

FACTORES QUE AFECTAN LA GERMINACION DEL POLEN  
DEL CACAO IN VITRO

Por

Jacinto Varas A.

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA  
Centro Tropical de Investigación y Enseñanza para Graduados  
Turrialba, Costa Rica

Septiembre, 1961

FACTORES QUE AFECTAN LA GERMINACION DEL POLEN  
DEL CACAO IN VITRO

Tesis

Sometido al Consejo de Estudios Graduados  
como requisito parcial para optar el grado

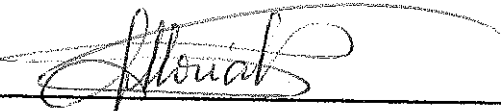
de

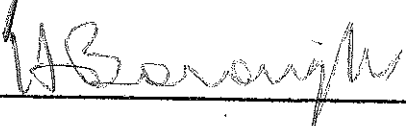
Magister Agriculturae

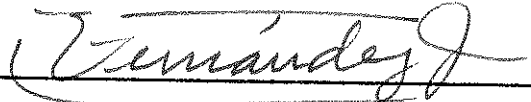
en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA

APROBADO:

  
\_\_\_\_\_ Consejero

  
\_\_\_\_\_ Comité

  
\_\_\_\_\_ Comité

Septiembre de 1961

DEDICATORIA

A mi amada esposa

## AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar sus agradecimientos a los miembros de su Comité Consejero Dr. Carlos E. Fernández y Dr. Howard Boroughs por su asesoramiento y en forma especial a su Consejero principal Dr. Jorge Soria, bajo cuya dirección se llevó a cabo el presente trabajo.

Al American Cacao Research Institute por haberle brindado la oportunidad de realizar estudios postgraduados.

A aquellos miembros del personal del Instituto que prestaron su gentil colaboración durante la realización del presente trabajo.

BIOGRAFIA

El autor nació en la ciudad de Guayaquil, Ecuador, en el año 1935.

Realizó sus estudios universitarios en la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad de Guayaquil, graduándose de Ingeniero Agrónomo en 1960.

Ingresó al Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas en Julio de 1960 para realizar estudios post-graduados, mediante una beca del American Cacao Research Institute, egresando en Septiembre de 1961.

## TABLA DE CONTENIDO

	<u>Página</u>
INTRODUCCION . . . . .	1
REVISION DE LITERATURA . . . . .	3
MATERIALES Y METODOS . . . . .	12
RESULTADOS . . . . .	16
DISCUSION . . . . .	25
CONCLUSIONES . . . . .	29
RESUMEN . . . . .	30
SUMMARY . . . . .	32
LITERATURA CITADA . . . . .	34
APENDICE . . . . .	38

## INTRODUCCION

En general la viabilidad del polen de las plantas cultivadas es relativamente corta en estado natural, variando de pocos días a períodos de horas solamente. Mediante condiciones controladas se ha logrado prolongar su longevidad para efectuar hibridaciones entre plantas que florecen en momentos diferentes, o también para preservarlo de una estación a otra con fines similares.

En cacao como en otras plantas, existen peligros de introducir enfermedades o plagas por el transporte de materiales de propagación entre centros de investigación de algunos países. Esos peligros podrían evitarse en parte, usando polen viable como material de intercambio, ya que hasta el momento no se ha demostrado que se transmitan agentes patógenos por ese medio.

La viabilidad del polen de cacao dura de dos a tres días, cuando una flor es removida del árbol y mantenida en condiciones no controladas (6). Con el objeto de prolongar la longevidad del polen, se han ensayado algunos sistemas de almacenaje y conservación, regulando la temperatura y humedad relativa en recipientes cerrados (9) (34), y en ampollas selladas con un ambiente gaseoso apropiado, deshidratándolo previamente por congelamiento intenso y rápido (17)(19).

Algunos investigadores han utilizado pruebas de germinación in vitro para el polen de cacao, usando medios nutritivos con sustancias y concentraciones diferentes. Las pruebas preliminares de germinación con polen fresco han dado resultados paralelos a los obtenidos con las mismas muestras en polinizaciones controladas (34); pero en pruebas con muestras de polen conservadas a temperaturas

bajas, los resultados obtenidos no guardan relación con los de las polinizaciones con el mismo polen (9) (34).

Es por tanto necesario contar con una prueba de germinación in vitro para el polen de cacao conservado, que exprese toda su potencialidad de germinación y refleje en lo posible la respuesta in vivo cuando sea usado en hibridaciones controladas. Una prueba así complementaría los métodos de almacenaje y conservación.

Los principales objetivos del presente trabajo han consistido en:

- a) Estudiar la influencia individual de las principales sustancias nutritivas y reguladoras de crecimiento que afectan la germinación in vitro del polen de cacao fresco y conservado a bajas temperaturas.
- b) Comparar la eficiencia del medio determinado en a) con otras pruebas de viabilidad usadas comunmente y con la germinación in vivo en estigmas.

Los trabajos se realizaron en el Centro Tropical de Investigación y Enseñanza del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas en Turrialba, Costa Rica, durante los nueve primeros meses de 1961.



## REVISION DE LITERATURA

Numerosas investigaciones se han hecho para determinar un medio de cultivo artificial apropiado para medir en forma simple y confiable la germinabilidad del polen de algunas plantas. Se encuentran trabajos específicos con polen de especies, variedades y clones de una misma especie. La experiencia ha mostrado que los requerimientos nutritivos del substrato germinativo no son iguales para todas las plantas. Para claridad en la exposición, se presenta la revisión de literatura dividida en las siguientes partes:

Medios de cultivo para la germinación del polen de algunas plantas.

Las investigaciones tendientes a obtener un medio de germinación apropiado para el polen de una planta cualquiera, tienen diversas finalidades: determinar la capacidad germinativa de una muestra de polen conservada de una estación a otra, de una muestra de polen para hibridar una variedad que florece más tarde, estudiar problemas de esterilidad, partenocarpia, efecto de sustancias reguladoras de crecimiento, etc.

Para el polen de maíz (Zea mays) el medio nutritivo más apropiado para determinar su capacidad germinativa según Bair y Loomis (3) es: agar 0.7% y sucrosa 15%. El polen se distribuye sobre una gota de medio transferida a un portaobjeto y dejada esparcir y endurecer previamente para formar una lámina de 1 cm. de diámetro; así se obtuvo alrededor de 90% de germinación. Este medio provee una relación próxima a la isotónica entre el medio nutritivo y el citoplasma, con el balance ligeramente hacia el lado hipotónico para que el grano de

polen pueda absorber agua para el crecimiento del tubo, pero no tan rápido que cause su rompimiento o explosión.

Warnock y Hagerdorn (38) encontraron que para arveja (Pisum sativum L.) el mejor medio de germinación del polen fue agar 1%, sucrosa 15% y pH 7.0. La adición de extracto de levadura al medio de germinación produjo un estímulo en el crecimiento del tubo polínico.

King y Johnson (20) estudiando los factores que afectan la germinación del polen de papa (Solanum tuberosum) en condiciones artificiales, anotan que la combinación más favorable de condiciones incluye el secado del polen por 3 a 6 horas a 90°F y la siembra en un medio de 2% de agar USP #1 laminar y 15% de sucrosa, por un mínimo de 12 horas a 60°F, y con una humedad relativa próxima a la saturación.

Para palma africana (Elacis guineensis; Jacq.) Broekmans (5) obtuvo buenos resultados cultivando polen sobre portaobjetos revestidos con agar-maltosa (2% de maltosa más 1.5% de agar). Se obtuvo la máxima germinación después de 5 horas, el grano de polen fue fijado y teñido aplicando una gota de lactofenol con fucsina ácida.

La germinación del polen del olivo (Olea europaea) fue estudiada por Zito y Spina (39), mediante las técnicas de la gota colgante de Tieghem y la del deslizamiento de Belling. Usaron varias soluciones de azúcares en diez variedades de olivos. Concluyen que la mejor solución es la de sucrosa al 15% y que el método de Belling es superior.

O'Kelley (23) estudió la influencia de los hidratos de carbono en el crecimiento y respiración del tubo polínico in vitro empleando tres especies vegetales y carbono radioactivo. Se comparó el crecimiento del tubo polínico en soluciones equimolares de diferentes

azúcares y derivados, en relación a sucrosa. El polen de una variedad de jazmín germinó en soluciones de niveles uniforme de **sucrosa-C<sup>14</sup>**, glucosa-C<sup>14</sup> y fructuosa-C<sup>14</sup>. Los azúcares suplidos externamente fueron absorbidos y utilizados en la respiración.

Estudiando la fisiología del polen de trébol (Trifolium pratense) Martin (27) observó que estalla casi instantáneamente cuando se pone en contacto con el agua. Señala que un medio adecuado debe controlar la absorción de agua. Soluciones azucaradas conteniendo agar o gelatina, producen menos rompimiento. El mejor medio para la germinación de polen de T. híbrido y T. repens, fue 2 a 5g de gelatina añadidos en una solución de sucrosa (0.731 N.). Esto indica que la función de la solución azucarada es controlar la absorción de agua.

Uso de sustancias reguladoras de crecimiento en el substrato germinativo del polen.

La adición de sustancias reguladoras de crecimiento al substrato germinativo ha merecido considerable atención. Addicott (1) informó los resultados de 33 sustancias reguladoras de crecimiento probadas en germinación de polen y crecimiento del tubo polínico de Tropaeolum y Milla. Encontró que 16 sustancias incrementaron significativamente la germinación o crecimiento del tubo polínico. Los resultados presentados indicaron que la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico son al menos en parte fisiológicamente independientes. Ciertas sustancias pueden afectar un proceso y no el otro.

Vasil (35) estudió la germinación del polen de algunas Cucurbitáceas. En las pruebas de germinación contó al azar 100 a 200 granos en grupos de 25 o más en diferentes campos ópticos, encontrando en el

mismo medio un rango de variación en la germinación de 5 a 12%. Los resultados sugieren que la germinación es estimulada con concentraciones muy bajas de varias sustancias reguladoras de crecimiento (ácido 3-indolacético, ácido indolpropiónico, 2:4-diclorofenoxiacético, etc.).

Smith (32) informó que para Antirrhinum majus y Bryophyllum daegremontianum, las concentraciones de auxinas menores que 200 ppm. mostraron un efecto estimulante, en contraste con las concentraciones más fuertes que manifestaron ser tóxicas. Encontró que el uso del polen de una sola flor para la siembra de los cultivos, era esencial para controlar la variación en la germinación del polen.

Raghavan y Baruah (30) cultivaron polen de areca (Areca catechu L.) en 0.75% de sucrosa y varias concentraciones de 4 auxinas, 3 vitaminas y trazas de 7 elementos. La germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico fue estimulado considerablemente por ácido bórico, ácido para-aminobenzoico y cloruro aúrico.

Loo y Hwang (21) estudiaron el estímulo que causan, el sulfato de manganeso, ácido 3-idolacético y colchicina en la germinación del polen y crecimiento del tubo polínico de Antirrhinum majus y otras especies. Encontraron que la germinación fue marcadamente acelerada por el sulfato de manganeso en concentraciones de  $10^{-4}$  M. hasta  $10^{-10}$  M. La colchicina en bajas concentraciones estimula el crecimiento del polen, pero no en concentraciones altas. El ácido 3-indolacético en bajas concentraciones fue menos efectivo que las dos sustancias anteriores.

Resnik (29) encontró que en polen de citrus la adición de 2:4-D, A.I.B., tiamina y ácido bórico a una solución de 15% de sucrosa incrementó la germinación de 10 a 50%.

El efecto del ácido giberélico (AG) sobre la germinación y crecimiento del tubo polínico fue estudiado por Chandler (7), utilizando polen de 27 plantas representativas de 16 familias diferentes. Los cultivó en medio agar-sucrosa al cual adicionó AG en concentraciones de 31.25 a 1.000 ppm. El polen de 9 plantas no germinó sobre el testigo y no fue estimulado con la adición de AG. El polen de 10 plantas germinó en todos los medios pero el crecimiento del tubo fue inhibido con las adiciones de AG las que causaron formación de tubos polínicos en espirales, abultamiento del ápice del tubo y exudaciones del citoplasma. El polen de 1 planta no germinó en el testigo, pero dió buena germinación en el medio con AG. El polen de 7 plantas mostró incremento en el porcentaje de germinación y en la elongación del tubo polínico cuando se añadió AG al medio.

Bose (4) encontró que el AG no produjo efecto estimulante en la germinación del polen de Pisum sativum, pero a 0.05 ppm. la longitud del tubo polínico fue siete veces mayor que la del control y declinó gradualmente hasta que a 500 ppm. fue ligeramente menor.

Kato (16) encontró que el AG aceleró marcadamente la germinación del polen y crecimiento del tubo polínico de Lilium longiflorum, Anota que los efectos fisiológicos del AG son muy diferentes a los del ácido 3-indolacético.

#### Efecto del boro en la germinación del polen.

Estudiando la acción del ácido bórico Munzner (28) encuentra que estimuló la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico en más de 60 especies de angiospermas y también en algunas gimnospermas.

Este papel tan importante del boro se apoya en la hipótesis de Gauch y Dugger (13) por la cual el boro con el azúcar reaccionan para formar un complejo borato-azucarado (ionizable) que se mueve a través de las membranas celulares más fácilmente que las moléculas de azúcar no ionizables.

O'Kelley (22) hizo una comparación del efecto del boro sobre el crecimiento, toma de oxígeno y absorción de azúcar, en la germinación del polen de jazmín (Tecoma radicans (L.) Juss). Encontró que la toma de oxígeno y la absorción de azúcar son estimulados por la adición del boro hasta concentración de 100 ppm. La respuesta similar de polen con sucrosa, glucosa y fructosa a los efectos del boro sobre los procesos de toma de oxígeno y absorción de azúcares, indican una estrecha relación entre los dos procesos. Por otro lado, el efecto del boro sobre la elongación del tubo polínico aparece muy diferente y se concluye que tiene un papel específico en el crecimiento del tubo polínico, el cual no es estrechamente correlacionado con ningún efecto del boro sobre absorción de azúcar o respiración.

Visser (36) estudió los requerimientos de germinación del polen de manzanos y perales. La cantidad de boro presente en el medio determinó el porcentaje de germinación y el largo del tubo polínico. La relativa influencia del ácido bórico sobre la velocidad de germinación fue positivamente correlacionada con temperatura y negativamente correlacionada con concentraciones de azúcar.

#### Otras pruebas de viabilidad de polen.

Para probar la viabilidad del polen, además de la prueba de germinación en medio agar-sucrosa, se han empleado pruebas químicas basadas

en el uso de reactivos o colorantes. Ostapenkó (26) estudió la viabilidad del polen de manzanos y perales, almacenado por 10 a 15 días y por 12 meses. Empleó tres métodos: germinación en 10% de azúcar, tinción con aceto-carmin y prueba de la peroxidasa. Los resultados mostraron que la germinación en solución de azúcar dió una indicación razonable de la viabilidad.

King (28) describe la prueba de la peroxidasa e indica que se basa en la oxidación de la benzidina por la peroxidasa en presencia del peróxido de hidrógeno. Anota que la reacción es típica para ciertas plantas pero puede ser totalmente opuesta en algunos casos.

Jacopini (15) estudió la viabilidad del polen con biselenito de sodio a 2%. Los granos con germinación completa tomaron un color rojo-ladrillo, los de poder germinativo débil se tornaron amarillo pálido y los granos no viables no cambiaron de color.

Los estudios de germinación de polen de varios frutales realizados por Porlingh (26) muestran que la prueba de cloruro de tetrasolio (C.T.T.) no dió una estimación exacta o segura del porcentaje de germinación, en comparación con la prueba de agar-sucrosa. La germinación del polen después de ocho meses de almacenado fue marcadamente reducida, mientras que la capacidad de tinción fue la misma.

#### Trabajos sobre viabilidad y germinación de polen de cacao.

En cacao el trabajo más antiguo informando sobre pruebas de germinación de polen in vitro, es el de Haigh en 1931 (14), quien estudió polen de árboles estériles en medio de agar 1.5% en cajas de Petri. Encontró para el polen proveniente de árboles normales 72.4% de germinación y 0.32% para los estériles.

Vos (37) informó sobre un estudio corto de germinación de polen de cacao en Java. Indica que el mejor medio de germinación es 1.5% de agar y 4% de glucosa, empleando la técnica de la gota colgante en un ambiente bien provisto de oxígeno.

Polania (25) empleó como medio de siembra agar 1.5% glucosa 5% y pH 5.5, en portaobjetos con anillos de vidrio colocados en cajas de Petri con papel filtro humedecido.

Vallecilla (33) estudió el efecto de los fertilizantes aplicados al suelo y sustancias reguladoras de crecimiento sobre la germinación del polen de cacao y crecimiento del tubo polínico. Utilizó el medio de germinación empleado por Polanía y encontró respuestas favorables en el polen con adiciones de ácido para-clorofenoxi-acético, vitamina B<sub>1</sub> y glicerofosfato de cal.

Arango (2) y Esquivel (11) también utilizaron el medio de Polanía. El primero estudió el efecto del zinc sobre el polen de cacao y encontró que su adición en concentraciones de 0.05 a 10 ppm. manifestaba ser estimulante. El segundo estudió el efecto del boro, encontrando que de 8 a 10 ppm. estimulaba el crecimiento del tubo polínico.

Para probar la viabilidad de polen de cacao conservado a temperatura de 30°C bajo cero por espacio de una a cuatro semanas, Denys (9) empleó como medio de germinación agar 1.5%, dextrosa 5% y pH entre 5 y 5.5. En investigaciones similares Varas (34) usó 2% de agar (USP #1 laminar) y 5% de sucrosa, para determinar la viabilidad de polen de cacao conservado a temperaturas de 5°C y 20°C bajo cero, por espacio de una a nueve semanas. Ambos informan que las muestras de polen conservadas tenían aceptable capacidad de fecundación en



polinizaciones en el campo, pero no germinaron in vitro, por lo cual sugieren investigaciones que aclaren este problema.

## MATERIALES Y METODOS

Para el estudio individual de los principales factores que afectan la germinación del polen de cacao in vitro, se utilizó polen del clon U.F.Co.-221. Se estudiaron, en experimentos separados, las respuestas de polen tratado en varias formas: a) polen fresco proveniente de flores de un día; b) polen conservado por una semana a 4°C de acuerdo al método descrito por Varas (34), que consiste en almacenar flores colectadas durante el primer día de abiertas en tubos de ensayo cerrados con tapones de corcho, conteniendo una cuarta parte de cloruro de calcio anhidro ( $Cl_2Ca$ ), aislado o separado de las flores por un pedazo de algodón; c) idém a 17-20°C. bajo cero. Estas temperaturas se obtuvieron mediante un refrigerador.

Para las pruebas de germinación de polen se usó 20 ml. de medio agar-sucrosa contenidos en cajas de Petri. En estas condiciones la humedad relativa se encuentra próxima a la saturación y actúa favorablemente para la germinación del polen.\*

La siembra del polen se hizo rozando suavemente una antera sobre el medio de cultivo, con una pinza de punta fina y curva. Los porcentajes de germinación fueron determinados contando 50 granos pertenecientes al polen de una antera en cada una de dos áreas escogidas al azar. En cada campo óptico, para evitar una posible influencia personal, se contaron los granos de polen germinados de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo, registrándolos con un contador de mano.

---

\* KING, J.R. Comunicación personal. Estación Experimental Tropical, Pichilingue, Ecuador, 1960.

Con el objeto de hacer los recuentos después de un período de tiempo igual en cada caso, se detuvo la germinación a las cinco horas de sembrado el polen aplicando gotas de lactofenol con anilina azul. La magnificación usada fue X 125.

Se hizo una serie de experimentos para estudiar el efecto de cada factor del substrato germinativo usando diseños irrestrictamente al azar con seis repeticiones. Los datos se expresaron en porcentajes de polen germinado, obtenidos en la forma descrita. En los análisis estadísticos esos porcentajes se transformaron en grados mediante la transformación  $p = \sin^2 \theta$ . A continuación se describen los experimentos reali<sup>zados</sup> tanto en el estudio de los factores concernientes al medio de germinación, como en el ensayo comparativo de pruebas de viabilidad y germinación de polen.

#### Factores concernientes al medio de germinación.

- 1.- El efecto de diferentes concentraciones de sucrosa (químicamente pura): 2, 5, 10 y 15 por ciento.
- 2.- El efecto de diferentes concentraciones de agar (USP #1 granular): 0.5, 1, 2 y 3 por ciento.
- 3.- El efecto de diferentes niveles de acidez desde pH4.5 a pH7.0. El pH se ajustó con el medio caliente (40 a 50°C) utilizando un potenciómetro y ácido láctico e hidróxido de sodio.
- 4.- Combinación de los tres factores anteriores (Sucrosa, agar y pH) con dos niveles de cada uno, mediante un experimento factorial en un diseño irrestrictamente al azar con seis repeticiones.

- 5.- El efecto del ácido 3-indolacético, ácido giberélico y ácido bórico (químicamente puros) en diferentes concentraciones: 1, 10, 20, 50 y 100 ppm.
- 6.- El efecto de la adición de extractos de estilos y estigmas de cacao. Los extractos se prepararon con agua caliente en la forma descrita por Sanclemente (31).

Comparación de pruebas de viabilidad, germinación in vitro y germinación in vivo de polen de cacao.

Este ensayo se hizo tomando en cuenta que era conveniente evaluar el medio de germinación determinado en los experimentos anteriores, comparándolo con otras pruebas de viabilidad y de germinación de uso frecuente, y principalmente con la prueba de germinación in vivo que sería la que revela más claramente la germinación real al estado natural. Las pruebas comparadas fueron:

- 1.- Medio de germinación más apropiado para cada tipo de polen, determinado en los experimentos anteriores.
- 2.- Medio de germinación comunmente usado en cacao (2) (11) (25) (31) (33) (37): agar 1.5%, glucosa 5% y pH entre 5 y 5.5.
- 3.- Prueba de la peroxidasa. Descrita por King (18), consiste en una mezcla de 15 ml. de agar 2%, peróxido de hidrógeno 5 ml. y solución de benzidina 1.8 ml. La caja de Petri conteniendo este medio se guarda en un refrigerador hasta que se torne ver de azulado (5 a 10 minutos). Inmediatamente se siembra el polen y se determina la viabilidad entre 5 a 15 minutos después de sembrado. El polen de cacao teñido de azul es viable, no así el que no se tiñe.

- 4.- Prueba de lactofenol con anilina azul (tiñe de azul los granos de polen maduros y normales).
- 5.- Prueba de iodo ioduro de potasio (tiñe de amarillo oscuro los granos de polen maduros y normales).
- 6.- Germinación in vivo, haciendo preparaciones citológicas de estilos y estigmas de flores polinizadas artificialmente, siguiendo el método de Nebel citado por Cope (8) pero sin aplastar ("squash") la preparación. El estilo y estigma se extrae con una pinza después de 4 a 5 horas de la polinización y se sumerge en solución carnoy por medio minuto, se lava con agua y se coloca en un portaobjeto para teñirlo por 5 minutos con una gota de colorante (50 mg. de amarillo de Martins y 50 mg. de lacmoid en 100 ml. de agua); después de extraer el colorante con un papel secante se monta en una gota de agua. Los porcentajes de germinación se determinaron observando de 50 a 100 granos de polen en cada preparación. La observación microscópica se hizo con una magnificación de X 500.

## RESULTADOS

En esta sección se exponen los resultados de los experimentos sobre las principales sustancias que afectan la germinación in vitro del polen de cacao y los del ensayo comparativo de varias pruebas de viabilidad y germinación. Los datos, en porcentajes promedios de germinación, se presentan en cuadros incluyendo los tres tipos de polen estudiados (polen fresco, conservado a 4°C y a -17°C). Los resultados detallados de cada experimento, con sus observaciones y análisis estadísticos se agrupan en el apéndice.

Los resultados del estudio de varias concentraciones de sucrosa en el medio germinativo del polen de cacao se presentan en el Cuadro 1. Los análisis estadísticos mostraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos de polen fresco, no así para los de polen conservado. Los promedios unidos por una línea no difieren significativamente de acuerdo a las pruebas de intervalos múltiples y F múltiples de Duncan (10); por lo tanto para polen fresco las concentraciones de 5, 10 y 15% de sucrosa dan respuestas estadísticamente iguales, a la vez que superiores a la concentración de 2%. Las observaciones originales y los análisis estadísticos se presentan en los Cuadros 1, 2 y 3 del apéndice.

Los resultados de los experimentos sobre el efecto del agar en el medio germinativo se presentan en el Cuadro 2. La concentración de sucrosa a 15% es constante en los tratamientos y fue seleccionada del experimento anterior por haber presentado el por ciento promedio más alto de germinación para polen fresco. El pH del medio no fue regulado y como en el experimento anterior fluctuaba entre 6 y 6.5. No se

encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos de los tres tipos de polen. Las respuestas del polen de cacao a las concentraciones de agar estudiadas parecen indiferentes para su germinación. Pruebas preliminares entre agar USP #1 granular y laminar no dieron diferencias. Los datos originales y los análisis estadísticos se encuentran en los cuadros 4, 5 y 6 del apéndice.

CUADRO 1. Porcentajes promedios de germinación in vitro de polen de cacao en 4 concentraciones de sucrosa. Promedios de 6 repeticiones.

Tratamientos		Polen fresco	Polen conservado a	
Agar	Sucrosa		4°C	-17°C
2%	2%	73.3	26.8	15.0
2%	5%	87.0	37.0	5.6
2%	10%	89.3	28.5	16.5
2%	15%	92.3	21.8	5.6

Únicamente los tratamientos con polen fresco mostraron diferencias significativas.

CUADRO 2. Porcentajes promedios de germinación in vitro de polen de cacao en 4 concentraciones de agar. Promedios de 6 repeticiones

Tratamientos		Polen fresco	Polen conservado a	
Agar	Sucrosa		4°C	-17°C
0.5%	15%	51.8	40.3	18.1
1.0%	15%	61.8	32.5	25.6
2.0%	15%	61.1	37.8	19.1
3.0%	15%	53.1	26.5	7.1

Las diferencias entre los tratamientos no son significativas.

Los datos del efecto de la concentración de hidrogeniones (pH) sobre la germinación del polen de cacao se presentan en el Cuadro 3. Se mantuvieron constantes las concentraciones de agar y sucrosa. La germinación del polen fue inhibida a pH 4.5 y los porcentajes promedios de germinación fueron más altos desde pH 5.5 hasta 6.5. Se encontró diferencias altamente significativas en los tratamientos con polen fresco solamente. Los datos originales y los análisis estadísticos se presentan en los Cuadros 7, 8 y 9 del apéndice

CUADRO 3. Porcentajes promedios de germinación in vitro de polen de cacao en 6 niveles de pH. Promedios de 6 repeticiones

Medio: agar 2% sucrosa 10%.		Polen fresco	Polen conservado a	
			4°C	-17°C
pH	4.5	0.0	0.0	0.0
	5.0	57.6	28.1	5.3
	5.5	67.0	36.0	7.8
	6.0	86.8	49.3	5.0
	6.5	76.1	32.1	8.1
	7.0	72.8	25.8	3.0

Los promedios unidos por una misma línea son estadísticamente iguales.



Los porcentajes promedios de la combinación de tres factores del medio germinativo (sucrosa, agar y pH) estudiados en un experimento factorial dos por tres, se presentan en el Cuadro 4. De cada factor se seleccionaron dos niveles: sucrosa 10 y 15%, agar 1 y 2%, pH 5.5 y 6.5. Se encontraron diferencias altamente significativas en los tratamientos con polen fresco, pero no en los tratamientos con polen conservado. La subdivisión de grados individuales de libertad de la suma de cuadrados de tratamientos indica que la sucrosa al 10% produjo las diferencias significativas (ver Cuadros 10, 11 y 12 en el apéndice).

CUADRO 4. Porcentajes promedios de germinación in vitro de la combinación de dos niveles de tres factores del medio germinativo. Promedios de 6 repeticiones

	Tratamientos			Polen fresco	Polen conservado a	
	Agar	Sucrosa	pH		40°C	-17°C
1)	1%	10%	5.5	91.5	31.1	38.1
2)	1%	10%	6.5	87.8	46.3	41.8
3)	1%	15%	5.5	84.1	29.3	45.1
4)	1%	15%	6.5	79.8	42.5	38.8
5)	2%	10%	5.5	91.6	21.5	34.3
6)	2%	10%	6.5	85.8	29.8	37.3
7)	2%	15%	5.5	69.0	24.5	34.0
8)	2%	15%	6.5	77.8	38.1	32.8

Únicamente los tratamientos con polen fresco mostraron diferencias altamente significativas.

Tratamientos	(7)	(8)	(4)	(3)	(6)	(2)	(1)	(5)
Promedios:	69.0	77.8	79.8	84.1	85.8	87.8	91.5	91.6

Los datos del efecto de varias concentraciones de ácido 3-indolacético sobre la germinación in vitro del polen de cacao se presentan en el Cuadro 5. Las concentraciones de 50 y 100 ppm. inhiben la germinación del polen fresco y tratado. El efecto inhibitorio gradual se aprecia mas en los tratamientos con polen fresco, en cambio los tratamientos con polen conservado parecen menos sensibles en sus respuestas. Detalles de las observaciones y análisis estadísticos se presentan en los Cuadros 13, 14 y 15 del apéndice.

CUADRO 5. Porcentajes promedios de germinación in vitro del polen de cacao en 6 concentraciones de ácido 3-indolacético. Promedios de 6 repeticiones

Concentraciones de ácido 3-indolacético	Polen fresco	Polen conservado a	
		4°C	-17°C
0 ppm.	65.3	41.3	20.3
1	79.5	38.3	18.6
10	31.8	22.1	21.3
20	11.3	1.0	26.1
50	0.0	0.0	0.0
100	0.0	0.0	0.0

Los promedios unidos por una misma línea no difieren significativamente.

Los resultados del efecto de diferentes concentraciones de ácido giberélico y ácido bórico se presentan en los Cuadros 6 y 7 respectivamente. En ambos casos no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, tanto para el polen fresco como para el tratado. Los resultados detallados y los análisis estadísticos se presentan en los Cuadros 16, 17, 18, 19, 20 y 21 del apéndice.

CUADRO 6. Porcentajes promedios de germinación in vitro del polen de cacao en 6 concentraciones de ácido giberélico. Promedios de 6 repeticiones

Concentración de ácido giberélico	Polen fresco	Polen conservado a	
		4°C	-17°C
0 ppm.	79.8	11.3	39.1
1	80.1	15.6	46.1
10	78.6	20.3	46.6
20	82.6	16.3	45.0
50	70.1	18.6	47.0
100	80.8	20.6	52.8

Las diferencias entre los tratamientos no son significativas.

En el Cuadro 8 se presentan los resultados del efecto de extractos de estilos y estigmas sobre la germinación in vitro del polen de cacao. Se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos de polen fresco únicamente. Los resultados en detalle y los análisis estadísticos se presentan en los Cuadros 22, 23 y 24 del apéndice.

CUADRO 7. Porcentajes promedios de germinación in vitro del polen de cacao en 6 concentraciones de ácido bórico. Promedios de 6 repeticiones

Concentraciones de ácido bórico	Polen fresco	Polen conservado de	
		4°C	-17°C
0 ppm.	90.8	22.0	31.0
1	92.1	42.3	35.6
10	90.3	37.0	42.8
20	93.6	18.0	27.5
50	89.5	25.6	23.5
100	86.8	15.0	20.6

Las diferencias entre los tratamientos no son significativas

CUADRO 8. Porcentajes promedios de germinación in vitro del polen de cacao en extractos de estilos y estigmas. Promedios de 6 repeticiones

Tratamientos	Polen frescos	Polen conservado a	
		4°C	-17°C
Agar 2%, sucrosa 10%, pH 5.5 (Testigo)	85.3	11.3	39.1
Idem mas extracto	66.1	17.0	44.0

Unicamente los tratamientos con polen fresco mostraron diferencias significativas.

En el Cuadro 9 se presentan los resultados del ensayo comparativo de varias pruebas de germinación y viabilidad de polen. La comparación se hizo con muestras de cuatro tipos de polen de cacao. En los tres primeros tratamientos se dan porcentajes promedios de viabilidad de polen y en los tres últimos se dan porcentajes promedios de germinación. En las pruebas de viabilidad, se apreció varias tonalidades en la tinción de los granos de polen y se trató de establecer separaciones entre los grados de tinción, pero resultó muy difícil y inexacto, por lo cual se decidió tomar las observaciones de granos de polen coloreados y no coloreados, asumiéndose como viables a los primeros. El medio de germinación determinado en los estudios anteriores (tratamiento 5) incluye 1 y 10 ppm. de ácido bórico en las pruebas con polen conservado a 4°C y a 17°C bajo cero respectivamente; esas concentraciones mostraron una influencia favorable para la germinación del polen conservado (ver Cuadro 7), aunque no alcanzaron significación estadística.

El estudio con polen considerado muerto se hizo con muestras de polen provenientes de flores guardadas por una semana en condiciones no controladas. Las diferencias entre los tratamientos se expresan mediante líneas que unen los promedios que no difieren significativamente. Los datos originales y los análisis estadísticos se presentan en los Cuadros 25, 26, 27 y 28 del apéndice.

CUADRO 9. Comparación de varias pruebas de viabilidad y germinación con polen de cacao. Porcentajes promedios de germinación o presunta viabilidad. Promedios de 6 repeticiones.

Tratamientos	Polen fresco	Polen conservado a		Polen muerto +
		4°C	-17°C	
1) Prueba de iodo ioduro de potasio.....	100.0	100.0	99.8	87.0
2) Lactofenol con anilina azul.....	99.2	100.0	100.0	91.0
3) Prueba de la peroxidasa.....	96.0	98.0	97.2	16.3
4) Medio común: agar 1.5% glucosa 5% y pH 5.5	92.3	9.0	8.2	0.0
5) Medio determinado: agar 2%, sucrosa 10% y pH 5.5 <sup>++</sup>	93.2	30.7	24.2	0.0
6) Prueba de germinación <u>in vitro</u> .....	50.7	36.7	29.3	0.0

Los promedios unidos por una misma línea no difieren significativamente.

+ Proveniente de flores guardadas una semana en condiciones no controladas.

++ Se adicionó 1 y 10 ppm. de ácido bórico en las pruebas con polen conservado a 4°C y -17°C respectivamente.

## DISCUSION

La variación de los porcentajes de germinación fue alta dentro de las muestras de polen de cacao estudiadas, quizás debido a diferencias de edad entre las flores, pero no alcanzó a niveles de significación. Esto indica que las variaciones incontroladas de germinación del polen no afectan básicamente a los resultados. Resnick (29) encontró variaciones similares para polen de citrus y Smith (32) para polen de Anthirrinus majus y Bryophylum daegremontianum, y para reducir esta variación el último autor usó polen de una sola flor. En cambio Vasil (35) con polen de algunas cucurbitáceas tuvo un rango de variación de 5 a 12% solamente.

De los dos primeros factores estudiados, sucrosa y agar, la primera fue la más importante, ya que suministrada en concentraciones de 5 a 15% es favorable para la germinación del polen de cacao, en relación con la de 2%. El agar en las concentraciones probadas (0.5, 1, 2 y 3%) no influyó en forma marcada en el proceso estudiado; pero al 2% ofrece una consistencia más adecuada al medio germinativo.

La influencia del pH en el medio fue decisiva en la germinación del polen de cacao; a pH 4.5 inhibió completamente su germinación, alcanzó los más altos incrementos entre pH 5.5 y 6.5, para luego comenzar a descender a partir de pH 7.0.

El ácido 3-indolacético a las concentraciones de 50 y 100 ppm. inhibió la germinación del polen, pero no produjo estímulo a concentraciones menores, indicando que su papel fue menos importante en la germinación del polén usado en este trabajo. El ácido giberélico y el ácido bórico a concentraciones de 0, 1, 10, 20, 50 y 100 ppm. no

mostraron influencia favorable para la germinación del polen de cacao in vitro, tanto fresco como conservado. Sin embargo, las concentraciones de 1 y 10 ppm de ácido bórico muestran una tendencia a aumentar la germinación del polen conservado a 4°C y a 17°C bajo cero respectivamente (de 22.0 a 42.3% y de 31.0 a 42.8%), aunque sin alcanzar significación estadística.

Esquivel (11) encontró una influencia favorable del boro para la germinación del polen de cacao y también otros investigadores (22) (28) (36), informan iguales resultados para polen de otras plantas. Posiblemente el efecto favorable del boro se debe a que los complejos entre el boro y grupos hidroxilos juegan un papel importante en la formación de sustancias de la pared del tubo polínico, como lo propone Schmucker citado por Gauch y Dugger (12).

En este trabajo no se encontró ningún efecto claro atribuido a la adición de boro, lo cual posiblemente se debió a la contaminación que indudablemente causó el uso de vidrio Pyrex. Esta contaminación posiblemente fue suficiente para llenar las necesidades de boro del polen y nuevas adiciones no estimularon la germinación.

En el ensayo comparativo de varias pruebas de viabilidad y germinación (ver Cuadro 9), los porcentajes de germinación in vivo con polen conservado no difieren de los encontrados con las mismas muestras en germinación in vitro, en el medio de germinación determinado en el presente trabajo. Únicamente hubo diferencias con el polen fresco. Es posible que solamente los granos de polen morfológica y fisiológicamente normales germinan in vivo, debido a un control natural (posiblemente bioquímico, fisiológico-funcional ó genético) por selección.



Las condiciones artificiales del almacenamiento, probablemente eliminan los granos de polen que no reúnen las condiciones óptimas y solamente el polen restante germina dando resultados similares, tanto en las pruebas in vitro como in vivo.

Se hubiera podido esperar que la adición de extractos de estilos y estigmas al medio hubieran provisto de sustancias que favorezcan la germinación del polen, pero los resultados indican que causaron una inhibición en la germinación del polen fresco, Sanclemente (31) informó también de resultados similares cuando usó extracto de gineceo de un clon autoincompatible. El clon usado en este trabajo es autocompatible. Por otro lado, la autoincompatibilidad en cacao no inhibe la germinación del polen, sino únicamente la fusión de los núcleos del polen y del óvulo; por tanto, la inhibición del polen en este caso, puede provenir de la presencia en los extractos de sustancias o fitohormonas que impidan la germinación. Es probable también que el método de extracción usado no es el apropiado y que produjo cambios bioquímicos en el extracto que perjudiquen la germinación.

La viabilidad del polen de cacao determinada con las pruebas de iodo yoduro de potasio y lactofenol con anilina azul (de 99.2 a 100%), difiere marcadamente de los porcentajes de germinación determinados in vivo (de 29.3 a 50.7%), ya se trate de polen fresco o conservado a bajas temperaturas. Con polen considerado muerto que no germina in vivo ni in vitro, los porcentajes de viabilidad dados por las dos pruebas mencionadas están alrededor de noventa por ciento, lo cual confirma una respuesta inapropiada. Estos resultados apoyan lo propuesto por King (18) que las pruebas de coloración de polen dan resultados

que no se pueden asociar con viabilidad.

La prueba de la peroxidasa con polen fresco dió resultados similares a las pruebas de germinación estudiadas in vitro, y similares a las pruebas de coloración en los casos de polen conservado; sin embargo, siempre dió respuestas diferentes a las pruebas in vivo. La viabilidad de 16.3 por ciento que arrojó con polen considerado muerto, podría indicar que la enzima peroxidasa aún es capaz de oxidar la benzidina y colorear los granos de polen que todavía podrían estar vivos, pero que han perdido la capacidad de germinación por haber casi agotado sus energías en el proceso de respiración bajo las condiciones incontroladas del medio ambiente.

## CONCLUSIONES

Las principales conclusiones del presente trabajo son:

1. Para polen fresco de cacao el medio de germinación que se encontró más apropiada fue: 2% de agar (USP #1 granular), 10% de sucrosa y pH 5.5.
2. Pruebas de germinación in vivo dan porcentajes de germinación que no difieren significativamente con los obtenidos in vitro con polen conservado; pero sí difieren para polen fresco.
3. Para determinar la capacidad de germinación del polen de cacao conservado, se podría utilizar la prueba de germinación in vitro determinada en el presente trabajo, o la prueba in vivo que es relativamente de fácil ejecución.
4. Las pruebas de iodo yoduro de potasio y lactofenol con anilina azul, dan porcentajes de viabilidad que difieren significativamente con los porcentajes de germinación de las pruebas in vivo e in vitro.
5. La prueba de viabilidad de la peroxidasa y la prueba de germinación comunmente usada en cacao (agar 2%, glucosa 5%, pH 5 - 5.5) dan respuestas que difieren significativamente con la prueba de germinación in vivo.
6. Se sugieren investigaciones sobre las causas de la variación natural del polen de cacao en un árbol, entre árboles de un mismo clon, entre flores con diversas ubicaciones en un mismo árbol, etc.

## RESUMEN

Con el objeto de estudiar la influencia de las principales sustancias nutritivas (sucrosa y agar) y reguladoras de crecimiento (ácido 3-indolacético y ácido giberelico) que afectan la germinación del polen de cacao, se realizaron experimentos individuales para cada factor estudiado, empleando tres tipos de polen (clon U.F.Co. 221): recién colectado, conservado por una semana en tubos cerrados con cloruro de calcio anhidro a 4°C, e idem a 17°C bajo cero. La viabilidad se estimó en porcentajes de polen germinado.

El medio germinativo óptimo para polen de cacao determinado en los experimentos anteriores, fue evaluado mediante un ensayo comparativo incluyendo tres pruebas de viabilidad, la prueba de germinación in vitro comunmente empleada en cacao, y una prueba de germinación in vivo como base principal de comparación.

Los resultados experimentales indican que:

1. Las mejores concentraciones de sucrosa en el medio germinativo fueron: 5, 10 y 15%.
2. No hubo diferencias significativas entre cuatro concentraciones de agar USP. N°1 granular (0.5, 1, 2 y 3%), pero se prefirió usar la concentración de dos por ciento porque dió una consistencia más adecuada al medio de cultivo.
3. El rango mas apropiado de pH, entre seis niveles estudiados (4.5, 5.0, 5.5, 6.0, y pH 7.0), estaba entre 5.5 y pH 6.5.
4. Entre las combinaciones de dos niveles de agar (1 y 2%), sucrosa (10 y 15%) y pH (5.5 y 6.5), el mejor medio de germinación para el polen de cacao fue: agar 2%, sucrosa 10% y pH 5.5.

5. De seis concentraciones de ácido 3-indolacético y ácido giberélico (0, 1, 10, 20, 50 y 100 ppm.), ninguna estimuló la germinación del polen de cacao; las concentraciones de 50 y 100 ppm. de ácido 3-indolacético inhibieron completamente la germinación del polen.
6. Las concentraciones de 1 y 10 ppm. de ácido bórico se **manifestaron** estimulantes para la germinación del polen de cacao conservado a 4°C y a -17°C respectivamente (de 22.0 a 42.3% y de 31.0 a 42.8%).
7. Por la adición de extractos de estilos y estigmas al medio germinativo, se observó un ligero estímulo sobre la germinación del polen de cacao conservado, pero en cambio la germinación del polen fresco fue marcadamente reducida (de 85.3 a 66.1%).
8. La comparación entre varias pruebas de viabilidad y germinación, mostró que las pruebas iodo ioduro de potasio y lactofenol con anilina azul dieron una **respuesta** completamente diferente con respecto a la viabilidad del polen de cacao; que la prueba de la peroxidasa y el medio germinativo comunmente usado en cacao dieron respuestas dudosas y que el medio de germinación óptimo determinado en el presente trabajo, dió resultados similares al de la prueba de germinación in vivo para polen conservado, pero no para polen fresco.

## SUMMARY

In order to study the influence of the main nutritional (sucrose and agar) and growth regulating substances ( $\beta$ -indoleacetic acid and gibberellic acid) which affect the germination of cacao pollen, individual research was carried out for each factor under study, by using three types of pollen (U.F.Co. 221 clon): freshly collected, stored for a week in sealed tubes (with anhydrous calcium chloride) at 4°C, and idem at 17°C below zero.

The optimum germinating medium for cacao pollen as determined in the above mentioned experiments, was evaluated through a comparative test which included three viability tests, the germinating test commonly employed for cacao, and an in vivo germinating test as a basis for comparison.

## Experimental results:

1. Best sucrose concentrations in the germinating medium were: 5, 10 and 15%.
2. No significant differences were found among four agar concentrations (0.5, 1, 2, and 3%), but 2 percent agar concentration was preferred because it gives a more adequate consistency to the medium.
3. The most appropriate pH range, out of six pH levels studied (4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 and 7.0), was between pH 5.5 and 6.5.
4. Through the combination of two levels of agar (1 and 2%), sucrose (10 and 15%), and pH (5.5 and 6.5%) the best germinating medium for cacao pollen appears to be: agar 2%, sucrose 10% and pH 5.5.

5. None of six concentrations of 3-indoleacetic acid and gibberellic acid (0, 1, 10, 20, 50 and 100 ppm.), stimulated germination of cacao pollen; concentrations of 3-indoleacetic acid of 50 and 100 ppm. inhibited pollen germination completely.
6. Concentrations of 1 and 10 ppm. boric acid seemed to stimulate germination of cacao pollen preserved at 4°C and at -17°C respectively (from 22.0 to 42.3% and from 31 to 42.8%).
7. By the addition of styles and stigmas extracts to the germinating medium a slight stimulation on the germination of preserved cacao pollen was observed, but on the other hand, fresh pollen germination was markedly reduced (from 85.3 to 66.1%).
8. A comparison among several viability and germination tests made with cacao pollen, shows that the iodine-potassium iodide test and the lactophenol-anniline blue test give incorrect answers with respect to the viability of cacao pollen, the peroxidase test and the medium currently used for cacao pollen germination give dubious answers, and the best medium, as determined by the present experiments, gives results which are equal to the germination tests in vivo for preserved pollen, but not so for fresh pollen.

## LITERATURA CITADA

1. ADDICOTT, F.T. Pollen germination and pollen tube growth as influenced by pure growth substances. *Plant Physiology* 18(2):270-279. 1943.
2. ARANGO A., JAIME. Influencias del zinc sobre polinización y fecundación en cacao. *Cacao en Colombia* 4:85-120. 1955.
3. BAIR, R.A. & LOOMIS, W.E. The germination of maize pollen. *Science* 94(2432):168-169. 1941.
4. BOSE, N. Effect of gibberellin on the growth of pollen tubes. *Nature* 194:1577. 1959.
5. BROEKMANS, A.E. Studies of factors influencing the success of controlled pollination for the Oil Palm Research. *Journal of the West African Institute for Oil Palm Research*. 2(6):133-141. 1957.
6. CENTRO INTERAMERICANO DEL CACAO. Informe anual 1958. *Cacao (Turrialba, Costa Rica)* 4(1):15-16. 1959.
7. CHANDLER, C. The effect of gibberellic acid on germination and pollen-tube growth. Boyce Thompson Institute. *Contributions* 19(2):215-223. 1957.
8. COPE, F.W. Studies in the mechanism of self-incompatibility in cacao. I. Eight annual report on cacao research 1938. Trinidad. The Imperial College of Tropical Agriculture 1939. pp 20-21.
9. DENYS, GUSTAVO. Informe de mis actividades sobre cacao en el Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. 2.- Conservación y almacenamiento del polen de cacao. Turrialba, Costa Rica. 1960. pp 1-15.
10. DUNCAN, DAVID B. Multiple range and F. tests. *Biometrics* 2(1):1-42. 1955.
11. ESQUIVEL C., SILVIO. Influencia del boro sobre el crecimiento, desarrollo, polinización y fecundación del cacao. *Cacao en Colombia* 4:63-83. 1955.
12. GAUCH, H.C. & DUGGER, W.M. The physiological action of boron in higher plants: A review and interpretation. Maryland Agricultural Experimental Station. *Bulletin A-80 (Technical)* 43p. 1954.



13. \_\_\_\_\_ & DUGGER, W.M. The role of boron in the translocation of sucrosa. *Plant Physiology* 28(3):457-566. 1953.
14. HAIGH, J.C. Cacao pollination. *Tropical Agriculture (Trinidad)* 7(2):39. 1931.
15. JACOPINI, P. Sodium biselenite as a rapid indicator of pollen viability. (In Italian). *Riv. Ortoflorofruttic. ital.* 37:433-7. 1954. (Original no disponible). Abstract in: *Horticultural Abstracts*. 25(2):200. 1955.)
16. KATO, Y. Responses of plants cells to gibberellin. *Botanical Gazette* 117(1):16-24. 1955.
17. KING, J.R. The freeze-drying of pollens. *Economic Botany* 15(1):91-98. 1961.
18. \_\_\_\_\_ The peroxidase reaction as an indicator of pollen viability. *Stain Technology* 35(4):225-227. 1960.
19. \_\_\_\_\_ Report on preservation of cacao pollen. Pichilingue, Ecuador. *Estación Experimental Tropical*. 1960  
5p. (Informe mecanografiado)
20. \_\_\_\_\_ & JOHNSON, T.M. Factors affecting Irish potato pollen germination in an artificial environment. *American Potato Journal* 35(10):689-700. 1958.
21. LOO, T. & HWANG T. Growth stimulation by manganese sulfate, indole-3-acetic acid and colchicine in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany* 31(6):356-367. 1944.
22. O'KELLEY, J.C. Boron effects on growth, oxygen uptake and sugar absorption by germinating pollen. *American Journal of Botany* 44(3):239-244. 1957.
23. \_\_\_\_\_ External carbohydrates in growth and respiration of pollen tubes in vitro. *American Journal of Botany* 42(3):322-27. 1955.
24. OSTAPENCO, V.I. An evaluation of diferent methods of determining pollen viability (In Russian). *Bjul. nanc-tehn. Inform. Cent. gent. Labor. im. I.V. Micurina.* #2:38-41. 1956. (Original no disponible). Abstract in: *Horticultural Abstracts* 28(3)354. 1958.)

25. POLANIA T., HERNANDO. Germinación del polen de cacao, crecimiento del tubo polínico y cuajamiento.- Sus relaciones con el sombrero, el pH del estigma, estados del árbol y períodos estacionales. Acta Agronómica (Palmira, Colombia) 3(1): 9-39. 1953.
26. PORLINGH, I.K. Pollen germination studies in fruit trees. (In Greek) Ph.D. Thesis of the Univ. Thessaloniki, Coll. Agric., Hort. 1956. 32p. ilus. (Original no disponible. Abstract in: Horticultural Abstracts 26(4):503. 1956.)
27. MARTIN, J.N. The physiology of the pollen of Trifolium pratense. Botanical Gazette 56(2):133-36. 1913.
28. MUNZNER, R. Studies on the physiology of pollen germination and tube growth, with especial reference to the action of boric acid. (In German) Biol. 261., 79:59-84. 1960 (Original no disponible. Abstract in: Horticultural Abstracts 30(3):408. 1960.)
29. RESNIK, MAXIMO E. Fisiología y longevidad del polen en los citrus. Revista de Investigaciones Agrícolas (Buenos Aires) 12(3): 311-343. 1958.
30. RAGHAVAN, V. & BARUAH, H.K. On factors influencing fruit-set sterility in arecanut (Areca catechu L.) II. Germination of pollen grains and growth of pollen tubes under the influence of certain auxins, vitamins and trace elements, Phyton. 7:77-88. 1956. (Original no disponible. Abstract in: Horticultural Abstracts. 27(4):631. 1957.)
31. SANCLEMENTE P., MARIO. Problemas de incompatibilidad en cacao. Acta Agronómica (Palmira, Colombia) 3(1):65-88. 1953.
32. SMITH, P.F. Studies of growth pollen with respect to temperature, auxins, colchicine and vitamin B1. American Journal of Botany. 29(1):56-66. 1942.
33. VALLECILLA, A., CARLOS. La germinación del polen de cacao y el crecimiento del tubo polínico en relación con los fertilizantes, substancias menores, substancias activas y substancias menores. Acta Agronómica (Palmira, Colombia) 3(3): 189-208. 1953.
34. VARAS A., JACINTO. Conservación del polen de cacao y compatibilidad en cruces interclonales. Tesis. Ecuador, Universidad de Guayaquil. Facultad de Agronomía y Veterinaria. 1960. 73p. ilus. (Mecanografiada).

35. VASIL, I. K. Studies on pollen germination of certain cucurbitaceae. *American Journal of Botany*. 47(4):239-247. 1960.
36. VISSER, T. Germination and storage of pollen. *Meded Landb Hoogeschool Wageningen*, 55:9-68. 1955. (Original not available. Abstract in: *Horticultural Abstracts* 26(2):215. 1956.)
37. VOS, H.C. Germination of cacao pollen. *Chronica Naturae* 104(4):99-101. 1948.
38. WARNOCK, S.J. & HAGERDORN, D.J. Germination and storage of pea (*Pisum sativum* L.) pollen. *Agronomy Journal* 48(8):347-352. 1956.
39. ZITO, F. & SPINA, P. The germination of olive pollen (In Italian.) *Ital. Agric.* 93:415-425. 1956. (Original not available. Abstract in: *Horticultural Abstracts* 26(4):610. 1956.)

A P E N D I C E

CUADRO 1. Prueba de Sucrosa con Polen Fresco. Datos en porcentajes de germinación

	Tratamientos		Repeticiones						Total	$\bar{X}$
	Agar	Sucrosa	I	II	III	IV	V	VI		
(a)	2%	2%	88	86	63	63	69	71	440	73.33
(b)	2%	5%	91	95	82	86	81	87	522	87.00
(c)	2%	10%	90	94	92	90	81	89	536	89.33
(d)	2%	15%	82	92	95	94	95	96	554	92.33

Análisis de Variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.
Repeticiones	5	166.68	33.33	1.31
Tratamientos	3	762.81	254.27	8.63 <sup>++</sup>
Error	15	441.90	29.46	
Total	23	1371.39		

++ Significativo al 1%

$$S_m = 2.215$$

Tratamientos:	(a)	(b)	(c)	(d)
Promedios:	73.33	<u>78.00</u>	89.33	92.33

CUADRO 2. Prueba de sucrosa con polen conservado a 4°C. Datos en porcentajes de germinación

Tratamientos		Repeticiones						Total	$\bar{X}$	
Agar	Sucrosa	I	II	III	IV	V	VI			
(a)	2%	2%	41	25	35	29	16	15	161	26.83
(b)	2%	5%	42	20	27	37	50	46	222	37.00
(c)	2%	10%	64	27	49	9	10	12	171	28.50
(d)	2%	15%	13	18	24	23	23	30	131	21.83

Análisis de Variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.
Repeticiones	5	364.14	72.82	0.82
Tratamientos	3	290.40	96.80	1.09
Error	15	1323.92	88.26	
Total	23	1978.46		

CUADRO 3. Prueba de sucrosa con polen conservado a  $-17^{\circ}\text{C}$ . Datos en % de germinación

	Tratamientos		Repeticiones						Total	$\bar{X}$
	Agar	Sucrosa	I	II	III	IV	V	VI		
(a)	2%	2%	56	2	7	6	13	6	90	15.00
(b)	2%	5%	21	8	0	4	0	1	34	5.66
(c)	2%	10%	4	60	13	8	7	7	99	16.50
(d)	2%	15%	0	11	6	0	14	3	34	5.66

Análisis de variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G. L.	S.C.	C.M.	F
Repeticiones	5	626.12	125.22	0.76
Tratamientos	3	669.09	223.03	1.35
Error	15	2478.73	165.25	
Total	23	3773.94		

CUADRO 4. Prueba de agar con polen fresco de cacao. Datos en porcentajes de germinación.

	Tratamientos		Repeticiones						Total	$\bar{X}$
	Agar	Sucrosa	I	II	III	IV	V	VI		
(a)	0.5%	15%	88	65	37	82	21	18	311	51.83
(b)	1%	15%	96	84	80	73	22	16	371	61.83
(c)	2%	15%	85	78	48	72	40	44	367	61.16
(d)	3%	15%	73	87	78	56	11	14	319	53.16

Análisis de variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
Repeticiones	5	6.031.34	1.206.26	15.08 ++
Tratamientos	3	225.79	75.26	0.94
Error	15	1.199.57	79.97	
Total	23	7.456.64		

++ Significativo al 1%



CUADRO 5. Prueba de agar con polen conservado a 4°C.  
 Datos en porcentajes de germinación.

	Tratamientos		Repeticiones						Total	$\bar{X}$
	Agar	Sucrosa	I	II	III	IV	V	VI		
(a)	0.5%	15%	33	39	51	12	47	60	242	40.3
(b)	1%	15%	28	25	59	26	28	29	195	32.5
(c)	2%	15%	24	35	30	32	43	63	227	37.8
(d)	3%	15%	52	53	30	10	6	8	159	26.5

Análisis de Variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.
Repeticiones	5	546.46	109.29	0.928
Tratamientos	3	345.17	115.05	0.977
Error	15	11765.06	117.67	
Total	23	2.656.69		

CUADRO 6. Prueba de agar con polen conservado a  $-17^{\circ}\text{C}$ . Datos en porcentajes de germinación

	Medios		Repeticiones						Total	$\bar{X}$
	Agar	Sucrosa	I	II	III	IV	V	VI		
(a)	0.5%	15%	6	4	43	3	35	18	109	18.16
(b)	1%	15%	8	53	12	17	31	33	154	25.66
(c)	2%	15%	13	18	33	18	16	17	115	19.16
(d)	3%	15%	8	2	5	12	10	6	43	7.16

Análisis de variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
Repeticiones	5	366.61	73.32	0.809
Tratamientos	3	666.91	222.30	2.453
Error	15	1.359.16	90.61	
Total	23	2.392.68		

CUADRO 7. Efecto del pH en el medio germinativo usando polen fresco. Medio patron agar 2%, sucrosa 15%. Datos en porcentajes de germinación

	pH	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
		I	II	III	IV	V	VI		
(a)	4.5	0	0	0	0	0	0	0	0.00
(b)	5.0	78	55	48	65	63	37	346	57.66
(c)	5.5	69	72	77	82	57	45	402	67.00
(d)	6.0	91	82	91	84	87	86	521	86.83
(e)	6.5	74	80	81	61	75	86	457	76.16
(f)	7.0	81	82	74	54	65	81	437	72.83

Análisis de variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
Repeticiones	5	178.43	35.68	0.75
Tratamientos	4	1222.99	305.74	6.13 +++
Error	20	997.02	49.85	
Total	29	2398.44		

++ Significativo al 1%

$S_m = 2.882$

Tratamientos:	(b)	(c)	(f)	(e)	(d)
Promedios:	<u>57.66</u>	<u>67.00</u>	<u>72.83</u>	<u>76.16</u>	<u>86.83</u>

CUADRO 8. Efecto del pH.- Polen conservado a 4°C. Medio patron agar 2%, sucrosa 15%. Datos en porcentajes de germinación.

	pH	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
		I	II	III	IV	V	VI		
(a)	4.5	0	0	0	0	0	0	0	0.00
(b)	5.0	10	45	28	24	45	17	169	28.16
(c)	5.5	45	49	43	24	15	40	216	36.00
(d)	6.0	62	68	57	34	27	48	296	49.33
(e)	6.5	25	16	39	26	52	35	193	32.16
(f)	7.0	18	64	19	14	28	12	155	25.83

Análisis de variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
Repeticiones	5	599.08	119.81	1.403
Tratamientos	4	811.38	202.84	2.375
Error	20	1,707.67	85.38	
Total	29	3.118.13		

CUADRO 9. Efecto del pH.- Polen conservado a  $-17^{\circ}\text{C}$ . Medio patron agar 2%, sucrosa 15%. Datos en porcentajes de germinación.

	pH	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
		I	II	III	IV	V	VI		
(a)	4.5	0	0	0	0	0	0	0	0.00
(b)	5.0	0	2	1	8	17	4	32	5.33
(c)	5.5	13	6	3	5	14	6	47	7.83
(d)	6.0	8	9	2	4	3	4	30	5.00
(e)	6.5	5	6	23	6	5	4	49	8.16
(f)	7.0	3	1	3	9	0	2	18	3.00

Análisis de variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
Repeticiones	5	37.29	7.45	0.172
Tratamientos	4	226.82	56.70	1.310
Error	200	865.48	43.27	
Total	29	1129.59		

CUADRO 10. Combinación de tres factores del medio de germinación con polen fresco. Datos en porcentajes de germinación

Medios	pH	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
		I	II	III	IV	V	VI		
1) A1 - S10	5.5	92	90	89	93	89	96	549	91.5
2) A1 - S10	6.5	84	86	78	94	96	89	527	87.8
3) A1 - S15	5.5	80	87	87	84	75	92	505	84.1
4) A1 - S15	6.5	82	86	92	92	70	57	479	79.8
5) A2 - S10	5.5	89	88	94	91	95	93	550	91.6
6) A2 - S10	6.5	93	70	89	83	95	85	515	85.8
7) A2 - S15	5.5	69	62	75	72	79	84	441	69.0
8) A2 - S15	6.5	87	74	76	74	73	83	467	77.8

Análisis de variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
Repeticiones	5	88.21	17.64	0.49
Tratamientos	7			
Agar	1	101.21	101.21	2.81
Sucrosa	1	835.83	835.83	23.24 ++
pH	1	38.34	38.34	1.06
Agar-Sucrosa	1	57.86	57.86	1.61
Agar - pH	1	12.30	12.30	0.34
Sucrosa-pH	1	53.13	53.13	1.47
Agar-Sucrosa pH	1	41.25	41.25	1.14
Error	35	1.258.70	35.96	
Total	47	2.436.84		

++ Significativo al 1%

CUADRO 11. Combinación de tres factores del medio de germinación con polen conservado a 4°C. Datos en porcentajes de germinación

Medios	pH	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
		I	II	III	IV	V	VI		
1) A1 - S10	5.5	68	5	54	7	15	38	187	31.16
2) A1 - S10	6.5	41	67	56	75	5	34	278	46.33
3) A1 - S15	5.5	28	14	36	34	2	62	176	29.33
4) A1 - S15	6.5	54	42	39	77	16	27	255	42.50
5) A2 - S10	5.5	7	24	60	16	2	20	129	21.50
6) A2 - S10	6.5	2	5	44	29	27	72	179	29.83
7) A2 - S15	5.5	2	20	11	58	29	27	147	24.50
8) A2 - A15	6.5	34	12	65	32	44	42	229	38.16

Análisis de Variancias (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
Repeticiones	5	2.390.81	478.16	2.443
Tratamientos	7	1.474.11	210.58	1.076
Error	35	6.848.39	195.66	
Total	47	10.713.31		

CUADRO 12. Combinación de tres factores de medio de germinación con polen conservado a  $-17^{\circ}\text{C}$ . Datos en porcentajes de germinación

Medios	pH	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
		I	II	III	IV	V	VI		
1) A1 - S10	5.5	36	8	52	65	45	23	229	38.16
2) A1 - S10	6.5	22	38	78	37	41	35	251	41.83
3) A1 - S15	5.5	86	20	29	50	45	41	271	45.16
4) A1 - S15	6.5	59	15	30	47	19	63	233	38.83
5) A2 - S10	5.5	26	69	27	31	34	19	206	34.33
6) A2 - S10	6.5	24	61	42	42	41	24	234	37.33
7) A2 - S15	5.5	24	64	11	28	39	38	204	34.00
8) A2 - S15	6.5	23	31	57	27	38	21	197	32.83

Análisis de Variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
Repeticiones	5	120.61	24.12	0.164
Tratamientos	7	296.80	42.40	0.289
Error	35	5.121.51	146.32	
Total	47	5.538.92		



CUADRO 13. Efecto del ácido 3-indolacético.- Polen Fresco. Medio patrón: agar 2%, sucrosa 10%, pH 5.5. Datos en porcentajes de germinación

Ácido 3-indolacético	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
	I	II	III	IV	V	VI		
(a) 0 ppm	63	46	86	76	86	35	392	65.33
(b) 1	80	67	71	94	80	85	477	79.50
(c) 10	31	49	35	32	23	21	191	31.83
(d) 20	5	14	5	15	4	25	68	11.33
(e) 50	0	0	0	0	0	0	0	0.00
(f) 100	0	0	0	0	0	0	0	0.00

Análisis de Variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
Repeticiones	5	191.10	38.22	0.40
Tratamientos	3	7.417.14	2.472.31	26.04 ++
Error	15	1.423.95	94.93	

++ Significativo al 1%

$S_m = 3.977$

Tratamientos+	(d)	(c)	(a)	(b)
Promedios:	<u>11.33</u>	<u>31.83</u>	<u>65.33</u>	<u>79.50</u>

CUADRO 14. Efecto del ácido 3-indolacético.- Polen conservado a 4°C. Medio patro agar 2%, sucrosa 10%, pH 5.5. Datos en porcentajes de germinación

Acido 3 - indolacético	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
	I	II	III	IV	VV	VI		
1) 0 ppm.	42	41	42	48	16	59	248	41.33
2) 1	55	41	13	39	42	40	230	38.33
3) 10	27	38	5	4	32	31	137	22.16
4) 20	0	4	0	2	0	0	6	1.00
5) 50	0	0	0	0	0	0	0	0.00
6) 100	0	0	0	0	0	0	0	0.00

Análisis de Variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.
Repeticiones	5	517.69	103.53	1.43
Tratamientos	3	5.054.02	1.684.67	23.39 ++
Error	15	1.080.25	72.01	

++ Significativo al 1%

$S_m = 3.464$

Tratamientos:	(4)	(3)	(2)	(1)
Promedios:	1.00	22.16	38.33	41.33

CUADRO 15. Efecto del ácido 3-indolacético.- Polen conservado a  $-17^{\circ}\text{C}$ . Medio patron: agar 2%, sucrosa 10%, pH 5.5. Datos en porcentajes de germinación.

Acido 3-indolacético	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
	I	II	III	IV	V	VI		
0 ppm.	26	8	13	29	35	11	122	20.33
1	7	17	51	8	15	14	112	18.66
10	18	63	12	5	7	23	128	21.33
20	7	17	32	43	25	33	157	26.16
50	0	0	0	0	0	0	0	0.00
100	0	0	0	0	0	0	0	0.00

Análisis de Variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G. L.	S. C.	S. M.	F
Repeticiones	5	192.55	38.51	0.264
Tratamientos	3	104.77	34.92	0.239
Error	15	2.185.96	145.73	
Total	23	2.483.28		

CUADRO 16. Efecto del ácido giberélico.- Polen fresco. Medio patrón: agar 2%, sucrosa 10%, pH 5.5. Datos en porcentajes de polen germinado.

Acido giberélico	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
	I	II	III	IV	V	VI		
0 ppm.	80	85	70	96	60	88	479	79.83
1	92	87	93	78	55	76	481	80.16
20	72	90	69	74	76	91	472	78.66
20	85	78	82	90	88	73	496	82.66
50	68	57	92	86	67	51	421	70.16
100	64	85	82	84	81	89	485	80.83

Análisis de Variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
Repeticiones	5	3320.13	64.02	0.888
Tratamientos	5	242.17	48.43	0.671
Error	25	1.801.96	72.07	
Total	35	2.364.26		

CUADRO 17. Efecto del ácido giberélico.- Polen conservado a 4°C.  
Medio patrón: agar 2%, sucrosa 10%, pH 5.5. Datos en porcentajes de polen germinado

Acido giberélico	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
	I	II	III	IV	V	VI		
0 ppm.	7	15	20	3	5	18	68	11.33
1	32	36	5	16	3	2	94	15.66
10	31	8	20	15	9	39	122	20.33
20	31	15	21	4	19	8	98	16.33
50	5	10	12	35	11	39	112	18.66
100	14	16	23	16	44	11	124	20.66

Análisis de Variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
Repeticiones	5	84.12	16.82	0.165
Tratamientos	5	264.42	52.88	0.521
Error	25	2.536.05	101.44	
Total	35	2.884.59		

CUADRO 18. Efecto del ácido giberélico.- Polen conservado A - 17°C.  
Medio patrón: agar 2%, sucrosa 10%, pH 5.5. Datos en porcentajes de germinación

Acido giberélico	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
	I	II	III	IV	V	VI		
0 ppm.	50	46	49	35	17	38	235	39.16
1	56	28	30	65	44	54	277	46.16
10	41	58	17	45	39	80	280	46.66
20	35	47	28	29	35	46	270	45.00
50	54	48	30	62	46	42	282	47.00
100	38	56	62	54	65	42	317	52.83

Análisis de Variancias (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
Repeticiones	5	123.46	24.69	0.263
Tratamientos	5	203.19	40.63	0.433
Error	25	2.343.16	93.72	
Total	35	2.669.81		

CUADRO 19. Efecto del ácido bórico.- Polen fresco. Medio patrón: agar 2%, sucrosa 10%, pH 5.5. Datos en porcentajes de polen germinado

Concentraciones de Acido Bórico	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
	I	II	III	IV	V	VI		
0 ppm.	93	84	97	92	94	85	545	90.83
1	88	98	90	86	96	95	553	92.16
10	93	93	91	90	84	91	542	90.33
20	97	96	84	94	98	93	562	93.66
50	80	93	90	86	90	98	537	89.50
100	87	91	89	88	89	77	521	86.83

Análisis de Variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G. L.	S. C.	C. M.	F
Repeticiones	5	59.57	11.91	0.426
Tratamientos	5	184.91	36.98	1.323
Error	25	698.77	27.95	
Total	35	943.25		

CUADRO 20. Efecto del ácido bórico.- Polen conservado a 4°C. Medio patron: agar 2%, sucrosa 10%, pH 5.5. Datos en porcentajes de polen germinado

Concentración de ácido bórico	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
	I	II	III	IV	V	VI		
0 0 ppm	2	14	19	2	33	62	132	22.00
1	38	67	20	60	21	48	254	42.33
10	22	37	70	40	43	10	222	37.00
20	28	12	25	18	8	17	108	18.00
50	31	15	7	25	14	62	154	25.66
100	13	10	40	12	14	1	90	15.00

Análisis de Variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
Repeticiones	5	181.75	36.35	0.21
Tratamientos	5	1.690.39	338.07	1.95
Error	25	4.327.33	173.09	
Total	35	6.199.47		



CUADRO 21. Efecto del ácido bórico.- Polen conservado a  $-17^{\circ}\text{C}$ .  
Medio patrón: agar 2%, sucrosa 10%, pH 5.5. Datos en porcentajes de polen germinado

Concentraciones de ácido bórico	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
	I	II	III	IV	V	VI		
0 ppm	27	27	5	43	47	37	186	31.00
1	1	29	51	53	24	56	214	35.66
10	53	63	45	49	13	34	257	42.82
20	33	18	41	14	30	29	165	27.150
50	21	27	32	36	11	14	141	23.50
100	19	22	23	17	10	33	124	20.66

Análisis de Variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
Repeticiones	5	373.08	74.61	0.675
Tratamientos	5	708.02	141.60	1.282
Error	25	2.759.46	110.37	
Total	35	3.840.56		

CUADRO 22. Efecto de extractos de estigmas y estilos sobre la germinación in vitro del polen fresco de cacao. Datos en porcentajes de germinación

Tratamientos	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
	I	II	III	IV	V	VI		
1) Agar 2%, Sucrosa 10% pH 5.5 (Testigo)	83	86	79	92	92	80	51	85.33
2) Idem. más extracto	73	71	59	76	54	64	397	66.16

Análisis de Variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
Repeticiones	5	140.76	28.15	1.240
Tratamientos	1	526.68	526.68	23.201 <sup>++</sup>
Error	5	113.53	22.70	
Total	11	780.97		

<sup>++</sup> Significativo al 1%

CUADRO 23. Efecto de extractos de estigmas y estilos sobre la germinación in vitro del polen de cacao conservado a 4°C.  
Datos en porcentajes de germinación

Tratamientos	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
	I	II	III	IV	V	VI		
1) Agar 2%, Sucrosa 10% pH 5.5 (testigo)	7	15	20	3	5	18	68	11.33
2) Idém más extracto	15	40	8	16	11	12	102	17.00

Análisis de Variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.
Repeticiones	5	295.73	59.14	1.096
Tratamientos	1	70.08	70.08	1.299
Error	5	269.67	53.93	
Total	11	635.48		

CUADRO 24. Efecto de extractos de estigmas y estilos sobre la germinación in vitro del polen de cacao conservado a  $-17^{\circ}\text{C}$ .  
Datos en porcentajes de germinación

Tratamientos	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
	I	II	III	IV	V	VI		
1) Agar 2%, Sucrosa 10%, pH 5.5 (testigo)	50	46	49	35	17	38	235	39.16
2) Idém más extractos	66	21	28	64	22	63	264	44.00

Análisis de Variancia: (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
Repeticiones	5	724.00	144.80	0.662
Tratamientos	1	21.87	21.87	0.232
Error	5	469.36	93.87	
Total	11	1.215.23		

CUADRO 25. Comparación de pruebas de viabilidad y germinación con polen fresco de cacao. Datos en porcentajes de germinación y viabilidad

Tratamientos	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
	I	II	III	IV	V	VI		
1) Prueba de iodo ioduro de potasio	100	100	100	100	100	100	600	100.00
2) Lactofenol con anilina azul.	100	100	100	99	98	98	595	99.16
3) Prueba de la peroxidasa.	97	95	100	98	88	98	576	96.00
4) Medio común: agar 1.5% glucosa 5%, pH 5-5.5.	92	95	88	90	95	94	554	92.33
5) Medio determinado: agar 2%, sucrosa 10%, pH 5.5.	96	94	95	97	92	85	559	93.16
6) Prueba de germinación <u>in vivo</u>	73	44	46	44	53	44	304	50.66

Análisis de Variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
Repeticiones	5	128.13	25.62	1.149
Tratamientos	5	7.509.44	1.501.88	67.379++
Error	25	557.48	22.29	
Total	35	8.195.05		

++ Significativo al 1%

Sm= 1.928

Tratamientos:	(6)	(4)	(5)	(3)	(2)	(1)
Promedios:	50.66	92.33	93.16	96.00	99.16	100.00

CUADRO 26. Comparación de pruebas de viabilidad y germinación con polen de cacao conservado a 4°C. Datos en porcentajes de germinación y viabilidad

Tratamientos	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
	I	II	III	IV	V	VI		
1) Prueba de iodo ioduro de potasio	100	100	100	100	100	100	600	100.00
2) Lactofenol con anilina azul	100	100	100	100	100	100	600	100.00
3) Prueba de la peroxidasa	99	98	96	95	100	100	588	98.00
4) Medio común: agar 1.5% glucosa 5%, pH 5-5.5.	22	21	2	2	4	3	54	9.00
5) Medio determinado: agar 2%, sucrosa 10%, pH 5.5 y 1 ppm de $BO_3 H_3$	5	47	9	30	47	46	184	30.66
6) Prueba de germinación <u>in vivo</u>	38	43	33	44	37	25	220	36.66

Análisis de Variancia (datos de % transformados a ángulos)

R. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
Repeticiones	5	298.47	59.69	1.11
Tratamientos	5	33.668.67	6.733.73	125.30 ++
Error	25	1.343.53	53.74	

++ Significativo al 1%

$S_m = 2.440$

Tratamientos:	(4)	(5)	(6)	(3)	(2)	(1)
Promedios:	9.00	<u>30.66</u>	<u>36.66</u>	<u>98.00</u>	<u>100.00</u>	<u>100.00</u>

CUADRO 27. Comparación de pruebas de viabilidad y germinación con polen de cacao conservado a  $-17^{\circ}\text{C}$ . Datos en porcentajes de germinación y viabilidad

Tratamientos	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
	I	II	III	IV	V	VI		
1) Prueba de iodo ioduro de potasio	100	100	100	99	100	100	599	99.83
2) Lactofenol con anilina azul	100	100	100	100	100	100	600	100.00
3) Prueba de la peroxidasa	90	99	99	100	98	97	583	97.16
4) Medio común: agar 1.5%, glucosa 5%, pH 5-5.5	13	5	4	9	3	15	49	8.16
5) Medio determinado: agar 2%, sucrosa 10%, pH 5.5 y 10 ppm de $\text{BO}_3\text{H}_3$	46	38	7	22	21	11	145	24.16
6) Prueba de germinación <u>in vivo</u>	37	33	33	11	31	31	176	29.33

Análisis de Variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.
Repeticiones	5	103.57	20.71	0.51
Tratamientos	5	35.039.75	7.007.95	172.43 ++
Error	25	1.016.23	40.64	

++ Significativo al 1%

Sm: 2.602

Tratamientos:	(4)	(5)	(6)	(3)	(1)	(2)
Promedios:	8.16	<u>24.16</u>	<u>29.33</u>	<u>97.16</u>	<u>99.83</u>	<u>100.00</u>

CUADRO 28. Comparación de pruebas de viabilidad y germinación con polen muerto de cacao. Porcentajes de germinación o viabilidad según el caso

Tratamientos	Repeticiones						Total	$\bar{X}$
	I	II	III	IV	V	VI		
1) Prueba de iodo ioduro de potasio	1000	78	86	100	75	83	522	87.00
2) Lactofenol con anilina azul	90	92	92	91	93	88	546	91.00
3) Prueba de la peroxidasa	7	2	28	16	23	22	98	16.33
4) Medio común: agar 15%, glucosa 5%, pH 5-5.5	0	0	0	0	0	0	0	0.00
5) Medio determinado: agar 2%, sucrosa 10% pH 5.5	0	0	0	0	0	0	0	0.00
6) Prueba de germinación <u>in vivo</u>	0	0	00	0	0	0	0	0.00

Análisis de Variancia (datos de % transformados a ángulos)

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
Repeticiones	5	356.87	71.37	0.69
Tratamientos	2	10.003.34	5.001.67	48.88 ++
Error	10	1.023.16	102.31	

++ Significativa al 1%

Sm= 4.129

Tratamientos:	(3)	(1)	(2)
Promedios:	16.33	<u>87.00</u>	<u>91.00</u>