polen en vista polar con mediciones y D) grano de polen en vista ecuatorial con mediciones. Barras de escala: 10 µm.

Cuadro 1. Resultados de la media del eje polar (EP), eje ecuatorial (EE), índice polar (P/E), circunferencia (C), largo (L), ancho (A) y el índice del apocolpio (L/A); y sus respectivos errores estándar, obtenidos para los clones de melina.

Clon	3	6	7	38	114
EP (μm)	28.55 \pm 0.27*	27.35 \pm 0.26	26.08 \pm 0.34	27.19 \pm 0.29	27.67 \pm 0.30
EE (μm)	30.76 \pm 0.30	30.61 \pm 0.30	28.45 \pm 0.32	30.73 \pm 0.24	32.59 \pm 0.30*
P/E	0.94 \pm 0.01*	0.90 \pm 0.01	0.92 \pm 0.01	0.89 \pm 0.01	0.85 \pm 0.01
C (μm)	98.46 \pm 0.68	100.67 \pm 0.58	95.08 \pm 0.63	98.59 \pm 0.62	104.56 \pm 0.40*
L (μm)	31.34 \pm 0.22	32.04 \pm 0.18	30.27 \pm 0.20	31.28 \pm 0.22	33.28 \pm 0.13*
A (μm)	29.62 \pm 0.23	30.46 \pm 0.21	29.60 \pm 0.24	30.22 \pm 0.22	32.43 \pm 0.21*
L/A	1.06 \pm 0.01*	1.05 \pm 0.01	1.03 \pm 0.01	1.04 \pm 0.01	1.03 \pm 0.01

* Datos de mayor magnitud

4.1.2 Tamaño

4.1.2.1 *Tamaño entre genotipos de la misma especie*

En general los granos de polen de melina son de tamaño mediano según la longitud del eje más largo en vista ecuatorial (Erdtman, 1986), (Cuadro 1, Anexo 2); sin embargo, según el índice del apocolpio (L/A) son grandes (Cuadro 1, Anexo 3), (Huysmans, Robbrecht, & Smets, 1994). Los clones 3, 6 y 7 muestran tamaños de pequeño a mediano, según los valores mínimos y máximos del eje más largo en vista ecuatorial, aunque en la tercera réplica del clon 3 y 6 todos los granos fueron medianos; y en cuanto al tamaño de los granos de polen de los clones 38 y 114 solo se observaron datos que corresponden a medianos. Además, se observó que los clones 3 y 114 fueron los que obtuvieron las mediciones más altas en las diferentes mediciones (Cuadro 1, datos subrayados).

4.1.2.2 *Tamaño calculado para la especie*

La longitud de los granos de polen de melina va de 20 μm a 39 μm aproximadamente (Cuadro 2). Basado en el tamaño calculado para la especie se determinó que en promedio el polen de melina es mediano (Cuadro 1, Cuadro 2), pasando por tamaños pequeños en los valores mínimos y grandes en los tamaños máximos, con pocas excepciones. En la tercera réplica del clon 3 y del clon 114, los granos se mostraron de un tamaño un poco mayor, siendo la media grande, yendo de valores medianos a grandes.

Cuadro 2. Tamaño de los granos de polen de melina intraespecie, basado en la longitud del eje más largo.

Tamaño	Longitud (μm)
Muy pequeño	< 20
Pequeño	20 - 26.5
Mediano	26.5 - 33
Grande	33 - 39
Muy grande	> 39

4.1.3 Diferencias de forma y tamaño

Por medio de la prueba estadística de Bonferroni se determinó que para las mediciones del índice de forma (P/E), los clones 3 y 114 presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los demás clones, además el clon 6 y 7 son similares entre ellos y con el clon 38 (Figura 6). Por otra parte, el índice de apocolpio (L/A), el cual se relaciona con el tamaño de los granos de polen, mostró diferencias estadísticamente significativas entre el clon 7 y los clones 3 y 6; también el clon 3 es diferente al clon 114; sin embargo, los clones 3, 6 y 38 son similares entre ellos, así como el clon 7, 38 y 114 presentan semejanzas, igual que el clon 6 y 114 (Figura 7).

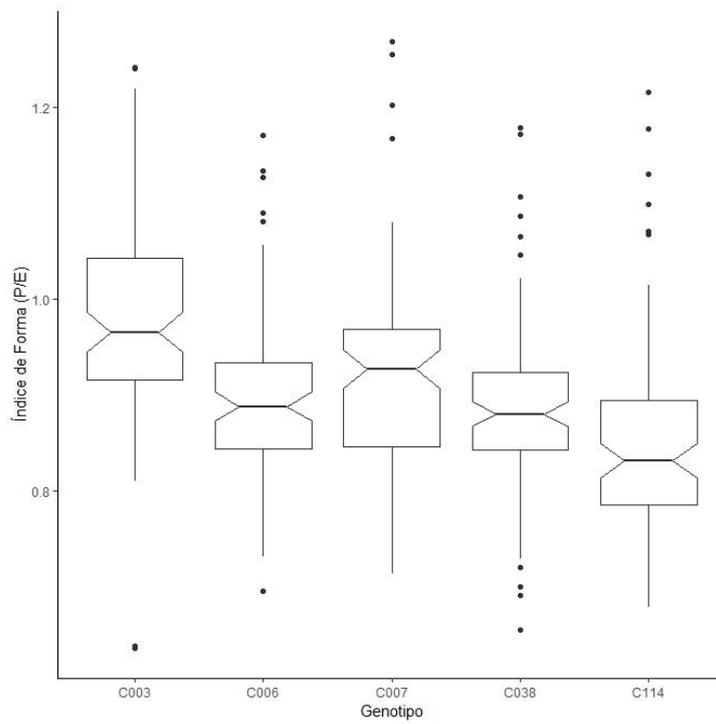


Figura 6. Índice de forma (P/E) de los cinco clones de melina*.

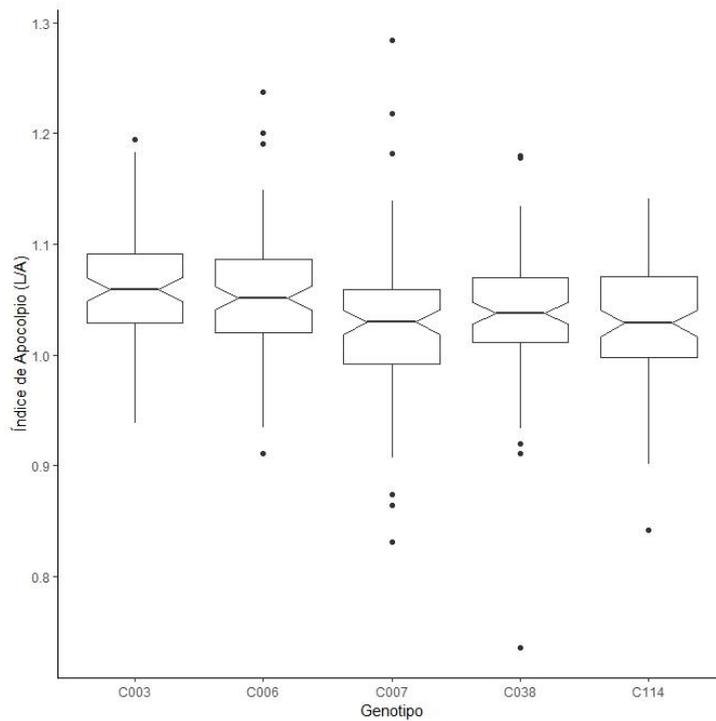


Figura 7. Índice de apocolpio (L/A) de los cinco clones de melina*.

* La muesca determina las diferencias entre clones, si dos muescas se superponen no hay diferencias significativas entre esos dos clones.

4.1.4 Coeficiente de Variación

En general el coeficiente de variación (CV) para melina fue alto en cuanto a las medidas del eje polar (10.52%), eje ecuatorial (9.99%) y el índice polar o de forma (12.22%); sin embargo, el CV fue medio para las mediciones de la circunferencia (6.40%), largo (6.51%), ancho (7.68%) y el índice de área polar o apocolpio (5.77%). Entre los clones se mantiene esta tendencia, con algunas excepciones. En cuanto al eje polar, el mayor CV lo obtuvo el clon 7 (12.27%) y el menor, el clon 3 (8.83%). Para las mediciones del eje ecuatorial el mayor CV se observó igual en el clon 7 (10.72%) y el menor en el clon 38 (7.35%). El índice de forma presentó una gran variación en todos los clones, siendo el mayor el clon 3 (12.77%) y el menor el clon 6 (10.00%). Por otra parte, la circunferencia obtuvo valores más diversos entre los clones, el mayor CV se mostró en el clon 3 (6.53%) y el menor en el clon 114 (3.60%). Las mediciones del largo se comportaron muy similar a las de la circunferencia, siendo el clon 3 (6.54%) el del mayor CV y el clon 114 (3.61%) el del menor. En el ancho los valores se mantuvieron más similares entre clones, observándose el valor más alto de CV en el clon 7 (7.74%) y el menor valor en el clon 114 (6.14%). Por último, el mayor CV en el índice del apocolpio fue mayor en el clon 7 (6.80%) y el menor en el clon 3 (4.72%). Basado en lo anterior cabe destacar que los clones 7 y 3, son los que presentan un mayor coeficiente de variación.

4.1.5 Correlaciones

4.1.5.1 *Correlaciones de rasgos morfológicos*

Según los resultados obtenidos al realizar la correlación estadística por el método de Spearman de los datos de melina, se determina que existe una débil correlación, pero estadísticamente significativa ($p < 0.001$: ***) entre la vista ecuatorial (eje ecuatorial) y la vista polar (circunferencia, largo y ancho), así como para las mediciones que fueron tomadas en la misma vista del grano de polen, hay asociaciones fuertes. Además, se

observa que no existe correlación significativa entre la forma de los granos (índice de forma P/E) y el tamaño (índice de apocolpio L/A) (Figura 8).

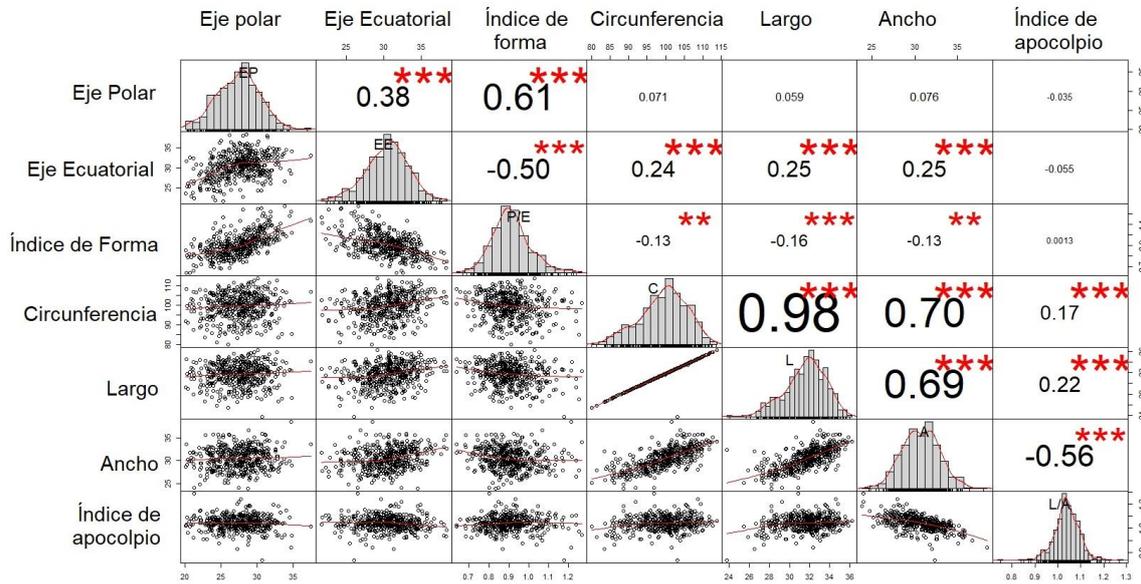


Figura 8. Correlaciones entre las diferentes variables medidas en los granos de polen de melina.

4.1.5.2 Correlaciones genéticas

Los resultados de correlación genética mostraron que el eje ecuatorial (EE) presenta asociación fuerte con la circunferencia, largo y ancho, además, de una correlación negativa moderada con la relación P/E, la cual también presenta correlación negativa de moderada a fuerte con la circunferencia, largo, ancho y la relación L/A. En cuanto al eje polar (EP), este tiene asociación moderada con la relación P/E y asociación fuerte con la relación L/A. Finalmente, el ancho se correlaciona fuertemente con la circunferencia y el largo (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados de la correlación genética del eje polar (EP), eje ecuatorial (EE), índice polar (P/E), circunferencia (C), largo (L), ancho (A) y el índice del apocolpio (L/A), obtenidos para los datos de melina.

	EP	EE	P/E	C	L	A	L/A
EP							
EE	0.362						
P/E	0.460*	-0.660*					
C	0.358	0.968*	-0.629*				
L	0.361	0.958*	-0.615*	0.999*			
A	0.047	0.901*	-0.810*	0.921*	0.920*		
L/A	0.747*	-0.015	0.604*	0.038	0.044	-0.351	

* Datos de mayor significancia

4.1.6 Parámetros genéticos

La heredabilidad individual para todas las variables es buena, siendo la circunferencia, el largo, el ancho y el eje ecuatorial los que presentan una mayor heredabilidad individual. En cuanto a la heredabilidad media del genotipo, todas las variables presentan un buen valor, siendo el índice del apocolpio el que tiene la menor heredabilidad media del genotipo. Por otra parte, el coeficiente de variación es mayor en los clones que en la especie, lo que demuestra que existe una mayor variación entre genotipos que en la especie; sin embargo, solo el eje ecuatorial y la relación P/E muestran un buen coeficiente de variación genética (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resultados de los parámetros genéticos del eje polar (EP), eje ecuatorial (EE), índice polar (P/E), circunferencia (C), largo (L), ancho (A) y el índice del apocolpio (L/A), obtenidos para los datos de melina.

	EP	EE	P/E	C	L	A	L/A
Promedio de los datos (μm)	27.490	30.480	0.907	99.473	31.642	30.467	1.041
Heredabilidad individual	0.493	0.880	0.626	0.939	0.939	0.892	0.132
Heredabilidad media del genotipo	0.917	0.949	0.901	0.824	0.843	0.938	0.520
Coefficiente de variación individual	7.697	9.492	9.504	6.351	6.462	7.377	2.096
Coefficiente de variación del genotipo	3.848	4.746	4.752	3.176	3.231	3.689	1.048
Exactitud de los resultados	0.958	0.974	0.949	0.908	0.918	0.968	0.721

4.2 Teca

4.2.1 Morfología

Los granos de polen de teca son mónadas y tricolpados, según el número y la posición de las aberturas (Figura 9), (Belmonte & Roure, 2002; Flores, 1999). Además, según el índice de forma (P/E), los granos de polen de los cinco clones de teca son subesferoidales, en promedio la forma es oblato esferoidal y en general las formas de menor valor del índice son suboblato y los de mayor valor P/E son subprolato. La única excepción en cuanto a la forma de los granos de menor valor de P/E se da en la tercera réplica del clon 81, los cuales son oblato esferoidal. También en los granos de mayor P/E se observó que la segunda réplica del clon 1, la primera y la segunda réplica del clon 18, la primera réplica del clon 81, las tres réplicas del clon 83 y la tercera réplica del clon 103 son prolato

esferoidal y la segunda réplica del clon 103 es oblato esferoidal. Sin embargo, todas estas formas pertenecen al grupo subesferoidal (Cuadro 5, Anexo 1), (Erdtman, 1986).

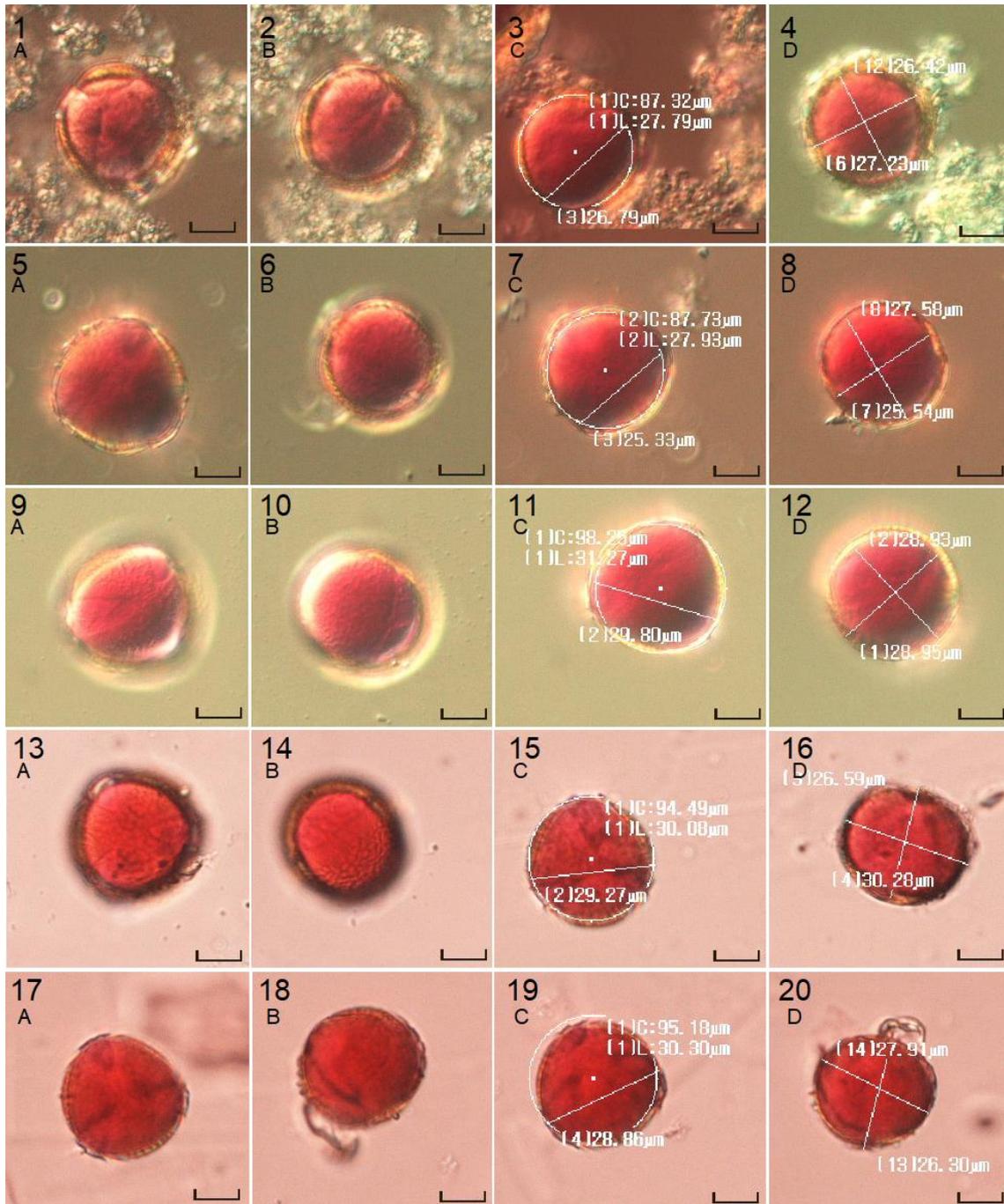


Figura 9. Granos de polen de teca vistos al microscopio de luz. Clon 1, imagen 1-4. Clon 18, imagen 5-8. Clon 81, imagen 9-12. Clon 83, imagen 13-16. Clon 103, imagen 17-20. A) grano de polen en vista polar, B) grano de polen en vista ecuatorial, C) grano de polen en vista polar con mediciones y D) grano de polen en vista ecuatorial con mediciones. Barras de escala: 10 μ m.

Cuadro 5. Resultados de la media del eje polar (EP), eje ecuatorial (EE), índice polar (P/E), circunferencia (C), largo (L), ancho (A) y el índice del apocolpio (L/A); y sus respectivos errores estándar, obtenidos para los clones de teca.

Clon	1	18	81	83	103
EP (μm)	25.94 \pm 0.19	26.56 \pm 0.16	28.47 \pm 0.19	28.98 \pm 0.16*	28.91 \pm 0.18
EE (μm)	27.37 \pm 0.19	28.30 \pm 0.17	29.47 \pm 0.19	31.79 \pm 0.14*	30.16 \pm 0.16
P/E	0.95 \pm 0.01	0.94 \pm 0.01	0.97 \pm 0.01*	0.91 \pm 0.05	0.96 \pm 0.01
C (μm)	88.69 \pm 0.42	88.92 \pm 0.35	97.68 \pm 0.24*	96.29 \pm 0.30	94.18 \pm 0.38
L (μm)	28.18 \pm 0.14	28.24 \pm 0.13	31.09 \pm 0.08*	30.65 \pm 0.10	29.93 \pm 0.13
A (μm)	26.38 \pm 0.18	26.32 \pm 0.17	28.58 \pm 0.16	30.00 \pm 0.15*	28.57 \pm 0.16
L/A	1.08 \pm 0.01	1.07 \pm 0.01	1.09 \pm 0.01*	1.02 \pm 0.01	1.05 \pm 0.01

* Datos de mayor magnitud

4.2.2 Tamaño

4.2.2.1 Tamaño entre genotipos de la misma especie

Los granos de polen de teca en promedio son medianos, según la longitud del eje más largo en vista ecuatorial, pasando de valores pequeños a medianos (Erdtman, 1986), (Cuadro 5, Anexo 2), aunque basado en índice del apocolpio (L/A) los granos de polen de teca son grandes (Cuadro 5, Anexo 3), (Huysmans, Robbrecht, & Smets, 1994). Los clones 81, 83 y 103 solamente presentan granos de tamaño mediano. Por otra parte, la primera y segunda réplica del clon 1 muestran tamaños pequeños en las mediciones del valor mínimo y el clon 18 en las tres réplicas para las mediciones del valor mínimo expresa tamaños pequeños. Además, se observó que los clones 81 y 83 fueron los que obtuvieron las mediciones más altas en las diferentes mediciones (Cuadro 5, datos subrayados).

4.2.2.2 Tamaño calculado para la especie

Aproximadamente el tamaño de los granos de polen de teca va de 20.5 μm a 35 μm (Cuadro 6), según el tamaño calculado para la especie, en promedio el polen de teca es mediano (Cuadro 5, Cuadro 6), pasando por valores de pequeños a grandes. Con algunas excepciones, en la tercera réplica del clon 1, las tres réplicas del clon 81 y la primera réplica del clon 103 el tamaño para el valor mínimo es mediano, las tres réplicas del clon 83, la segunda y tercera réplica del clon 103 en promedio son grandes, pasando por tamaños de medianos a grandes.

Cuadro 6. Tamaño de los granos de polen de teca intraespecie, basado en la longitud del eje más largo.

Tamaño	Longitud (μm)
Muy pequeño	< 20.5
Pequeño	20.5 - 25
Mediano	25 - 30
Grande	30 - 35
Muy grande	> 35

4.2.3 Diferencias

Por medio de la prueba estadística de Bonferroni se determinó que para las mediciones del índice de forma (P/E), el clon 83 muestra diferencias estadísticamente significativas, respecto a los otros cuatro clones, además el clon 18 es diferente del clon 81. Por otra parte, el clon 1 es estadísticamente similar a los clones 18, 81 y 103; y el clon 103 es semejante a los clones 18 y 81 (Figura 10). En cuanto al índice del apocolpio (L/A), los clones 83 y 103 son estadísticamente diferentes a los demás clones, y los clones 1, 18 y 81 son similares estadísticamente (Figura 11).

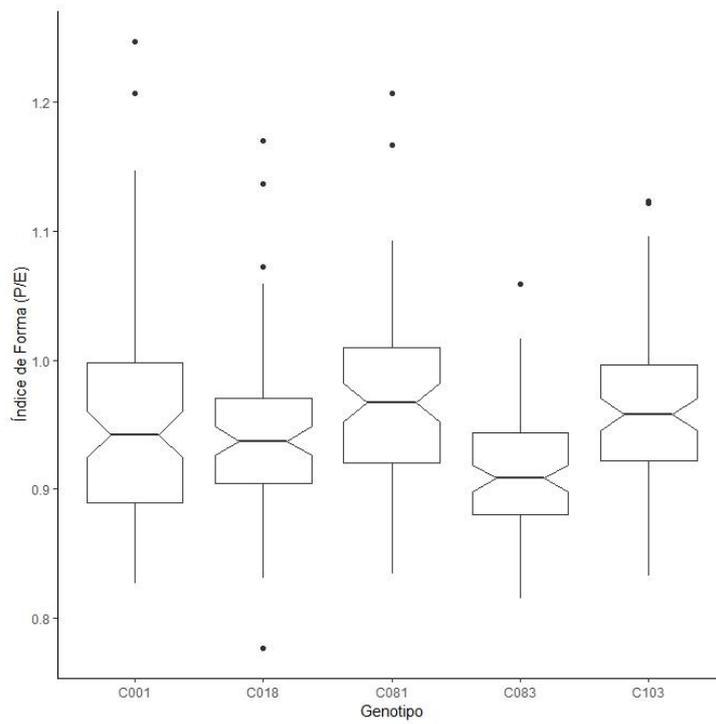


Figura 10. Índice de forma (P/E) de los cinco clones de teca*.

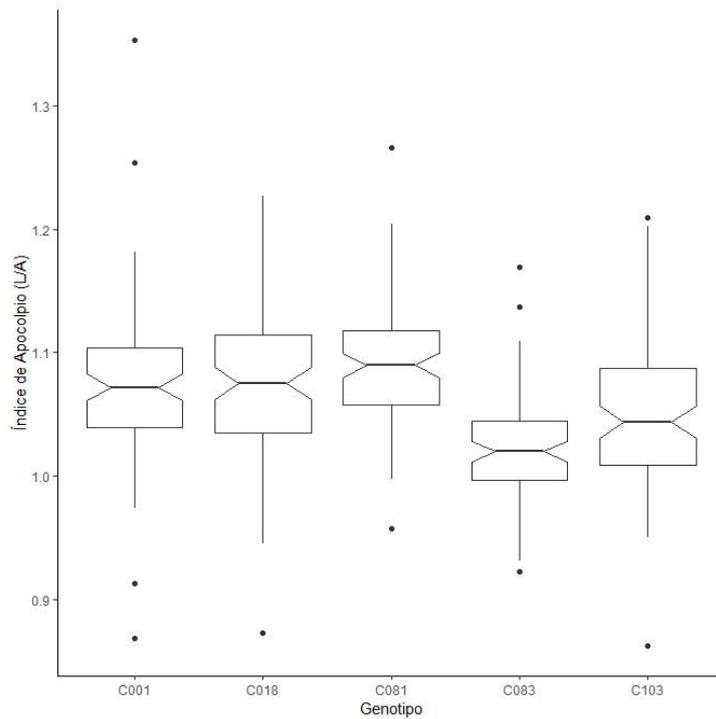


Figura 11. Índice de apocolpion (L/A) de los cinco clones de teca*.

* La muesca determina las diferencias entre clones, si dos muescas se sobreponen no hay diferencias significativas entre esos dos clones.

4.2.4 Coeficiente de Variación

El coeficiente de variación (CV) de teca fue moderado para los datos del eje polar (7.56%), eje ecuatorial (7.58%), índice polar (7.37%) y el ancho (7.58%); aunque, fue medio para las mediciones de la circunferencia (5.31%), largo (5.50%) y el índice de área polar (5.66%). Sin embargo, entre clones se observa para el eje polar que el mayor CV lo obtuvo el clon 1 (6.98%) y el menor CV el clon 83 (5.24%), en cuanto al eje ecuatorial los valores más altos se obtienen también en el clon 1 (6.43%) al igual que el menor CV en el clon 83 (4.28%), además el índice polar mostró mayor variación en el clon 1 (8.42%) y menor en el clon 83 (5.49%), para las mediciones de la circunferencia el mayor CV se obtuvo en el clon 1 (4.51%) y el menor en el clon 81 (2.30%), en cuanto al largo el mayor valor lo expresó el clon 1 (4.86%) y el menor el clon 81 (2.32%), en el ancho la mayor variación mantuvo la tendencia anterior, observándose en el clon 1 (6.63%) y la menor en el clon 83 (4.60%) y finalmente el índice de área polar mostró mayor variación en el clon 103 (5.71%) y la menor en el clon 81 (4.59%). De estos resultados destaca que el clon 1 es el que presenta un mayor coeficiente de variación para casi todas las mediciones, excluyendo el índice relacionado con el tamaño de los granos.

4.2.5 Correlaciones

4.2.5.1 *Correlaciones de rasgos morfológicos*

Basado en los resultados de las correlaciones estadísticas por el método de Spearman realizadas a los datos de teca, se determina que existe una correlación moderada y estadísticamente significativa al 99% de confianza (***) entre las variables medidas en la vista ecuatorial (eje polar y eje ecuatorial) y las variables medidas en la vista polar (circunferencia, largo y ancho), así como asociaciones de moderadas a fuertes entre las variables que fueron tomadas en la misma vista del grano de polen. Además, se observa que no existe correlación significativa entre la forma de los granos (índice de forma P/E) y el tamaño (índice de apocolpio L/A), (Figura 12).

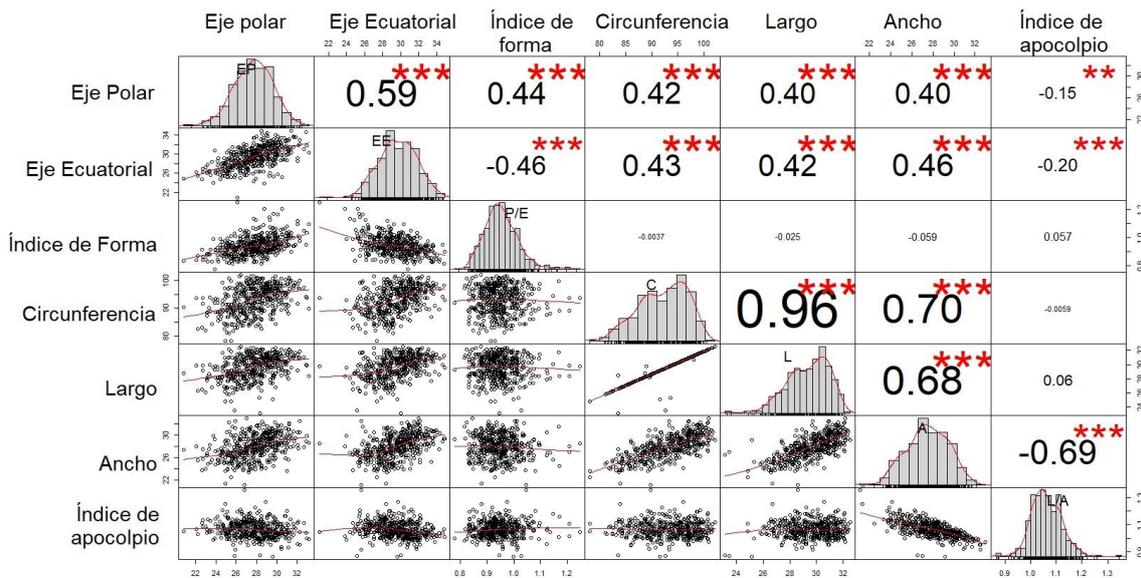


Figura 12. Correlaciones entre las diferentes variables que fueron medidas para los granos de polen de teca.

4.2.5.2 Correlaciones genéticas

En cuanto a la correlación genética de los datos de teca, se observa que el eje polar (EP) y el eje ecuatorial (EE), presentan una correlación fuerte entre ellos y con la circunferencia (C), el largo (L) y el ancho (A), además el eje ecuatorial tiene asociación negativa fuerte con el índice de área polar (L/A) y negativa moderada con el índice de forma (P/E), además el eje polar presenta asociación negativa moderada con el índice de área polar. Los índices de forma y tamaño demuestran una correlación genética fuerte entre ellos. Por otra parte, la circunferencia, el largo y el ancho se correlacionan fuertemente entre ellos y finalmente el ancho muestra una asociación negativa moderada con el índice de área polar (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resultados de la correlación genética del eje polar (EP), eje ecuatorial (EE), índice polar (P/E), circunferencia (C), largo (L), ancho (A) y el índice del apocolpio (L/A), obtenidos para los datos de teca.

	EP	EE	P/E	C	L	A	L/A
EP							
EE	0.915*						
P/E	-0.095	-0.489*					
C	0.907*	0.786*	0.027				
L	0.904*	0.786*	0.021	1.000			
A	0.944*	0.963*	-0.332	0.902*	0.904*		
L/A	-0.538*	-0.784*	0.777*	-0.276	-0.278	-0.663*	

* Datos de mayor significancia

4.2.6 Parámetros genéticos

La heredabilidad individual y la heredabilidad media del genotipo de teca muestra valores altos y lo que demuestra buena heredabilidad para todas las variables. Además, el coeficiente de variación fue alto para casi todas las variables, excepto para el índice de forma (P/E) y el índice del apocolpio (L/A), en los cuales fue moderado. Además, se observó mayor variación entre genotipos que en la especie (Cuadro 8).

Cuadro 8. Resultados de los parámetros genéticos del eje polar (EP), eje ecuatorial (EE), índice polar (P/E), circunferencia (C), largo (L), ancho (A) y el índice del apocolpio (L/A), obtenidos para los datos de teca.

	EP	EE	P/E	C	L	A	L/A
Promedio de los datos (μm)	27.772	29.418	0.946	93.152	29.617	27.952	1.063
Heredabilidad individual	0.933	0.976	0.892	0.983	0.984	0.978	0.895
Heredabilidad media del genotipo	0.974	0.981	0.899	0.980	0.982	0.978	0.865
Coefficiente de variación individual	10.088	11.489	4.327	8.841	9.029	11.421	4.605
Coefficiente de variación del genotipo	5.044	5.744	2.164	4.420	4.514	5.711	2.303
Exactitud de los resultados	0.987	0.990	0.948	0.990	0.991	0.989	0.930

5. Discusión

5.1 Morfología y Tamaño

La familia Lamiaceae está representada por gran cantidad de géneros y especies, entre los cuales se pueden observar gran cantidad de diferencias en la morfología del polen, principalmente en el tamaño, el cual va de 10 a 100 μm y en el número de aberturas, observándose granos tricolpados y hexacolpados. En cuanto a la relación P/E, hay granos prolatos esferoidales, subprolatos y prolatos. Esto demuestra que melina comparte aspectos de su morfología con miembros de la misma familia, siendo un grano tricolpado de tamaño mediano, pero de forma oblato esferoidal. Por otro lado, los granos de polen de teca son tricolpados, medianos y de forma subesferoidal (Badamtsetseg, Sang-Myoun

& Hwa-Yuon, 2012). También se reporta que especies de esta familia presentan aberturas tipo hexazonocolpado y trizonocolpado, lo que no coincide con los resultados obtenidos, denotando así una subdivisión de ciertas características morfológicas dentro de la familia (Doaigey, El-zaidy, Alfarhan, Milagy & Jacob, 2018).

Los granos de polen de teca van de suboblato a subprolato según la relación P/E, igual que el polen del género *Lamium L.* de la familia Lamiaceae, el cual también es mónada. Además, esto se relaciona con el polen de melina que también es subesferoidal; sin embargo, el polen de melina va de oblato a subprolato. También hay similitud con la relación P/E, la cual en melina en promedio ronda alrededor de 0.90, en teca 0.95 y en *Lamium* va de 0.91 a 1.18. Aunque, el eje polar de melina el valor es de 27.37 μm y en teca es de 27.77 μm , pero en *L. vremanii* es de 22.54 μm y en *L. orvala* es de 39.96 μm . Además, al igual que los granos de polen de melina y de teca, el género *Lamium* presenta organismos tricolpados de colpo simple (Atalay, Celep, Bilgili & Dogan, 2016). Por otra parte, el género *Callicarpa* (Lamiaceae) posee granos de polen mónadas, tricolpados, con tamaños medios (26-50 μm), en promedio el eje polar mide 26.05 μm y el eje ecuatorial 25.53 μm , la relación P/E es de 0.84 para *C. longifolia Lam. var. longifolia* y de 1.34 para *C. macrophylla Vahl*, dominando la forma esferoidal. Estos resultados son similares a los que se obtuvieron para los granos de polen de melina y de teca, aunque estos presentan tamaños un poco mayores para los ejes, pero la relación P/E es media comparada con estas dos especies (Ma, Bramley & Zhang, 2015). Además, los géneros *Hyptis* y *Salvia* (Lamiaceae) muestran casos de excepción, ya que algunas de sus especies presentan siete u ocho colpos, aunque la media es seis colpos y la forma de los granos varía entre especies, observándose polen oblato, suboblato, oblato-esferoidal, prolato-esferoidal, subprolato y prolato; con un tamaño entre los 25 μm y 38 μm , aunque *Salvia coccinea* mide entre 42.63 μm y 62.08 μm . Estos resultados comparados con los de teca y melina demuestran especies con un mayor número de colpos, pero de tamaños y formas similares (Orsini, Rinaldi, & Velázquez, 2006).

Teca y melina al pertenecer a la misma familia, comparten algunas características. El polen de ambas especies es mónada, mediano y tricolpado. En cuanto a la forma difieren un poco, ya que teca es subesferoidal y melina va de oblato a subesferoidal. El tamaño de

los granos de polen va de pequeño a mediano en ambas especies y el tamaño dentro de la especie va de pequeño a grande, siendo teca ligeramente menor. Estas diferencias de tamaño, reflejan que hay granos de polen genéticamente mejores que otros, ya que el tamaño de los granos de polen podría estar asociado a la viabilidad. Además, se demuestra que hay control genético sobre la forma y el tamaño, haciendo posible establecer un primer criterio para la selección temprana, basado en el tamaño y la forma del grano de polen, con el fin de beneficiar la polinización cruzada, además de tener implicaciones importantes sobre la crioconservación de los granos de polen.

5.2 Diferencias morfológicas

Respecto al índice de forma los clones 3 y 114 de melina y el clon 83 de teca, son diferentes estadísticamente a los demás clones de la especie (según la prueba de Bonferroni), lo que los convierte en prospectos para el mejoramiento. Por otra parte, según el índice de tamaño (apocolpio), en melina son más similares; sin embargo, el clon 7 se observa menor tamaño y posee diferencias estadísticamente significativas con algunos de los clones. En cuanto a teca los clones 83 y 103 son estadísticamente diferentes en tamaño a los demás clones de la especie (según la prueba de Bonferroni), por lo que también son factibles para escogerlos en los programas de mejoramiento genéticos. Ya que la forma y el tamaño son factores fenotípicos, expresados por el genotipo, podrían estar asociados a una mayor viabilidad.

5.3 Coeficiente de Variación

Los resultados del coeficiente de variación para melina demuestran en todas las variables (principalmente para el clon 7 y el clon 3), que hay mayor variación dentro de la especie (entre genotipos), que en la especie; sin embargo, algunos clones (como el 114 en más de una variable) presentan variaciones muy bajas. En cuanto a teca, solamente las mediciones de los índices P/E y L/A muestran mayor variación dentro de las especies, aunque el clon 1 presenta un coeficiente de variación mayor en la mayoría de las

variables, sigue siendo menor comparado con el CV de la especie. Estos resultados podrían deberse al efecto del ambiente sobre el fenotipo.

5.4 Correlaciones

5.4.1 Correlaciones de rasgos morfológicos

La correlación estadística de los datos de melina muestra que entre el eje polar y el eje ecuatorial hay un crecimiento proporcional. Igualmente, entre el eje ecuatorial, la circunferencia, el largo y el ancho, hay una asociación proporcional. Los granos de polen de teca muestran una asociación entre las mediciones del eje polar, eje ecuatorial, la circunferencia, el largo y el ancho. Esto demuestra que existe una proporcionalidad entre las mediciones que se tomaron entre las vistas, es decir, que conforme crece o decrece una de las variables crecen o decrecen las demás, lo que resulta en que los granos de polen tienden a ser esféricos. Además, tal y como se esperaba para ambas especies, el índice de forma es proporcional al eje polar e inversamente proporcional al eje ecuatorial y el índice del apocolpio es proporcional al largo e inversamente proporcional al ancho, esto debido a la manera como fueron calculados los índices.

5.4.2 Correlaciones genéticas

En cuanto a las correlaciones genéticas se observan asociaciones mayores respecto a los resultados de las correlaciones estadísticas, esto se debe a que los datos fueron tratados para limpiarlos del efecto del ambiente, por lo que se muestra de mejor manera el efecto del genotipo sobre las variables. En melina se determinan buenas asociaciones entre el eje ecuatorial, la circunferencia, el largo y el ancho. Por su parte teca, presenta proporcionalidad alta entre el eje polar, eje ecuatorial, la circunferencia, el largo y el ancho. Tal como se observa en las correlaciones estadísticas de melina y teca. Esto demuestra que al igual que en las correlaciones estadísticas existe una proporcionalidad entre las mediciones que se tomaron entre las vistas, es decir, que conforme crece o

decrece una de las variables crecen o decrecen las demás variables, lo que resulta en que los granos de polen tienden a ser esféricos.

En melina, se observa que el índice de forma es proporcional al eje polar e inversamente proporcional al eje ecuatorial y el índice del apocolpio es proporcional al largo e inversamente proporcional al ancho. Tal como se observa en las correlaciones estadísticas de melina. Sin embargo, en teca no se muestra de esta forma, ya que el índice de forma es inversamente proporcional al eje polar e inversamente proporcional al eje ecuatorial y el índice del apocolpio es inversamente proporcional al largo e inversamente proporcional al ancho. Además, en melina y en teca se observa proporcionalidad entre los índices P/E y el L/A, lo que significa que la forma y el tamaño se relacionan positivamente y que están explicados por el genotipo.

5.5 Parámetros genéticos

Una heredabilidad individual de 0.1 o superior, demuestra que todas las variables medidas en teca y en melina están altamente asociadas al genotipo, es decir son heredables. Por su parte, la heredabilidad media del genotipo, debe ser superior a 0.5 ya que esta utiliza todos los datos y los compara entre ellos para explicar las asociaciones en la especie. Los resultados que se obtuvieron para ambas especies demuestran una alta relación del fenotipo con el genotipo. De estos resultados se destaca esta relación, ya que permite elegir el mejor genotipo basado en las características de morfología y tamaño, observables al microscopio de luz. Además, se determina una mayor heredabilidad en la especie que dentro de la especie. Esto demuestra una alta asociación entre la forma, el tamaño de los granos de polen y el genotipo paterno.

El CV individual en melina se mantiene de medio a alto y en teca es alto, sobrepasando a 10 en algunas variables (excluyendo los índices de forma y del apocolpio, en ambas especies, que son de medios a bajos). Sin embargo, al comparar con el CV del genotipo, estos tienen valores de medios a bajos en ambas especies. Basado en lo anterior, se determina que el coeficiente de variación es mayor dentro de las especies (entre clones)

que en la especie. Además, teca tiene mayor variación entre genotipos y para la especie, comparando con melina.

Por otra parte, los valores de exactitud al ser tan altos, superiores a 0.9 (siendo 1 perfecto), demuestran para todas las variables, (excepto el índice de apocolpio de melina) que los datos son altamente precisos, dándole gran confianza a los resultados.

6. Conclusiones

1. Los clones 3 y 114 de melina y el clon 83 de teca, son los que presentan mayores diferencias estadísticamente significativas para el índice de forma, según la prueba de Bonferroni, con respecto a los demás clones evaluados.
2. El coeficiente de variación de melina y teca es alto, demostrando mayor variación entre genotipos que en la especie.
3. Existe correlación significativa entre la vista polar y la vista ecuatorial de los granos de polen de teca y de melina.
4. Hay un alto control genético sobre la expresión del fenotipo.
5. Diferencias de tamaño en los granos de polen, demuestran variabilidad genotípica, haciéndolos factibles para el mejoramiento genético.

7. Recomendaciones

1. La recolección de las flores debe realizarse cuando se encuentren cerradas ya que esto ayuda a que se obtenga una mayor cantidad de polen, debido a que cuando la flor está abierta y con las anteras expuestas, estas se pueden caer por acción del viento o por acción mecánica en el momento de cortar las flores para su próxima recolección. Además de que se garantiza la pureza del polen entre genotipos.
2. Para que la observación de los granos de polen en el microscopio de luz sea más enriquecedora y se aprecien claramente las aberturas, se debe trabajar

preferiblemente con material fresco (recolectado y fijado con poca anterioridad) y también debe seguirse exhaustivamente el protocolo de fijación para que la morfología de los granos se mantenga intacta.

3. Melina y teca presenta granos de polen con morfología y tamaños característicos, pero no exclusivos de la especie, ya que comparte algunos caracteres con miembros de la misma familia, por lo que, para utilizar esta información taxonómica para realizar una identificación a nivel de especie, se debe contar con datos adicionales (características de la planta y/o flores), que ayuden a obtener resultados fidedignos.
4. Al obtenerse resultados estadística y genéticamente confiables, es recomendado, realizar un análisis similar a otros clones de teca y de melina, con el fin de comparar y confirmar los resultados.
5. Finalmente, la utilización del microscopio de barrido electrónico sería recomendado para realizar una caracterización más profunda de los granos de polen y determinar la ornamentación de la exina.

8. Referencias

- Alcântara, B., Ortega, E. & Souza, V. (2016). Identification of morphological (*Tectona grandis* L. f.). *Advances in Forestry Science*, 3(1), 1–5.
- Alfaro, M. & De Camino, R. (2002). Melina (*Gmelina arborea*) in Central América. Forest Plantations Working Paper 20. *Forest Resources Development Service. Forest Resources Division. FAO. Roma*, 18.
- Araméndiz, H., Cardona, C. & Lugo, E. (2012). In vitro Pollen Germination of Eggplant (*Solanum melongena* L.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 65(2), 6637–6643.
- Atalay, Z., Celep, F., Bilgili, B. & Dogan, M. (2016). Pollen morphology of the genus *Lamium* L. (Lamiaceae) and its systematic implications, 219, 68–84. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2015.12.011>
- Avila, M. & Betancourt, G. (2014). Evaluación de la variabilidad de la estructura anatómica de *Schizolobium parahybum* Bell Blake y *Gmelina arborea* Roxb., entre árboles bajo diferentes tratamientos de fertilización, al cuarto año de plantados en la Provincia de Zamora Chinchipe. Loja: Universidad Nacional de Loja.
- Badamtsetseg, B., Sang-Myoun, L. & Hwa-Yuon, L. (2012). Pollen Morphology of the Family Lamiaceae in Mongolia. *Journal of Korean Nature*, 5(2), 169–179. <https://doi.org/10.7229/jkn.2012.5.2.169>
- Barba, J. (2016). Introgresión de genes *E. guineensis* en híbridos interespecíficos OxG para recuperar la fertilidad del polen y otras características deseables en palma de aceite. *Revista Palmas*, 37, 285–293.
- Barrantes, A. & Ugalde, S. (2013). Usos y aportes de la madera en Costa Rica. *Oficina Nacional Forestal. Heredia, Costa Rica*, 32.
- Barrios, L., Caetano, C., Cardoso, C., Eeckenbrugge, G., Arroyave, A. & Olaya, C. (2005). Caracterización del polen de especies de los géneros *Passiflora* y *Dilkea*. *Acta Agronómica (Colombia)*, 54(2004), 54(3):19-23.
- Belmonte, J. & Roure, J. (2002). Introducción, Polinosis: Polen y Alergia. *MRA Ediciones S.L*, 7–16.
- Belmonte, J., & Roure, J. (2002). Introducción, Polinosis: Polen y Alergia. *MRA Ediciones S.L*, 7–16.

- Borja, P. (2014). Crecimiento de teca (*Tectona grandis* L.) en diferentes Inceptisoles, en la hacienda El Belén del Sector Boyería, Cantón Palenque, Provincia de Los Ríos. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.
- Chacón, P. & Murillo, O. (2005). Análisis comparativo de la producción de minijardines clonales hidropónicos y jardines clonales en tierra de melina (*Gmelina arborea* Roxb.). *Revista Forestal (Costa Rica)*, 2(6), 1–7.
- Ciciarelli, M. de las M., Passarelli, L. & Rolleri, C. (2010). Morfología del polen en especies de *Canna* (Cannaceae) y su implicancia sistemática. *Revista de Biología Tropical*, 58(1), 63–79. Retrieved from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442010000100005&script=sci_arttext
- Depciuch, J., Kasprzyk, I., Roga, E. & Parlinska-Wojtan, M. (2016). Analysis of morphological and molecular composition changes in allergenic *Artemisia vulgaris* L. pollen under traffic pollution using SEM and FTIR spectroscopy. *ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH*, 23, 23203–23214. Retrieved from http://apps.webofknowledge.com.una.idm.oclc.org/full_record.do?product=CCC&search_mode=GeneralSearch&qid=8&SID=7EiuhYFlcBSerJEvZI3&page=1&doc=10&cacheurlFromRightClick=no
- Doaigey, A. R., El-zaidy, M., Alfarhan, A., Milagy, A. E. & Jacob, T. (2018). Saudi Journal of Biological Sciences Pollen morphology of certain species of the family Lamiaceae in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 354–360. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.03.001>
- Dos Santos, V. L., Versieux, L., Lapa-Wanderley, M. D. G. & Pinto Da Luz, C. F. (2018). Pollen morphology of *Alcantarea giant bromeliads* (Bromeliaceae, Tillandsioideae). *Grana*, 57(1–2), 117–136. <https://doi.org/10.1080/00173134.2017.1310920>
- Dutra, F. V. & Gasparino, E. C. (2018). Pollen morphology of Rutaceae from Brazilian forest fragments. *Palynology*, 42(1), 43–54. <https://doi.org/10.1080/01916122.2017.1306812>
- Erdtman, G. (1952). Pollen morphology and plant taxonomy. E.J. Brill. Retrieved from <https://books.google.co.cr/books?hl=es&lr=&id=e-QUAAAAIAAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=Erdtman,+G.+1952.+Pollen+morphology>

+and+plant+taxonomy:+Angiosperms+(An+introduction+to+Palinology).+Leiden:
+E.J.+Brill.+(Reprinted+in+1986).+553p.&ots=zPfs3FAnty&sig=DGAGVgod9v
Og

Erdtman, G. (1986). Pollen Morphology and Plant Taxonomy. *Geologiska Foereningen i Stockholm. Foerhandlingar*, 74(4), 526–527. <https://doi.org/10.1080/11035895209453507>

Farfán-Santillán, N., Mendoza-Ruiz, A., Pérez-García, B. & Velázquez-Montes, E. (2016). Palinology of the mexican species of Gleicheniaceae. *Botanical Sciences*, 94(2), 281–289. <https://doi.org/10.17129/botsci.509>

Fernandez-Moya, J., Alvarado, A., Fallas, J., Miguel-Ayanz, A. & Marchamalo-Sacristan, M. (2017). N-P-K fertilisation of teak (*Tectona grandis*) plantations: a case study in costa rica. *Journal of tropical forest science*, 29, 417–427. Retrieved from http://apps.webofknowledge.com.una.idm.oclc.org/full_record.do?product=CCC&search_mode=GeneralSearch&qid=8&SID=8Djk7WiOcWVCoBIVRYm&page=1&doc=10&cacheurlFromRightClick=no

Flores, E. (1999). *La planta : estructura y función* (Volumen II). Libro Universitario Regional (LUR).

Florez, M. (2013). Evaluación del efecto de la polinización manual en la fecundación de flores y cuaje de frutos en el cultivo de maracuyá (*passiflora edulis*) en la vereda Espinal municipio los Santos en el departamento de Santander. Universidad nacional abierta y a distancia.

Fonseca, W. (2004). Manual para productores de teca (*Tectona grandis* L.f) en Costa Rica. *SIREFOR*. Retrieved from http://www.sirefor.go.cr/Documentos/Reforestacion/2004_Fonseca_ManualProductoresTeca.pdf

Ganeshan, S., Rajasekharan, P., Shashikumar, S. & Decruz, W. (2008). Cryopreservation of Pollen. *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, 443–464.

García, L., Rivero, M. & Droppelmann, F. (2015). Descripción morfológica y viabilidad del polen de *Nothofagus nervosa* (Nothofagaceae). *Bosque (Valdivia)*, 36(3), 487–496. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002015000300015>

- Garralla, S. & Cuadrado, G. (2005). Morfología del polen de especies de *Opuntia Mill.* de Argentina.
- Giovanetti, M., Ramos, M. & Máguas, C. (2018). Why so many flowers? A preliminary assessment of mixed pollination strategy enhancing sexual reproduction of the invasive *Acacia longifolia* in Portugal. *Web Ecology*, 18(1), 47–54. <https://doi.org/10.5194/we-18-47-2018>
- González, M., Estévez, A., Castillo, J., Salomón, J., Moré, O. & Hernández, M. (2002). La Calidad del Polen: Requisito Indispensable del Mejoramiento Tradicional de la Papa en Cuba. *Revista Latinoamericana de La Papa*, ISSN 1019-6609, ISSN-e 1853-4961, Vol. 13, N°. 1, 2002, Págs. 75-94, 13(1), 75–94.
- Guerra-Centeno, D., Valdez-Sandoval, C., Orozco-Acevedo, D. & Fuentes-Rousselin, H. (2016). Guía para la identificación de especies de árboles y arbustos comunes en el agropaisaje de Guatemala.
- Gutierrez, A., Santacruz, F., Cabrera, J. & Rodriguez, B. (2003). Mejoramiento genético vegetal. *E-Gnosis*, 1.
- Gutiérrez, M., Pérez, R. & Cervigón, P. (2015). Aerobiología: redes de polen y esporas aerovagantes. *Revista Salud Ambiental*, 15, 155–156.
- Huysmans, S., Robbrecht, E. & Smets, E. (1994). Are the genera *Hallea* and *Mitragyna* (Rubiaceae- Coptosapelteae) pollen morphologically distinct, 39, 321–340.
- Keogh, R. (2013). Capítulo 2: La teca y su importancia económica a nivel mundial. En: De Camino, R.; Morales, J.P. (eds). *Las Plantaciones de Teca En América Latina: Mitos y Realidades*.
- Libonatti, C., Andersen-Puchuri, L., Tabera, A., Varela, S., Passucci, J. & Basualdo, M. (2017). Caracterización microbiológica de polen comercial. Reporte Preliminar. *REDVET*, 18.
- Lobo, M. (2006). Recursos genéticos y mejoramiento de frutales andinos: una visión conceptual. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 7(2), 40–54.
- López, A. & Rosenfeldt, S. (2015). *Oxalis* sect. *Palmatifoliae* (Oxalidaceae): Morfología de los granos de polen y diversidad de las orbículas. *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, 50(3), 349–352.

- Ma, Z., Bramley, G. L. C. & Zhang, D. (2015). Pollen morphology of *Callicarpa* L. (Lamiaceae) from China and its systematic implications. *Plant Systematics and Evolution*. <https://doi.org/10.1007/s00606-015-1244-8>
- Mondragón, A. (2006). Caracterización morfológica de la exina del polen de siete especies del género *Sterculia* L. *Bioagro*, 18(3), 139–143.
- Muñoz, A., Caetano, C., Vallejo, F. & Sánchez, M. (2006). Comportamiento meiótico y descripción morfológica del polen de pronto alivio. *Acta Agronómica*, 55(37–42).
- Murillo, O. (1992). Diseño de un huerto semillero de *Gmelina arborea* para la producción de semilla certificada en la zona norte de Costa Rica. *Tecnología En Marcha*, 11(3), 51–58.
- Murillo, O., Espitia, M. & Castillo, C. (2012). Fuentes Semilleras para la Producción Forestal. Capítulo 5. Ganancia genética esperada con la utilización de árboles superiores. *Domar* (1st ed.). Bogotá, Colombia.
- Murillo, O. & Guevara, V. (2013). Estado de los Recursos Genéticos Forestales de Costa Rica. *MINAET/FAO/CONAGEBIO, San José, Costa Rica*, 159.
- Murillo, O., Wright, J., Monteuis, O. & Montenegro, F. (2013). Capítulo 6: Mejoramiento genético de la teca en América Latina. En: De Camino, R.; Morales, J.P. (eds). *Las Plantaciones de Teca En América Latina: Mitos y Realidades*, 86–111.
- Nora, S., Albaladejo, R., Martínez, S., Robledo-Arnuncio, J. & Aparicio, A. (2011). Movimiento de genes (polen y semillas) en poblaciones fragmentadas de plantas. *Revista Científica de Ecología y Medio Ambiente*, 20, 35–45. <https://doi.org/10.7818/RE.2014.20-2-3.00>
- Oliva, R. (2013). Efectividad de la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), como herramienta para la observación y caracterización del polen en el Departamento de Ciencias Forenses de Costa Rica Trabajo realizado bajo la tutela de: Dra. Marina Aboal Sanjurjo.
- Orsini, G., Rinaldi, M. & Velázquez, D. (2006). Estudio palinológico de los géneros *Hyptis* y *Salvia* (Lamiaceae) en el parque nacional El Avila, Venezuela. *Ernstia*, 16(1), 1–30. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0252-

82742006000100001

- Rashid, A. A., Perveen, A. & Abid, R. (2017). Pollen morphology of the subfamily coryphoideae -arecaceae (excluding tribe phoeniceae) from pakistan and kashmir. *Pakistan Journal of Botany*, 49(2), 605–616. <https://doi.org/10.1080/00173130310008535>
- Resende, M. (2016). Software Selegen-REML/BLUP: A useful tool for plant breeding. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 16(4), 330–339. <https://doi.org/10.1590/1984-70332016v16n4a49>
- Rojas-Rodríguez, F., Arias-Aguilar, D., Moya-Roque, R., Meza-Montoya, A., Murillo-Gamboa, O. & Arguedas Gamboa, M. (2004). Manual para productores de Melina. Manual para productores de melina (*Gmelina arborea*) en Costa Rica. CATIE. Retrieved from [http://www.sirefor.go.cr/Documentos/Especies_plantaciones/MELINA/Manual para los productores de melina.pdf](http://www.sirefor.go.cr/Documentos/Especies_plantaciones/MELINA/Manual_para_los_productores_de_melina.pdf)
- Salas, R. & Cabral, E. (2014). Morfología polínica de *Staelia* s.l. (Rubiaceae). *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, 49(1), 51–65. Retrieved from http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-23722014000100006
- Sluchyk, V., Sluchyk, I. & Shyichuk, A. (2014). Assessment of both environmental cytotoxicity and trace metal pollution using *Populus simonii* Carr. as a bioindicator. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(10), 6645–6650. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-3879-2>
- Souza, E. H., Souza, F. V.D., Rossi, M. L., Packer, R. M., Cruz-Barros, M. A. V. & Martinelli, A. P. (2017). Pollen morphology and viability in Bromeliaceae. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 89(4), 3067–3082. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170450>
- Tangmitcharoen, S. & Owens, J. (1997). Floral Biology, Pollinization, pistil Receptivity, and Pollen-tube growth of teak (*Tectona grandis* Linn f). *Annals of Botanical*, 79, 401–410.
- Tenorio, C., Moya, R., Arias-Aguilar, D. & Briceño-Elizondo, E. (2016). Biomass yield and energy potential of short-rotation energy plantations of *Gmelina arborea* one

year old in Costa Rica. *Industrial Crops and Products*, 82, 63–73.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.005>

Valladares, F., Wright, J., Lasso, E., Kitajima, K., & Pearcy, R. (2000). Plastic phenotypic response to light of 16 congeneric shrubs from a Panamanian Rainforest. *Ecological Society of America*, 81, 1925-1936.

Villamizar, M., Rodríguez, N., & Terraza, W. (2012). Phenotypic Plasticity in Plants of *Lippia dulcis* (Verbenaceae). *Acta biol. Colomb*, 17, 363 -378.

Volk, G. (2011). Collecting plant genetic diversity: Technical guidelines: Chapter 25 Collecting pollen for genetic resources conservation. *National Center for Genetic Resource Preservation*, 10.

Zeaser, D. (1998). Programa de mejoramiento genético de la Ston Forestal en la zona sur de Costa Rica. En: Seminario. Aumento de la rentabilidad de las plantaciones forestales: un reto ligado al uso de semilla de alta calidad. San José, Costa Rica.

9. Anexos

Anexo 1. Clases de formas y relaciones entre el eje polar (P) y la amplitud total (E) de los granos en la vista ecuatorial¹.

Forma	P/E	100 * P/E
Peroblato	< 4/8 (0.50)	< 50
Oblato	4/8 - 6/8 (0.50 - 0.75)	50 - 75
Subesferoidal	6/8 - 8/6 (0.75 - 1.33)	75 - 133
Suboblato	6/8 - 7/8 (0.75 - 0.88)	75 - 88
Oblato esferoidal	7/8 - 8/8 (0.88 - 1.00)	88 - 100
Prolato esferoidal	8/8 - 8/7 (1.00 - 1.14)	100 - 114
Subprolato	8/7 - 8/6 (1.14 - 1.33)	114 - 133
Prolato	8/6 - 8/4 (1.33 - 2.00)	133 - 200
Perprolato	> 2.00	> 200

¹ Erdtman, G. (1986). Pollen morphology and plant taxonomy. E.J. Brill. Retrieved from [https://books.google.co.cr/books?hl=es&lr=&id=e-QUAAAIAAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=Erdtman,+G.+1952.+Pollen+morphology+and+plant+taxonomy:+Angiosperms+\(An+introduction+to+Palinology\).+Leiden:+E.J.+Brill+\(Reprinted+in+1986\).+553p.&ots=zPfs3FAnty&sig=DGAGVgod9vOg](https://books.google.co.cr/books?hl=es&lr=&id=e-QUAAAIAAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=Erdtman,+G.+1952.+Pollen+morphology+and+plant+taxonomy:+Angiosperms+(An+introduction+to+Palinology).+Leiden:+E.J.+Brill+(Reprinted+in+1986).+553p.&ots=zPfs3FAnty&sig=DGAGVgod9vOg)

Anexo 2. Tamaño de los granos basado en el eje más largo¹.

Tamaño	Longitud (µm)
Muy pequeño	< 10
Pequeño	10 - 25
Mediano	25 - 50
Grande	50 - 100
Muy grande	100 - 200
Gigante	> 200

¹ Erdtman, G. (1986). Pollen morphology and plant taxonomy. E.J. Brill. Retrieved from [https://books.google.co.cr/books?hl=es&lr=&id=e-QUAAAAIAAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=Erdtman,+G.+1952.+Pollen+morphology+and+plant+taxonomy:+Angiosperms+\(An+introduction+to+Palinology\).+Leiden:+E.J.+Brill.+\(Reprinted+in+1986\).+553p.&ots=zPfs3FAnty&sig=DGAGVgod9vOg](https://books.google.co.cr/books?hl=es&lr=&id=e-QUAAAAIAAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=Erdtman,+G.+1952.+Pollen+morphology+and+plant+taxonomy:+Angiosperms+(An+introduction+to+Palinology).+Leiden:+E.J.+Brill.+(Reprinted+in+1986).+553p.&ots=zPfs3FAnty&sig=DGAGVgod9vOg)

Anexo 3. Determinación del tamaño de los granos basado en el índice de área polar o índice de apocolpio².

Tamaño	L/A
Pequeño	< 0.35
Grande	> 0.35

² Huysmans, S., Robbrecht, E. & Smets, E. (1994). Are the genera *Hallea* and *Mitragyna* (Rubiaceae- Coptosapelteae) pollen morphologically distinct?, 39, 321–340.