



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

**UNIDAD ACADÉMICA DE AGRICULTURA, SILVICULTURA,
PESCA Y VETERINARIA**

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

ANÁLISIS *IN VITRO* DE LA CALIDAD DEL POLEN DE DIEZ ECOTIPOS DE CHIRIMOYO (*Annona cherimola* Mill)

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA AGRÓNOMA**

Nube del Rocío Minchala Buestán

Director: René Orellana Maita

2018



DECLARACIÓN

Yo, Nube del Rocío Minchala Buestán, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

NUBE DEL ROCÍO MINCHALA BUESTÁN

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Nube del Rocío Minchala Buestán, bajo mi supervisión.

René Orellana Maita

DIRECTOR



DEDICATORIA

A mi familia, amigos y personas especiales. No podría sentirme más agradecida por la confianza depositada en mí persona. También, a todos quienes que tengan la posibilidad de leer este trabajo, esperando sirva de ayuda en futuras investigaciones.

AGRADECIMIENTOS

Al creador, por darme la oportunidad de disfrutar de la vida y todo lo maravilloso que hay en ella.

A la Universidad Católica de Cuenca, por formarme como una profesional.

A la Estación Experimental del Austro del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), por tener sus puertas abiertas al conocimiento.

Un reconocimiento especial para el Ing. Segundo Maita S. PhD. por brindar su valiosa ayuda y extenderme su mano cuando más lo necesité.

A mi tutor, por su conocimiento y tiempo durante este estudio.



TABLA DE CONTENIDO

DECLARACIÓN	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
LISTA DE ILUSTRACIONES	ix
LISTA DE GRÁFICOS	x
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE ANEXOS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Descripción del chirimoyo	3
2.1.1 Origen	3
2.1.2 Botánica	3
2.1.3 Requerimientos agronómicos	3
2.1.4 Características nutricionales	4
2.1.5 Manejo del Cultivo	4
2.2 Inducción y diferenciación floral	5
2.2.1 Anatomía y morfología floral	5
2.2.2 Fenología floral	8
2.3 Polinización y fecundación	10
2.3.1 Polinización natural	10



2.3.2	Polinización artificial	11
2.4	Polen	12
2.4.1	Viabilidad del polen	13
2.4.2	Germinación del polen y crecimiento del tubo polínico	13
2.4.3	Calidad del polen	14
2.5	Caracterización pomológica	14
2.5.1	Descriptores cuantitativos	14
2.5.2	Descriptores cualitativos	15
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1	Materiales	19
3.1.1	De Campo	19
3.1.2	Laboratorio	19
3.1.3	Reactivos	19
3.2	Métodos	20
3.2.1	Fase de campo	20
3.2.2	Metodología general de la recolección de flores	21
3.2.3	Fase de laboratorio	22
3.2.4	Factores en estudio	23
3.2.5	Proceso del estudio	24
3.2.6	Métodos de evaluación	25
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1	Porcentaje de germinación	27
4.1.1	Prueba de Tukey para factor ecotipos	28
4.1.2	Prueba de Tukey para el factor tiempo	29
4.1.3	Prueba de Tukey para el factor estado fenológico)	30
4.1.4	Prueba de Tukey para la interacción ecotipos x tiempo	31



4.1.5	Prueba de Tukey para la interacción ecotipos x estados fenológicos	33
4.1.6	Prueba de Tukey para la interacción tiempo x estado fenológico	34
4.2	Longitud del tubo polínico	35
4.2.1	Prueba de Tukey para el factor ecotipos	37
4.2.2	Prueba de Tukey para el factor tiempo	37
4.2.3	Prueba de Tukey para el factor estados fenológicos	38
4.2.4	Prueba de Tukey para la interacción ecotipos x tiempo	39
4.2.5	Prueba de Tukey para la interacción ecotipos x estados fenológicos	41
4.2.6	Prueba de Tukey para la interacción tiempo x estado fenológico	42
4.3	Forma y tamaño de los granos de polen	43
4.3.1	Forma de los granos de polen	43
4.3.2	Tamaño del grano de polen	44
5.	CONCLUSIONES	47
6.	RECOMENDACIONES	48
	BIBLIOGRAFÍA	49
	ANEXOS	53



LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Flores de chirimoyo en estado fenológico hembra.....	6
Ilustración 2. Flor en estado hembra (día uno).....	7
Ilustración 3. Cono estigmático con granos de polen de flor en estado hembra.	8
Ilustración 4. Estados fenológicos de la flor del chirimoyo (Annona cherimola Mill).	9
Ilustración 5. Germinación de polen. A; grano de polen germinado.	26



LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Prueba de Tukey al 5% para porcentaje de germinación de polen in-vitro,	29
Gráfico 2. Prueba de Tukey al 5% para porcentaje de germinación de polen in-vitro,	30
Gráfico 3. Prueba de Tukey al 5% para porcentaje de germinación de polen in-vitro,	31
Gráfico 4. Prueba de Tukey al 5% para crecimiento del tubo polínico (mm), factor ecotipos.	37
Gráfico 5. Prueba de Tukey al 5 % para crecimiento del tubo polínico (mm), factor tiempo.	38
Gráfico 6. Prueba de Tukey al 5% para crecimiento de la longitud del tubo polínico (mm), factor estados fenológicos.	39

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Requerimientos edafoclimáticos del chirimoyo.....	4
Tabla 2. Características químicas de la chirimoya (cv. Fabulosa)	4
Tabla 3. Variabilidad genética de la colección de chirimoyo (<i>Annona cherimola</i>)	15
Tabla 4. Variabilidad pomológica de frutos de diez ecotipos de chirimoyo.....	15
Tabla 5. Valores medios de temperatura, precipitación y viento	21
Tabla 6. Horario de recolección de material biológico de diez.....	22
Tabla 7. Factores en estudio	23
Tabla 8. Receta para la elaboración del medio de cultivo.	24
Tabla 9. Medias del porcentaje de germinados de los granos de polen.	27
Tabla 10. Análisis de varianza para la variable porcentaje de germinación;	28
Tabla 11. Prueba de Tukey 5% para porcentaje de germinación de polen in vitro,.....	32
Tabla 12. Prueba de Tukey al 5% para porcentaje de germinación de polen in-vitro,.....	33
Tabla 13. Prueba de Tukey al 5% para porcentaje de germinación de polen in-vitro,	35
Tabla 14. Medias de la longitud del tubo polínico.	36
Tabla 15. Análisis de varianza para la variable longitud del tubo polínico.	36
Tabla 16. Prueba de Tukey al 5% para crecimiento del tubo polínico (mm), interacción ecotipos y tiempo.....	40
Tabla 17. Prueba de Tukey para crecimiento del tubo polínico (mm), interacción ecotipos y estados fenológicos.	41
Tabla 18. Prueba de Tukey al 5% para crecimiento del tubo polínico (mm),	42
Tabla 19. Forma del grano de polen de diez ecotipos de chirimoyo <i>A. cherimola</i> (micras)...	43
Tabla 20. Clasificación del grano de polen acuerdo al tamaño.	44
Tabla 21. Análisis de variancia para longitud del eje polar del grano de polen	44
Tabla 22. Prueba de Tukey al 5% para longitud del diámetro polar	45
Tabla 23. Análisis de variancia para el diámetro ecuatorial del grano polen.....	45
Tabla 24. Prueba de Tukey al 5% para en diámetro ecuatorial	46



LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Porcentajes de germinación de polen in-vitro de diez ecotipos de chirimoyo	53
Anexo 2. Porcentaje de germinación de polen in vitro en estado fenológico hembra	54
Anexo 3: Porcentajes de germinación de polen in vitro de chirimoyo	55
Anexo 4. Crecimiento del tubo polínico (micras) de diez ecotipos de chirimoyo	56
Anexo 5. Crecimiento del tubo polínico (micras) de diez ecotipos de chirimoyo	57
Anexo 6: Crecimiento del tubo polínico (micras) de diez ecotipos de chirimoyo	58
Anexo 7. Prueba de normalidad para porcentaje de germinación	59
Anexo 8. Prueba de normalidad para porcentaje de germinación	59
Anexo 9. Prueba de normalidad para longitud del tubo polínico	60
Anexo 10. Prueba de normalidad para longitud del tubo polínico	60
Anexo 11. Prueba de normalidad para medición de la longitud polar	61
Anexo 12. Prueba de normalidad para medición de la longitud polar	61
Anexo 13. Reporte de lluvia, viento y temperatura para el mes de enero de 2018	62
Anexo 14. Materiales utilizados	62



RESUMEN

El chirimoyo (*Annona cherimola* Mill) tiene baja producción, originada por varios factores, entre ellos, bajo índice de agentes polinizadores, alternancia frecuente de los ciclos florales, las flores presentan una estructura cerrada, poco llamativa a los insectos y una marcada dicogamia de tipo protogínica. Países exportadores de esta fruta como España, Chile, Perú y otros, ven como alternativa de producción el uso de la polinización manual, aunque en muchos casos esta técnica muestra resultados ineficientes en el cuajado y desarrollo de frutos, siendo necesario investigar la posible existencia de otros factores que limitan la producción, entre ellos, la fuente y calidad del polen utilizado. En este estudio, se determinó *in vitro* la calidad del polen de diez Ecotipos de chirimoyo existentes en la colección *ex-situ* de la Estación Experimental del Austro del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ubicada en el cantón Gualaceo. El polen se llevó al laboratorio de Fitopatología de la Carrera de Ingeniería Agronómica de la Universidad Católica de Cuenca para su evaluación. El medio de cultivo utilizado para la siembra de polen fue sacarosa al 10%, agar al 1 %, ácido bórico 50 ppm y nitrato de calcio 625 mg/l. Se evaluó el porcentaje de germinación, longitud del tubo polínico a las 2, 4, 8 y 24 horas en tres estados fenológicos y la forma y tamaño del grano de polen. Se utilizó el diseño completamente al azar en arreglo factorial 10 ecotipos x 4 tiempos x 3 estados fenológicos con cuatro repeticiones. Para el análisis estadístico se aplicó el análisis de varianza y la prueba de separación de medias de Tukey al 5% utilizando el software InfoStat. En conclusión, el mayor porcentaje de germinación presentó el ecotipo Fino de Jete a las 24 h, y el mayor desarrollo del tubo polínico alcanzó el ecotipo Austro en el mismo periodo de tiempo; además, el polen debe recolectarse en estado fenológico macho por presentar una mayor longitud del tubo polínico.

Palabras clave: *Annona cherimola*, estados fenológicos, germinación del polen, crecimiento del tubo polínico.



ABSTRACT

Cherimoya (*Annona cherimola* Mill) has low production, originated by several factors, among them, low index of pollinating agents, frequent alternation of the floral cycles, the flowers present a closed structure, little noticeable to insects and a marked type of protogynous dichogamy. Exporting countries of this fruit, such as Spain, Chile, Peru and others, see the use of manual pollination as an alternative production, although in many cases this technique shows inefficient results in fruit set and fruit development, being necessary to investigate the possible existence of other factors that limit production, including the source and quality of the pollen used. In this study, the pollen quality of ten ecotypes of cherimoya existing in the *ex-situ* collection of the Austro Experimental Station of the National Autonomous Institute of Agricultural Research (INIAP), located in the canton Gualaceo, was determined *in vitro*. The pollen was carried to the Phytopathology Laboratory of the Agronomic Engineering Career of the Catholic University of Cuenca for evaluation. The culture medium used for pollen sowing contained 10% sucrose, 1% agar, 50 ppm boric acid and 625 mg / l calcium nitrate. The percentage of germination, length of the pollen tube at 2, 4, 8 and 24 hours in three phenological stages and the shape and size of the pollen grain were evaluated. The completely random design was used in factorial arrangement 10 ecotypes x 4 times x 3 phenological stages with four repetitions. For the statistical analysis, the variance analysis and Tukey's test 5% to mean separation were applied using the InfoStat software. In conclusion, the highest percentage of germination presented the Fino de Jete ecotype at 24 h, and the highest pollen tube length reached the Austro ecotype in the same period of time; in addition, the pollen must be collected in male phenological stage due to the greater pollen tube length.

Key words: *Annona cherimola*, phenological stages, pollen germination, pollen growth tube.



1. INTRODUCCIÓN

El chirimoyo es la única especie de la familia *Annonaceae* adaptada a los valles subtropicales de la serranía andina, representa el 6% de la presencia de este género en el Ecuador (BioBanco, 2018), sus frutos son muy valorados por sus excelentes características organolépticas, nutritivas y medicinales (Agusti, 2010), se considera un fruto con alto potencial para el mercado interno y externo; sin embargo, existe una superficie reducida de producción por la poca acogida por parte de los productores y profesionales del agro (Montiel, 2007).

La producción comercial del chirimoyo en el Ecuador es limitada por problemas de polinización, debido a una serie de factores como la deficiente fecundación natural causada por: maduración de los verticilos florales reproductivos en distinto tiempo, flor de una estructura cerrada poco llamativa a los insectos los mismos que tienen un bajo índice de presencia y la alternancia diaria de los ciclos florales (Atiencia, 2010). Estas características particulares obligan a desarrollar técnicas de polinización artificial con la finalidad de mejorar el cuajado de los frutos e incrementar el rendimiento y calidad del chirimoyo (Apolonio, Castañeda, Franco, Morales, & González, 2015).

A pesar de las técnicas de polinización artificial, el amarre y desarrollo del fruto es variado; empeorando severamente cuando se utiliza polen de un mismo árbol (Apolonio, Castañeda, Franco, Morales, & González, 2015), sumándose como factor limitante de la producción, la disponibilidad y fuente de polen. La calidad de éste (viabilidad, capacidad de germinación y longitud del tubo) puede verse afectada por la procedencia genética y capacidad de adaptación del cultivar, condiciones ambientales adversas, tiempo de exposición del polen, contaminación del medio ambiente, factores que conducen a la pérdida de su fertilidad (Muradoglu, Beyhan, & Sonmez, 2017), (Ćalić & Radojević, 2017).

Annona cherimola es una especie que expulsa polen tricelular en el momento de la apertura de la antera, este tipo de polen se caracteriza por presentar una rápida germinación, pero una vida efímera con alta sensibilidad a la deshidratación por lo cual su manipulación resulta problemática (González, Hueso, Alonso, & Pinillos, 2010); debido a esta característica y a la importancia que tiene el mismo en la polinización manual del chirimoyo se han realizado estudios sobre: germinación (Rosell, Herrero, & Galán Saúco, 1999) (Lora, Herrero, & Hormaza, 2007), conservación (Atiencia, 2010), desarrollo (González, Hueso, Alonso, & Pinillos, 2010), (Lora, Testillano, Risueño, Hormaza, & Herrero, 2009), y efecto de la

temperatura en el desarrollo del polen (Kuroki , y otros, 2017), (Lora, Hormaza, & Herrero, 2012), sin embargo, la insuficiente información sobre la calidad del polen de esta especie es un problema que tienen que enfrentar los fruticultores cuando requieren polinizar este frutal (Apolonio, Castañeda, Franco, Morales, & González, 2015).

Ante esta problemática se hace necesario evaluar el porcentaje de germinación y desarrollo del tubo polínico *in vitro*, que permitirá conocer la calidad del polen en diez ecotipos de chirimoyo de la colección *ex-situ* de la Estación Experimental del Austro del INIAP, con el fin de mejorar la calidad y producción de este cultivo y generar alternativas para los fruticultores de la región y país. Además, se busca poner a disposición de la comunidad científica información que permita resolver problemas relacionados con la calidad del fruto y el bajo rendimiento del chirimoyo.

El objetivo general de esta investigación fue determinar la calidad del polen de diez ecotipos de chirimoyo (*Annona cherimola*) en laboratorio (*in vitro*), y como objetivos específicos: a) Identificar el ecotipo con mayor porcentaje de germinación de polen. b) Determinar el mejor estado fenológico de la flor para recolección de polen. c) Evaluar el crecimiento del tubo polínico.

La hipótesis de estudio *establecida* “*existen diferencias en la calidad del polen de los diez ecotipo de chirimoyo existentes en la colección ex-situ de la Estación Experimental del Austro del INIAP.*”

Al realizar el análisis *in-vitro* de la calidad del polen de los diez ecotipos de chirimoyo (*Annona cherimola*) se infiere la existencia de individuos generadores de polen de superior calidad, característica que puede estar influenciada por el factor genético del cultivar o por la capacidad que tenga de adaptarse a las condiciones agroclimáticas de su entorno.



2. MARCO TEÓRICO

2.1 Descripción del chirimoyo

2.1.1 Origen

Annona cherimola es originaria de América Central de la zona comprendida entre Honduras y Guatemala, con un centro de adaptación en la región andina de América del Sur (2017), lugares donde se puede encontrar una gran variabilidad genética en lo referente a forma, color, tamaño y tipo de piel; dejando de lado la consideración sobre su origen en los valles temperados de Perú y Ecuador (González, 2013).

2.1.2 Botánica

El chirimoyo es de desarrollo fisiológico lento, alcanza alturas entre siete y ocho metros en 10 años, con un sistema radicular ramificado y superficial (Vanegas I. , 2014), de tallo cilíndrico con corteza gruesa, hojas simples, enteras, opuestas, de disposición alterna y forma ovada u ovada-lanceolada; yemas compuestas que originaran brotes mixtos; flores hermafroditas, aromáticas, colgantes, poco llamativas, se presentan solitarias o en grupos de tres (González, 2013); fruto de pulpa blanca de sabor muy agradable y con alrededor de 25° Brix; semillas grandes de color negro brillante, con 10 semillas x 100g de pulpa INIAP (2015).

2.1.3 Requerimientos agronómicos

Annona cherimola debido a su origen semitropical, es muy susceptible a temperaturas extremas; por debajo de 13°C se dificulta drásticamente la producción de frutos de calidad (González, 2013), mientras cuando las temperaturas alcanzan los 33°C, se presentan quemaduras de hojas, ramas e incluso daño radicular (Pino, 2008). Temperaturas superiores a los 30°C en el periodo de desarrollo floral y en el momento de la dehiscencia de la antera afectan drásticamente la capacidad de germinación de polen (Lora , Herrero, & Hormaza, 2007). Los parámetros de cultivo para este frutal se detallan en la tabla 1 (Pino, 2008) (Vanegas, Encalada, Feicán, Gómez , & Veria, 2016).



Tabla 1. Requerimientos edafoclimáticos del chirimoyo.

Clima	Templado (subtropical fresco).
Altitud	1500 a 2600 m.s.n.m
Temperatura	De 15 a 25°C, siempre que no haya restricciones en el aporte hídrico.
Suelo	Poco exigente, desarrollándose desde pesados a muy ligeros, mejores resultados se obtienen en suelos francos, con buen nivel de materia orgánica y drenaje
Textura del suelo	Arenosos y bien aireados.
pH de suelo	6,0 – 7,0.

Fuente. (Pino, 2008) (Vanegas, Encalada, Feicán, Gómez, & Veria, 2016).

2.1.4 Características nutricionales

La chirimoya es una fruta con extraordinaria propiedad digestiva, nutritiva y medicinal que los indígenas la usaban desde la antigüedad. Se caracteriza por su alto contenido de agua, escasa grasa y proteína con un valor calórico clasificado entre moderado y alto ya que la mayoría de los frutos tienen un Brix superior a 20 grados (González, 2013), la tabla 2 describe las características químicas del cultivar Fabulosa.

Tabla 2. Características químicas de la chirimoya (cv. Fabulosa)

Característica	Valor
Sólidos solubles (°Brix)	24.72 ± 5.19
Ph	4.55 ± 0,10
Acidez/100g Ácido cítrico	0.49 ± 0.15
Relación sabor	52.45 ± 14.43
Vitamina C (mg/100g)	63.06 ± 13.63

Fuente. (INIAP, 2015)

2.1.5 Manejo del Cultivo

En el Ecuador se cultiva pequeñas extensiones de chirimoyo, debido a una escasa generación de tecnología para solucionar problemas importantes como: bajo índice de calidad en los frutos producidos, escaso rendimiento debido a la reducida polinización natural, largo periodo de reposo de la planta, incidencia de plagas y enfermedades (mosca

de la fruta) e incipiente uso industrial, esto ha ocasionado que el agricultor tenga una baja rentabilidad e ingresos poco atractivos (Andino, 2014).

La insipiente producción de esta fruta a pesar de los esfuerzos por parte de instituciones públicas y privadas no ha permitido posicionarse en los mercados internos y externos (Rodríguez, 2013), pues el rendimiento nacional no supera los 1000 kg/ha provocando que en nuestro medio el precio de la chirimoya se encuentre alrededor de 5 USD el kilogramo de fruta fresca (Encalada, 20), los consumidores muchas veces no la compran porque consideran que su precio es muy alto. Actualmente este fruto se cultiva en la región del Mediterráneo; siendo España el país con la mayor área dedicada a la explotación de la chirimoya con alrededor de 3600 ha, que corresponde al 80% de la producción mundial (González, 2013), en Sudamérica, Chile y Perú son los mayores productores con alrededor de 1800 ha (Viera, 2016).

2.2 Inducción y diferenciación floral

El desarrollo floral comienza cuando el tejido meristemático en las yemas axilares cambia al estado reproductivo (inducción floral), y termina con el desarrollo del órgano floral (diferenciación floral) (Montiel, 2007). Existen investigaciones que consideran que la molécula responsable del cambio de yema vegetativa a yema de flor es el florigeno, la misma que es sintetizada por las hojas maduras y translocada vía floema a la yema próxima, donde ocurre la iniciación floral (Vanegas, Encalada, Feicán, Gómez, & Veria, 2016).

Las yemas del chirimoyo están ubicadas en la unión hueca entre el peciolo de las hojas y ramillas (Vásquez, Viteri, & León, 2007). En las primeras etapas de desarrollo son axilares, luego son envueltas por el peciolo no pudiendo crecer hasta la caída de la misma; se pueden reconocer claramente meristemas vegetativos con una forma aguzada, los florales con aplanamiento del ápice (Montiel, 2007).

2.2.1 Anatomía y morfología floral

Flor de forma piramidal con tres caras y un hoyo profundo, donde se encuentra los órganos reproductivos (Montiel, 2007). Perianto conformado por un cáliz de color café verdoso, con tres sépalos triangulares pequeños pubescentes de unos 5 milímetros de longitud (León, 2000). Una corola formada por seis pétalos unidos en la base, los tres

internos se encuentran atrofiados en forma de escama ovalada o triangular y los tres exteriores bien desarrollados se caracterizan por ser carnosos y gruesos, miden de 2,5 a 4 cm de largo (González, 2013). Ver Ilustración 1



Ilustración 1. Flores de chirimoyo en estado fenológico hembra.

A: ecotipo Abue. B: ecotipo La playa.

Elaborado por. Minchala N, 2018.

La parte masculina de la flor forma un anillo de estambres (150 a 200) que se encuentran en disposición helicoidal rodeando al cono pistilar, creando una masa compacta blanca oprimida por los pétalos. Los estambres son carnosos, aplanados y de filamento corto sobre los cuales se ubican las anteras las mismas que contiene una gran cantidad de polen en sacos polínicos en posición longitudinal (Atiencia, 2010). (Ilustración 2)

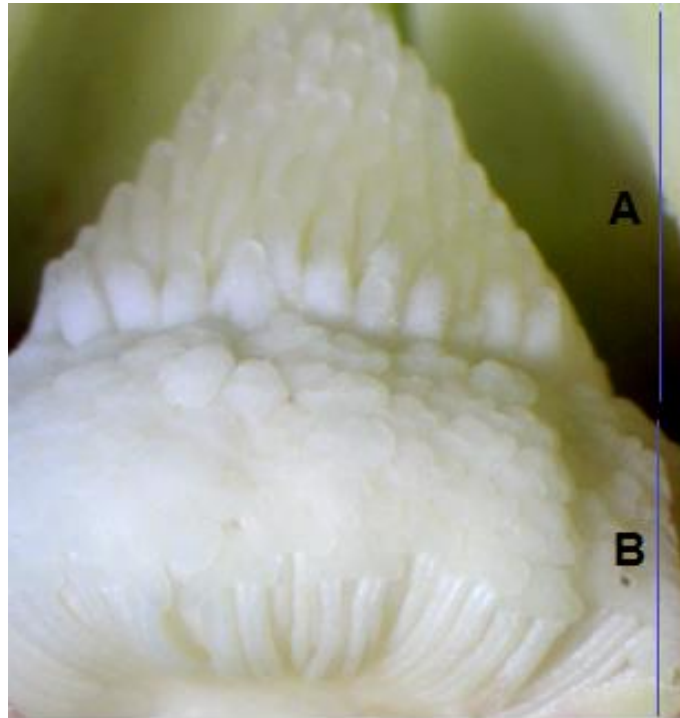


Ilustración 2. Flor en estado hembra (día uno).

A: Cono pistilar. B: Rodete de estambres.

Elaborado por. Minchala N, 2018

La parte femenina se localiza en el centro de la flor, lo conforman los pistilos insertos en el receptáculo (Ilustración 3), cada pistilo se compone de tres partes definidas ovario, estilo y estigma. Tiene un sólo óvulo, estilo corto y estigma que contiene papilas donde es recibido el polen. El pistilo está formado por un carpelo, cuando es fecundado el óvulo se sueldan entre sí mediante un tejido conectivo, creando una fecundación independiente, lo cual explica la deformación de frutos cuando no hay una buena polinización. Existen de 70 a 100 carpelos en cultivares mejorados y unos 150 a 300 en accesiones de menor valor comercial (Atiencia, 2010). Cuando la flor se encuentra receptiva los pistilos se tornan brillantes, y se cubren con un fluido viscoso, acompañado por un olor característico (Montiel, 2007).



Ilustración 3. Cono estigmático con granos de polen de flor en estado hembra.
Elaborado por. Minchala N, 2018

La flor del chirimoyo es hermafrodita, simétrica, simple, colgante y aromática se desarrolla solitaria o en grupo de tres en brotes de un año de edad, en menor cantidad aparecen en ramas de dos o más años o en crecimiento del mismo periodo. Se presentan al mes de iniciada la brotación de las hojas (Atiencia, 2010). Pese a ser fisiológicamente completas, exhiben dicogamia (maduración de los órganos sexuales en distinto tiempo) de tipo protoginica (los pistilos se desarrollan primero y después los estambres) (González, 2013). Los estigmas permanecen receptivos durante todo el período en que la flor se encuentra en estado femenino, a medida que la flor muestra su apertura total para iniciar el estado masculino, un gran número de pistilos dejan de ser receptivos, dificultando la autopolinización (Pino, 2008), este problema junto al bajo nivel de los agentes polinizadores redundan en algunas épocas en una fecundación de solamente el 2% de las flores, produciéndose frutos pequeños y mal formados (León, 2000).

2.2.2 Fenología floral

En la flor del chirimoyo se diferencian los estados fenológicos:

Flor cerrada (Ilustración 4, A); este estado puede durar de 10 a 15 días, la flor está en pleno crecimiento, los pétalos se encuentran cerrados y se alarga a medida que pasan

los días (Andino, 2014), este periodo se extiende desde que se observan las primeras flores hasta prehembra (Montiel, 2007).

Flor prehembra (Ilustración 4, B); flor crecida en su totalidad, los pétalos comienzan ligeramente a separarse por las puntas, pero la base permanece cerrada, en esta fase los pistilos son receptivos (Andino, 2014), permanece en este estado de 6 a 15 horas dependiendo de las condiciones climáticas, terminando alrededor del mediodía (aproximadamente 13 – 15 horas); en este estado la flor es receptiva, pero no puede ser polinizada por insectos debido a su estructura cerrada dificultando la entrada de los mismos (Atiencia, 2010).

Flor hembra (Ilustración 4, C); los pétalos se encuentran más separados que el estado anterior, la duración de esta fase es de aproximadamente 26 – 27 horas, desde las 13 a 15 horas del primer día, hasta las 16 a 18 horas del siguiente; permitiendo la entrada de insectos polinizadores a la masa estigmática (Atiencia, 2010). Los estigmas se presentan brillantes cubiertos de un fluido viscoso, acompañado por un olor característico, a medida que se acerca al estado macho los pistilos pierden receptividad (Montiel, 2007). Una vez alcanzado este estado, en su segundo día pasará a estado macho, tanto si continúa en el árbol como si es separada del mismo (Pino, 2008).

Flor macho (Ilustración 4, D); pétalos abiertos en su totalidad, los estambres liberan polen. El cambio de estado generalmente tiene lugar en la tarde, alrededor de las 16 y 18 horas (Montiel, 2007). Si la flor fue cosechada en estado hembra, pasará a estado macho con una ligera precocidad en el cambio de fase. La temperatura juega un papel importante, pudiendo acortar o alargar el ciclo (Andino, 2014).



Ilustración 4. Estados fenológicos de la flor del chirimoyo (*Annona cherimola* Mill).

A: Estado flor cerrada. B: Estado pre hembra. C: Estado hembra día uno.

D: Estado hembra día dos. E: Estado macho.

Elaborado por. Minchala N, 2018.



El chirimoyo presenta alternancia diaria de los estados florales en un árbol, e incluso en la totalidad de una parcela de una misma variedad. Un día todas las flores hembras pasan a macho por la tarde, mientras que al siguiente no lo hace ninguna (Dominguez & Castañeda, 2002). Existe períodos donde se produce solape de estados, encontrándose todas las tardes flores en los dos estados. En el austro ecuatoriano, el chirimoyo muestra dos épocas definidas de floración, la primera en el mes de enero y la segunda en el mes de julio (Andino, 2014). Extendiéndose cada una de las floraciones por más de tres meses (Arribasplata, 2013).

2.3 Polinización y fecundación

La polinización es la transferencia de polen desde los estambres (órganos masculinos) al pistilo (órgano femenino) de la flor (Pino, 2008). El polen de *Annona cherimola* después de la apertura de la antera debe llegar al órgano reproductor femenino por medio de un agente polinizador (Palanivelu & Tsukamoto, 1012); alcanzado el estigma, el grano de polen tendrá que entregar el esperma al óvulo, para esto debe darse una serie de pasos: hidratación del grano de polen, formación del tubo polínico y su elongación a lo largo del estilo, entrada del tubo polínico al óvulo, liberación de dos núcleos espermáticos dentro del saco embrionario, fertilización y formación del cigoto (Larranaga, y otros, 2017).

Por otro lado, el fruto del chirimoyo corresponde a un sincarpio procedente de una sola flor, formado por un conjunto de pistilos unidos, componiendo una estructura sólida; para que el fruto tenga un tamaño y forma adecuada, deben ser fecundados todos los pistilos (Atiencia, 2010).

2.3.1 Polinización natural

La flor del chirimoyo al tener un polen pegajoso y pesado es descrita como entomófila, siendo su principal agente polinizador un diminuto escarabajo perteneciente a la familia Nitidulidae conocido como Cucarroncito de la Savia. El olor característico que desprenden las flores atrae a estos insectos, especialmente cuando están hambrientos, así la parte carnosa de los estambres, polen y el exudado estigmático les sirve de alimento. Por lo común, los escarabajos se introducen después del mediodía en estado fenológico hembra, cuando la flor adquiere la fase masculina, la caída de los pétalos arrastra a los



escarabajos fuera de la flor y éstos cubiertos de polen viable llegan a nuevas flores en estado femenino. El número de insectos polinizadores existentes no asegura una producción rentable, limitando drásticamente el cultivo de esta fruta de manera comercial, ya que ocasionalmente se producen frutos bien formados y de tamaño grande (Atiencina, 2010).

2.3.2 Polinización artificial

La polinización asistida nace como una alternativa para algunas especies que tienen fecundación natural deficiente, pero cuya producción es de un alto valor comercial, tal es el caso del chirimoyo (Atiencina, 2010). Sin embargo, los resultados obtenidos con esta técnica en el amarre de los frutos son inseguros y variables, principalmente porque la polinización artificial es altamente dependiente de la buena calidad del polen y el desempeño de éste, es uno de los parámetros más importantes para el éxito de la fecundación de las flores (Lora , Herrero, & Hormaza, 2012).

El método más usado para esta práctica cultural es el empleo de polen recolectado de flores en fase hembra y guardadas a temperatura ambiente por un lapso de 15 horas (Lora , Herrero, & Hormaza, 2007). El interés de esta fruta y el alto valor que puede alcanzar en el mercado justifica el empleo de la polinización artificial ya que el beneficio obtenido con esta técnica supera con creces el coste de su aplicación (Atiencina, 2010). La extrema dependencia que esta especie tiene de la polinización manual o asistida, lejos de ser una desventaja, puede entenderse como algo positivo, permitiendo maximizar y controlar el nivel de la cosecha, optimizando de esta manera la productividad (González, 2013). En el manejo de la polinización se puede distinguir cuatro etapas (Montiel, 2007):

- Seguimiento fenológico.
- Recolección de estambres.
- Almacenaje de estambres.
- Polinización manual.

Uno de los grandes desafíos en la polinización del chirimoyo consiste en determinar una cantidad de flores a polinizar y cumplirla, para esto es importante conocer la cantidad de árboles existente y el estado sanitario en que se encuentran. De acuerdo a la edad,

vigor y cantidad de ramillas es posible estimar la cantidad de flores a polinizar (Montiel, 2007).

Para lograr resultados exitosos en la polinización artificial se tiene que balancear el factor genético (origen del polen) y el factor ambiental (temperatura 25°C, humedad relativa del 80 %) (Pino, 2008). Esta labor conviene realizarla en horas tempranas o al caer la tarde, ya que al mediodía la humedad relativa es baja, provocando el resecado de los pistilos y estropeando el polen (Andino, 2014), (Escobar, 1996).

2.4 Polen

Los granos de polen (micrósporas) se producen en los sacos polínicos (microsporangios) en las anteras de los estambres. Después de la diferenciación de las anteras, en el interior de cada una de ellas se desarrolla un tejido esporógeno, donde se originan las células madres de los gametofitos masculinos; a partir de cada célula madre de polen se crea, mediante dos divisiones meióticas, cuatro células haploides unidas (tétrada) (Palanivelu & Tsukamoto, 1012).

Estas micrósporas unicelulares pasarán por una división mitótica asimétrica (mitosis 1 de polen) para producir un grano de polen con dos células, una célula vegetativa grande que llena casi por completo el grano de polen y es la que dará origen al tubo polínico y otra generativa más pequeña que en un principio se encuentra adherida a la pared del grano de polen, luego se separan quedando en suspensión en el plasma de la célula vegetativa (Solís M. , 2012).

La célula generativa se dividirá una vez más para producir dos células espermáticas (mitosis II del polen), que serán entregadas en el saco embrionario del óvulo para la fertilización (Lora, Testillano, Risueño,, Hormaza, & Herrero, 2009). La mitosis 2 del polen y la hidrólisis del almidón, pueden tener lugar antes o después de la liberación del polen de la antera y dependiendo de cuándo ocurra, el polen maduro resultante será bicelular o tricelular (Solís M. , 2012).

Polen bicelular, cuando las células espermáticas (mitosis II del polen) se originan durante la germinación, dentro del tubo polínico (Solís M. , 2012). Polen tricelular; la segunda mitosis del polen ocurre en la antera antes de la germinación, se caracteriza por



presentar una rápida germinación, pero una corta vida. La presencia de granos de polen bicelulares y tricelulares en la misma antera es inusual, pero ha sido documentado en *Annona cherimola* (Lora, Hormaza, & Herrero, 2012). El gametofito masculino (grano de polen) está formado por dos capas de protección, una interna denominada intina y otra externa llamada exina.

La intina, capa interna delgada que contiene celulosa (Urbina, 2002), responsable de la formación del tubo polínico, se encuentra presente en todos los granos de polen cubriéndolos totalmente. Su composición es similar a la de la pared primaria de una célula somática, constituida fundamentalmente por polisacáridos y pequeñas cantidades de pectina y proteínas (Maita, 2006).

La exina, capa externa, gruesa y rígida que presenta una superficie rugosa o provista de picos para facilitar su adhesión, además de pequeños orificios o poros germinativos (Urbina, 2002). Es la responsable de la forma del grano de polen específica para cada grupo, sus principales funciones son proteger al gametofito de posibles daños físicos durante su transporte desde la antera al estigma de una flor, prevenir la deshidratación del mismo y servir de almacenamiento de las proteínas responsables de las reacciones de autoincompatibilidad (Maita, 2006).

2.4.1 Viabilidad del polen

El chirimoyo es una de las especies que se caracteriza por presentar un polen de rápida germinación, pero de vida efímera con alta sensibilidad a la deshidratación por lo cual su conservación resulta problemática. Presenta el máximo valor de germinación en el momento de la anthesis (González, Hueso, Alonso, & Pinillos, 2010), temperaturas menores de 15 °C y mayores de 30°C en el momento de la polinización detienen el crecimiento del tubo polínico, siendo las óptimas entre 20 y 25°C (Lora, Perez, Fuentetaja, & Hormaza, 2006).

2.4.2 Germinación del polen y crecimiento del tubo polínico

Las papilas estigmáticas segregan una sustancia viscosa y azucarada que retiene a los granos de polen y les proporciona un medio adecuado para su hidratación y

germinación, la misma ocurre entre 2 y 36 horas después de depositarse el polen, dependiendo de los factores climáticos, situándose el óptimo entre 20 y 25°C, inhibiéndose a menos de 15°C y más de 30°C (Lora, Hormaza, & Herrero, 2012).

Con la hidratación de la exina se dispersan los lípidos que taponan los poros germinativos, permitiendo el humedecimiento de la intina y emergencia del tubo polínico. La germinación se estimula al aumentar el número de granos de polen depositados sobre el estigma ya que comienza una competencia por alcanzar el óvulo para la fecundación. Cuando la polinización es cruzada, los tubos polínicos suelen crecer más deprisa que en el caso de autopolinización, para una misma temperatura (Urbina , 2002). Algunos elementos minerales tienen también gran influencia en el crecimiento del tubo polínico, especialmente el boro y el calcio (Rosell, Herrero, & Galán Saúco, 1999). El uso de tratamientos con fungicidas durante la floración tiene un efecto inhibitorio sobre la germinación y crecimiento del tubo polínico (Maita, 2011).

2.4.3 Calidad del polen

Puede verse afectada por factores como: procedencia genética del cultivar, condiciones ambientales adversas, tiempo de exposición, contaminación del medio, condiciones que conducen al deterioro de su fertilidad (Muradoglu, Beyhan, & Sonmez, 2017); (Ćalić & Radojević, 2017).

2.5 Caracterización pomológica

2.5.1 Descriptores cuantitativos

Un descriptor se usa para definir una característica o un atributo que se observa en las accesiones dentro de una colección de germoplasma (Duchi, 2017). Los valores promedios para los descriptores pomológicos identificados en los frutos obtenidos sin polinización manual de diez ecotipos de chirimoyo de la Estación Experimental del Austro del INIAP, se detallan en la tabla 3.



Tabla 3. Variabilidad genética de la colección de chirimoyo (*Annona cherimola*) de la Estación Experimental del Austro del INIAP- 2015.

Ecotipos	Longitud del fruto (mm)	Diámetro del fruto (mm)	Peso del fruto (g)	°Brix
Fabulosa (Acc1)	110,230	115,824	567,414	25,521
CHB 027 (Acc2)	92,982	95,039	376,617	21,200
Guille (Acc3)	94,475	91,243	358,592	15,365
Abu (Acc4)	103,705	106,390	572,796	15,834
Fino de jete (Acc5)	94,384	95,852	423,058	22,728
La loma (Acc6)	67,298	84,918	218,978	26,550
CHB T-55 (Acc7)	106,906	106,807	524,808	26,484
La playa (Acc8)	86,358	87,700	282,748	19,171
CHB T-61 (Acc9)	88,186	101,765	349,784	29,882
Austro (Acc10)	109,977	115,487	555,009	23,047

Fuente: Duchí (2017)




2.5.2 Descriptores cualitativos

Los descriptores pomológicos cualitativos como tipo del exocarpo y forma del fruto de los diez ecotipos en estudio se detallan en la tabla 4, además de la zona de recolección de cada una de ellos.




Tabla 4. Variabilidad pomológica de frutos de diez ecotipos de chirimoyo de la Estación Experimental del Austro del INIAP. 2018 (Sin polinización manual).

Ecotipos	Tipo del exocarpo	Forma del fruto	Lugar de recolección
Fabulosa	Laevis (lisa)	Cordiforme	 Loja






Ecotipos	Tipo del exocarpo	Forma del fruto	Lugar de recolección
CHB027	Tuberculata (protuberancias medianas)	Oval	 Nállig
Guille	Umbonata (protuberancias pequeñas)	Oval	 Nállig
Abue	Umbonata (protuberancias pequeñas)	Cordiforme alargado	 San Francisco



Ecotipos	Tipo del exocarpo	Forma del fruto	Lugar de recolección
Fino de Jete	Laevis (lisa)	Cordiforme	 Tumbaco
La loma	Impressa (depressiones suaves)	Redonda	 Guachapala
CHB T-55	Mamillata (protuberancias largas)	Cordiforme	 Loja



Ecotipos	Tipo del exocarpo	Forma del fruto	Lugar de recolección
La playa	Laevis(lisa)	Cordiforme alargado	 Paute
CHB T-61	Tuberculata (protuberancias medianas)	Cordiforme	 San Francisco
Austro	Mamillata (protuberancias largas)	Cordiforme alargado	 Loja

Fuente: Información primaria

Elaborado por. Minchala N, 2018.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 De Campo

- Polen de diez ecotipos de chirimoyo (*Annona cherimola Mill*) de la colección *ex situ* del INIAP.
- Refrigerador portátil
- Frascos de vidrio
- Pincel
- Etiquetas

3.1.2 Laboratorio

- Estereoscopio
- Microscopio BX41 marca Olympus
- Cámara DP72 marca Olympus
- Software (Image Pro plus)
- Computadora
- Balanza digital
- Microondas
- Vasos de precipitación
- Pipeta de 5 ml
- Pinzas
- Cajas Petri
- Estufa

3.1.3 Reactivos

- Nitrato de Calcio
- Ácido Bórico
- Agar
- Sacarosa



3.2 Métodos

El método que se utilizó en esta investigación es el científico observacional de tipo sistematizada o controlada.

3.2.1 Fase de campo

-Localización del material biológico

Provincia: Azuay

Cantón: Gualaceo

Parroquia: Gualaceo

Sector: Bullcay

Sitio: Estación Experimental del Austro del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias- INIAP.

Altitud: 2230 m.s.n.m.

Latitud Sur: 02° 51' 57"

Longitud Oeste: 78° 46' 49"

(Maita, 2006) (Instituto Nacional de Invesigaciones Agropecuarias, 2018)

-Características agroclimáticas

Temperatura media anual: 18 ° C

Precipitación promedio anual: 750 mm

Humedad relativa: 75 %

Evaporación: 831,2 mm

Evapotranspiración potencial: 1128,1 mm

Nubosidad: 7 (atmósfera diáfana, visibilidad buena)

Velocidad del viento: 2,0 km/h

Zona ecológica: Bosque seco Montano Bajo (bsMB)

Región bioclimática: Subhúmedo Templado

(Vanegas, Encalada, Feicán, Gómez , & Veria, 2016)

-Topografía y suelos

Topografía: Plana con buen drenaje

Textura: Franco-arcillo-arenosa

Materia orgánica: 3.96 %

pH: 7.5

(Vanegas, Encalada, Feicán, Gómez , & Veria, 2016)

Las condiciones climáticas de temperatura, precipitación y velocidad del viento registradas durante el periodo de recolección de flores llevado a cabo en la Estación Experimental del Austro (INIAP), se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Valores medios de temperatura, precipitación y viento de la Estación Experimental del Austro 22- 31 de enero de año 2018.

Enero/2018	Temperaturas - °C					Precipitación Promedio mm	Velocidad del viento km/h
	Media	Máxima	Hora	Mínima	Hora		
22	17	23.3	14:00	13.2	5:00	0	0.8
23	17.1	22.3	12:00	12.5	0:00	0	1
24	15.2	21.2	12:00	9.8	7:00	0.5	1
25	15.6	21.1	15:00	10.1	0:00	0.3	0.8
26	15.6	24.1	13:00	10.2	1:00	0.3	0.8
27	16.6	24	14:00	12.3	3:00	2.3	0.8
28	17.1	25.2	15:00	11.9	0:00	0	1
29	16.4	23.8	15:00	10.9	3:00	0	1
30	16.8	26.1	15:00	9.5	5:00	0	1
31	16.5	25.7	14:00	9.7	3:00	0	0.6

Fuente. Información primaria.

Elaborado por. Minchala N, 2018

3.2.2 Metodología general de la recolección de flores

La recolección del material biológico para la investigación se llevó a cabo entre el 22 y el 31 de enero de 2018. El material utilizado correspondió a flores de diez ecotipos de chirimoyo (*Annona cherimola* Mill) de plantas de diez años de edad, sembrados a una distancia de 3 x 5 m, de la colección *ex-situ* del INIAP, en la granja Experimental Bullcay. De cada ecotipo 5 plantas al azar fueron seleccionadas, de las cuales se recolectaron 5

flores de cada árbol, en un mismo estado fenológico a lo largo del día, muestreando dos ecotipos en cada ocasión, como se detalla la tabla 6.

Tabla 6. Horario de recolección de material biológico de diez ecotipos de *A. cherimola*, en tres estados fenológicos.

Estados	Hora	día 1	día 2	día 3	día 4	día 5
Pre hembra	8:30	E1	E3	E5	E7	E9
	8:40	E2	E4	E6	E8	E10
Hembra	14:30	E1	E3	E5	E7	E9
	14:40	E2	E4	E6	E8	E10
Macho	15:30	E1	E3	E5	E7	E9
	15:40	E2	E4	E6	E8	E10

Fuente. Información primaria

Elaborado por. Minchala N, 2018.

Extraídas las flores se depositaron en envases de vidrio y colocaron en un refrigerador portátil para ser transportadas al laboratorio. Pruebas previas a este trabajo corroboraron lo expuesto por (Montiel, 2007) que el polen de chirimoyo tiene una vida precaria y pierde rápidamente el vigor y viabilidad si no se da una buena aeración, pues el polen de flores recolectadas en fundas plásticas, selladas y expuestas a temperatura ambiente durante 60 minutos, no presentó germinación *in-vitro*.

3.2.3 Fase de laboratorio

-Localización del laboratorio

El estudio de viabilidad del polen de chirimoyo a través de su germinación en medio de cultivo se realizó en el laboratorio de Fitopatología de la Unidad Académica de Agricultura, Silvicultura, Pesca y Veterinaria de la Universidad Católica de Cuenca, ubicado el laboratorio en la Panamericana norte km 2 ½, en la parroquia Machángara, cantón Cuenca, provincia del Azuay. Su posición geográfica es: Latitud: 02° 51 S, Longitud: 78° 57 W, a 2512 m s.n.m. (Solís L. , 2011).

-Condiciones de laboratorio

Temperatura ambiente promedio: 21°C

Humedad relativa: 67%

3.2.4 Factores en estudio

Los factores en estudio fueron: diez ecotipos de chirimoyo, cuatro tiempos, tres estados fenológicos de la flor (tabla 7) y la interacción de cada uno de ellos (ecotipos x tiempo), (ecotipos x estados fenológicos), (tiempos x estados fenológicos) y (ecotipos x tiempos x estados fenológicos).

Tabla 7, Factores en estudio

Ecotipos de chirimoyo (<i>Annona cherimola</i>)	Ecotipo 1: Fabulosa		
	Ecotipo 2: CHB 027	Tiempos	2 horas
	Ecotipo 3: Guille		4 horas
	Ecotipo 4: Abu		8 horas
	Ecotipo 5: Fino de Jete		24 horas
	Ecotipo 6: La Loma		
	Ecotipo 7: T- 55	Estados fenológicos	Pre hembra (E1)
	Ecotipo 8: La Playa		Hembra (E2)
	Ecotipo 9: T- 61		Macho (E3)
	Ecotipo 10: Austro		

Fuente. Información primaria.

Elaborado por. Minchala N, 2018.

-Diseño

Se trabajó en un diseño factorial de 10 x 4 x 3 (ecotipos, tiempos, y estados fenológicos), con cuatro repeticiones dando un total de 120 tratamientos y 480 unidades de observación.



-Variables

- Porcentaje de germinación del grano del polen (2, 4, 8 y 24 horas), en estado floral pre hembra, hembra y macho.
- Longitud y diámetro del tubo polínico.
- Tamaño y forma del grano de polen (diámetro polar y ecuatorial).

-Unidad Observacional

Corresponde a una caja Petri con 5 ml de medio de cultivo más polen con estambres, los cuales fueron extraídos de flores de chirimoyo en diferentes estados fenológicos (pre hembra, hembra y macho), de la colección que dispone la Estación Experimental del Austro (INIAP).

3.2.5 Proceso del estudio

-Preparación del medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo utilizado por (Maita, 2006) en germinación in-vitro de polen del género *Vasconcellea*, que contiene sacarosa al 10%, agar al 1 % y ácido bórico 50 ppm en agua destilada como se detalla en la tabla 8. El calcio y el boro son elementos necesarios para obtener una buena germinación en polen del chirimoyo (Rosell, Herrero, & Galán Saúco, 1999).

Tabla 8. Receta para la elaboración del medio de cultivo.

Ingredientes	Dosis
Nitrato de Calcio	0.0625 g
Ácido Bórico	0.0125 g
Agar	2.5 g
Sacarosa	25 g
Agua destilada	250 ml

Fuente. Información primaria

Elaborado por. Minchala N, 2018



El medio se calentó en el microondas por un lapso de 150 segundos, seguidamente se distribuyó 5 ml de medio por caja Petri (90 mm de diámetro), una vez solidificado se procedió a sembrar.

-Siembra de polen

En el laboratorio se procedió a desmembrar cada flor pétalo por pétalo, con un palillo de madera se separaron los estambres que rodean el cono pistilar sobre una caja Petri libre, utilizando un palillo diferente para cada tratamiento para evitar una posible mezcla de gametofitos masculinos. Con ayuda de un pincel se añadieron polen más anteras al medio de cultivo dando tres golpes de pincel por caja Petri, en un intervalo de 10 minutos por tratamiento. Terminado este proceso se guardaron las cajas en una estufa a temperatura ambiente.

3.2.6 Métodos de evaluación

-Porcentaje de germinación del grano del polen

En cada tratamiento utilizando un microscopio marca Olympus con el objetivo en 10x se fotografiaron (cámara Olympus DP7 con software Image pro Plus) tres campos en los que se observó germinación del grano de polen. Se consideró granos germinados, cuando la longitud del tubo polínico superaba al diámetro del grano de polen a las 2, 4, 8 y 24 horas de colocados en el medio de germinación (Lora , Herrero, & Hormaza, 2007) (Ilustración 5). Se contó el polen en los tres campos fotografiados hasta completar 100 granos de los cuales se sacó el porcentaje de germinación.

-Longitud del tubo polínico

Para la estimación de la longitud del tubo polínico se procedió a medir la elongación alcanzada por cada tubo, de los granos contabilizados en el porcentaje de germinación.



-Forma y tamaño de los granos de polen

Se realizó la medida del diámetro polar y ecuatorial de 20 granos de polen al azar en estado fenológico macho (maduro) sembrados en medio de cultivo sólido, a las 2 h de incubación, sobre fotografías tomadas con una cámara Olympus DP7 con software Image pro Plus montada en un microscopio BX41 Olympus con el objetivo en 10x.

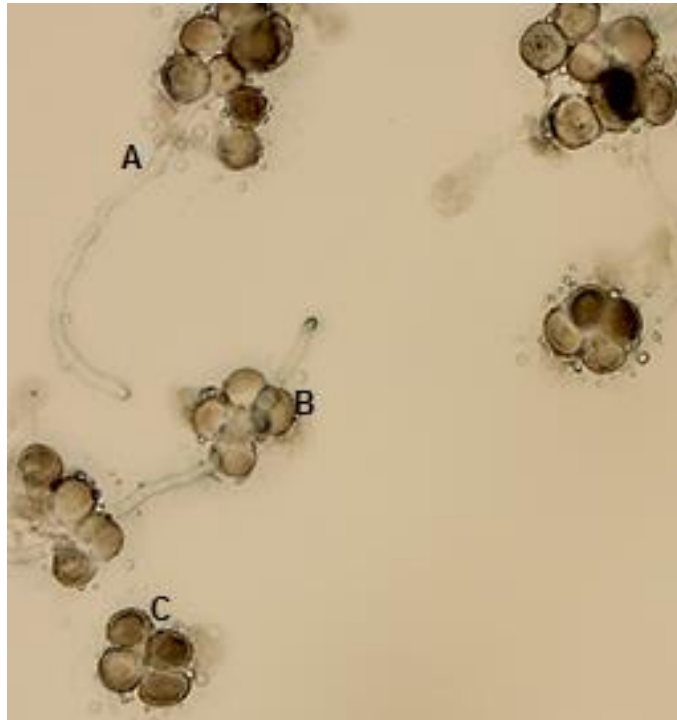


Ilustración 5. Germinación de polen. A; grano de polen germinado. B: polen iniciando el proceso de germinación. C: polen en tétradas.
Elaborado por. Minchala N, 2018.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Porcentaje de germinación

Los datos registrados para la variable porcentaje de germinación (ecotipo, tiempo y estado fenológico) se muestran en los anexos del uno al tres. En tanto que, las medias obtenidas para el análisis estadístico se detallan en la tabla 9, valores que fueron transformados a $\sqrt{X+0,5}$ para el análisis de varianza, debido a que existen valores cero (González G. , 1985) y porque los datos no se distribuían de manera normal según el método gráfico Q-Q plot del paquete estadístico InfoStat (anexo 7) y la bondad del método de transformación (anexo 8).

Tabla 9. Medias del porcentaje de germinados de los granos de polen.

Porcentaje de germinación													
Ecotipos	E. fenológico	Pre hembra				Hembra				Macho			
	Tiempos	2h	4h	8h	24h	2h	4h	8h	24h	2h	4h	8h	24h
Fabulosa (A1)		0	3	3	5	28	28	32	51	16	28	28	36
CHB027 (A2)		0	0	0	2	0	0	2	4	4	5	6	8
Guille (A3)		0	4	3	9	15	16	17	21	3	5	13	25
Abu (A4)		0	3	3	3	8	21	20	33	16	16	23	15
Fino de Jete (A5)		0	0	3	5	23	37	44	51	41	45	47	51
La Loma (A6)		0	0	8	3	3	6	10	15	13	16	28	28
T-55 (A7)		5	4	0	4	8	27	32	44	6	7	12	13
La playa (A8)		0	0	0	0	4	10	13	15	10	15	20	24
T-61 (A9)		0	0	0	0	6	16	17	19	16	21	22	24
Austro (A10)		4	4	4	4	10	17	18	18	31	45	48	55

Fuente: Información primaria.

Elaborado por. Minchala N, 2018.

El Análisis de Varianza (ADEVA) (tabla 10), muestra como los factores (Ecotipos, Tiempos y Estados fenológicos) incidieron directamente en la variable porcentaje de germinación de polen de chirimoyo; pues existe diferencias estadísticas altamente significativas en cada una de ellos, al igual que sus interacciones. El coeficiente de variación para este estudio es de 4,01 %, aceptable en trabajos de laboratorio.



Tabla 10. Análisis de varianza para la variable porcentaje de germinación;

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamientos	1762.82	119	14.81	828.46	<0.0001
Ecotipos	381.07	9	42.34	2367.96	<0.0001
Tiempo	126.65	3	42.22	2360.92	<0.0001
Estados fenológicos	896.49	2	448.25	25068.5	<0.0001
Ecotipos*Tiempos	17.16	27	0.64	35.54	<0.0001
Ecotipos*Estados fenológicos	276.81	18	15.38	860.04	<0.0001
Tiempo*Estados fenológicos	15.67	6	2.61	146.1	<0.0001
Ecotipos*Tiempo*Estados fenológicos.	48.96	54	0.91	50.71	<0.0001
Error	6.44	360	0.02		
Total	1769.25	479			

Fuente: Información primaria.

Elaborado por. Minchala N, 2018.

4.1.1 Prueba de Tukey para factor ecotipos

Realizada la prueba de Tukey al 5% para las comparaciones entre tratamientos, se detectó 9 rangos de significancia para el factor ecotipos (Gráfico1), destacándose Fino de Jete con el 28,75 % de granos de polen germinados, luego Austro (21.44 %) y Fabulosa (21,31 %) que se comportaron de manera similar, finalmente CHB027 presenta el promedio más bajo de germinación (2,42 %). Sin embargo, los porcentajes de germinación de polen del ecotipo Fino de Jete, son bajos comparado con los datos obtenidos por Rosell, Herrero, & Galán Saúco, (1999) que alcanzó un 50 % de germinación, el mismo autor en el (2006) señala que el polen puede germinar sin pre hidratación hasta los 120 minutos después de la dehiscencia de la antera (70 % de germinación), transcurrido este lapso de tiempo es indispensable hidratarlo, debido a que el polen del chirimoyo es muy sensible a la deshidratación.

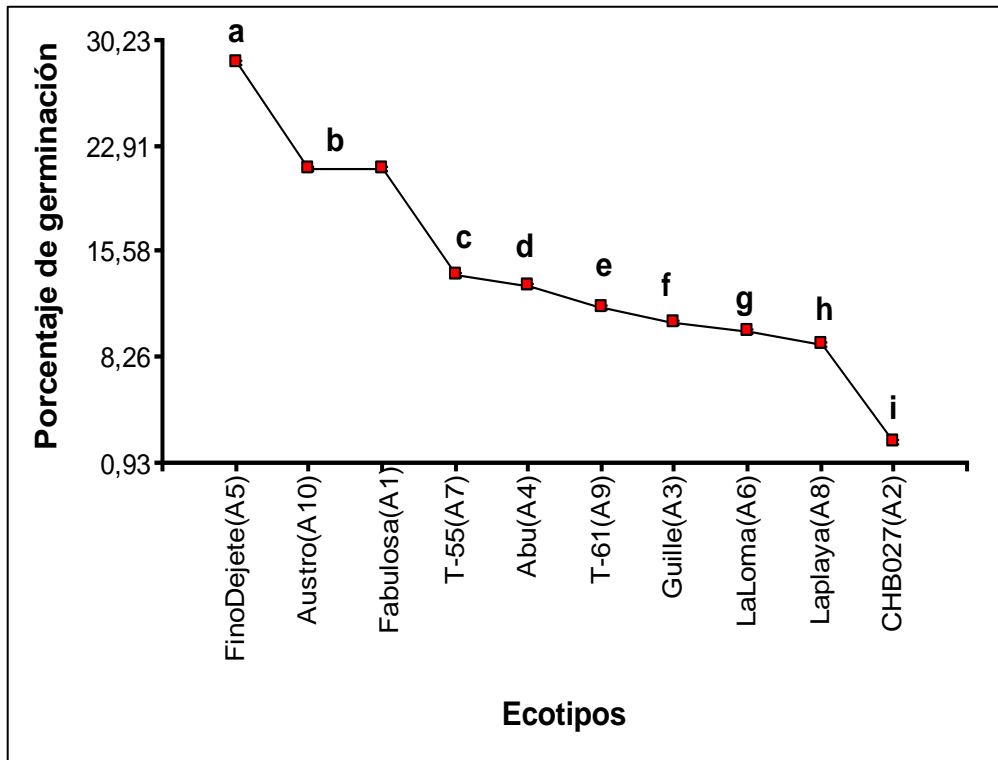


Gráfico 1. Prueba de Tukey al 5% para porcentaje de germinación de polen *in-vitro*, factor ecotipos.

Elaborado por. Minchala N, 2018.

4.1.2 Prueba de Tukey para el factor tiempo

El Gráfico 2, muestra el porcentaje de germinación alcanzado de acuerdo al tiempo transcurrido desde la siembra del polen en el medio de cultivo, evidenciándose la mayor germinación (19,33 %) a las 24 h. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Rosell, Herrero, & Galán Saúco (1999), quien menciona que tras la hidratación del polen, ya sea en el estigma o *in-vitro*, la germinación ocurre rápidamente y se completa casi en su totalidad dentro de las 2 h *in-vitro* y en 5 h *in vivo*; probablemente, se deba a la acción de la temperatura y humedad relativa durante la manipulación de las muestras (traslado y almacenado), como lo indica Lora , Jorge; Herrero, María ; Hormaza, Iñaki (2007), donde el porcentaje de germinación del polen disminuyó con el aumento de la temperatura, es decir, temperaturas mayores a 30°C en el desarrollo de la flor o en el proceso de la germinación del polen afectan la viabilidad del mismo. Por lo tanto se considera como temperatura óptima para ambos procesos alrededor de 25°C.

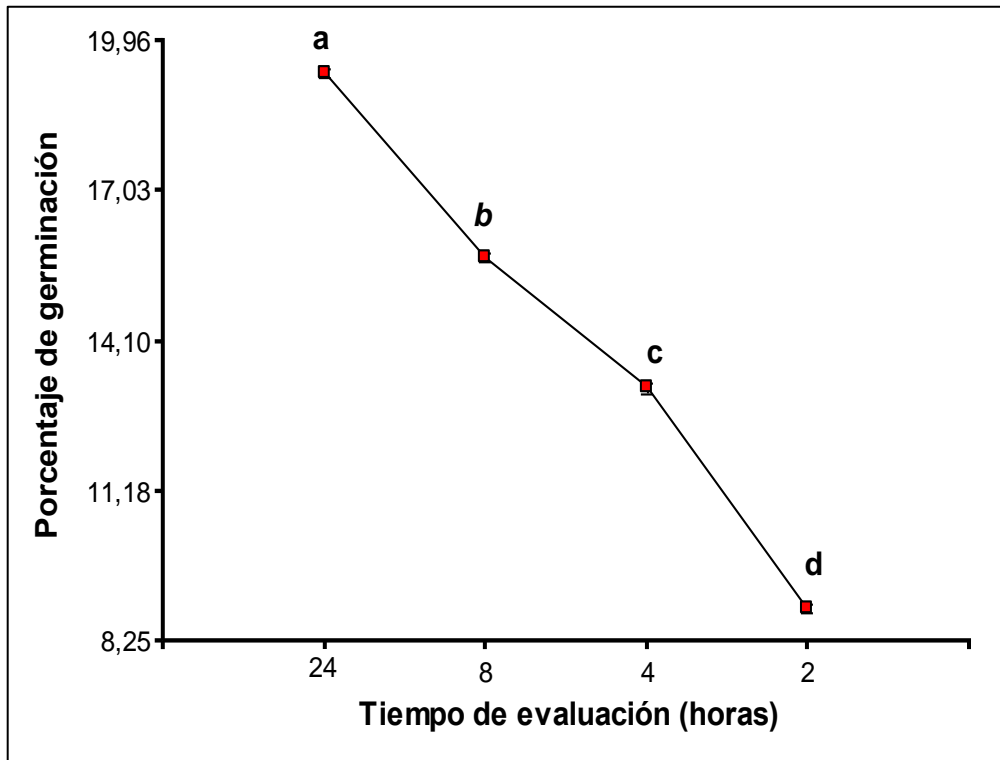


Gráfico 2. Prueba de Tukey al 5% para porcentaje de germinación de polen *in-vitro*, factor tiempo.

Elaborado por. Minchala N, 2018.

4.1.3 Prueba de Tukey para el factor estado fenológico)

El estado fenológico de la flor de chirimoyo tiene influencia en el porcentaje de germinación del polen como muestra el gráfico 3. Donde los porcentajes más altos se obtuvieron con polen recolectado en estado macho (22 %), en concordancia con los trabajos de (2007), (2006), debido a la característica tricelular del polen de *Annona cherimola* en el momento de la dehiscencia de la antera. Este tipo de polen se caracteriza por una rápida germinación en comparación con el polen bicelular, pero una vida efímera y rápida pérdida de vigor tras su liberación de la antera, siendo muy sensible a la desecación Larranaga et al (2017). Polen de flores en estado femenino también alcanzaron un alto porcentaje de germinación (18,84 %), revelando que el polen recolectado en ese estado, puede ser utilizado sin inconvenientes.

Estos resultados están relacionados con los hallazgos de Lora , Herrero, & Hormaza, (2012) quienes indican que la división mitótica (mitosis II) ocurre en el segundo día del ciclo de floración, una aceleración de este proceso ocurre cuando se separan las

flores del árbol y se mantienen a temperatura ambiente. Por ello que la práctica más habitual en polinización artificial es el empleo de polen recogido de flores en pre anthesis y almacenadas por un lapso de tiempo promedio de 15 h. Polen recogido en estado pre hembra muestra casi nula germinación, indicando que el polen de este estado fenológico tiene que ser guardado para alcanzar un mayor porcentaje de germinación (González, Hueso, Alonso, & Pinillos, 2010).

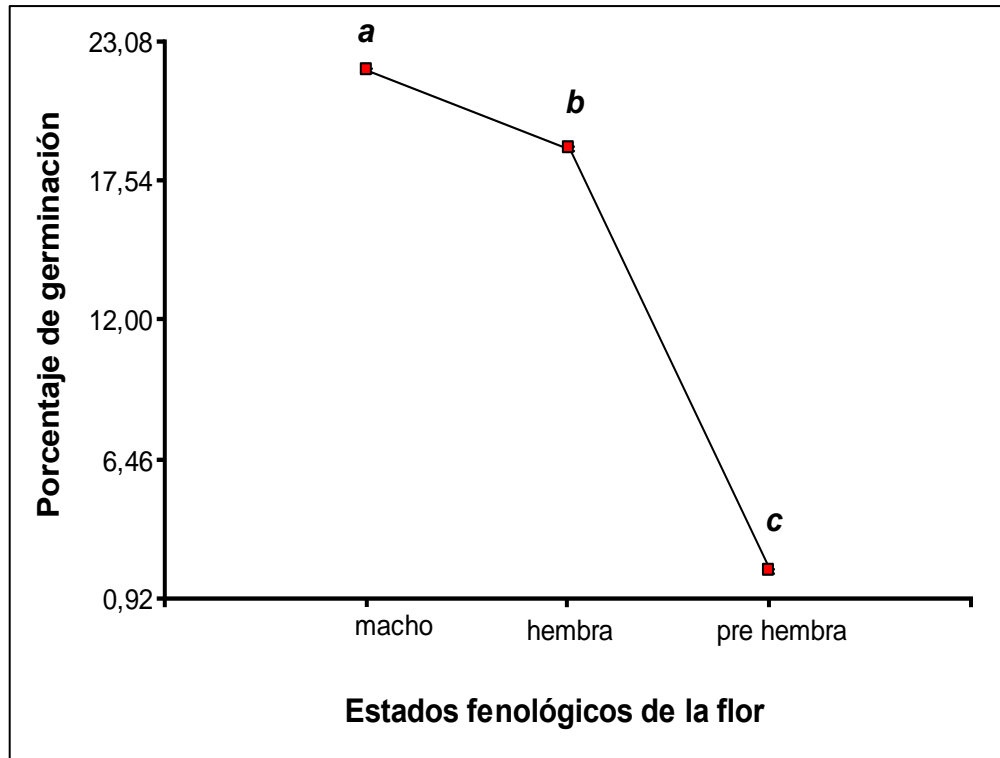


Gráfico 3. Prueba de Tukey al 5% para porcentaje de germinación de polen in-vitro, factor estados fenológicos.

Elaborado por. Minchala N, 2018.

4.1.4 Prueba de Tukey para la interacción ecotipos x tiempo

La prueba de Tukey al 5% para la interacción entre ecotipos y tiempo, destaca que los mayores porcentajes de germinación tienen lugar a las 24h posteriores a la siembra del polen como se puede observar en el caso del ecotipo Fino de Jete que alcanzó el 31,25 % a las 8 h y 35,33 % a las 24 h posteriores a la siembra, Fabulosa con el 30,33 % a las 24 h, en tanto CHB027 mostró el promedio más bajo de germinación (4,67 %) a las 24 h (tabla 11).



La variabilidad en la germinación del polen se encuentra influenciada por el factor genético del cultivar y las condiciones climáticas del medio como lo menciona Rosell, Herrero, & Galán Saúco, (1999) quien registró diferencias en el porcentaje de germinación de una misma variedad cultivada en condiciones distintas. Los valores porcentuales de germinación de polen *in vitro* obtenidos, son reforzados por los resultados obtenidos por Apolonio, Castañeda, Franco, Morales, & González, (2015) en polen *in vivo*, donde el mejor porcentaje de amarre de frutos se obtuvo con polen del cultivar ‘Bonita’ en un 85 %, seguido por ‘Campas’ con un 58,66%. Según Escobar (1996), se incrementa el amarre de frutos del cultivar ‘Cumbe’ con polen de Bronceada, afirmándose que la fuente de polen mejora significativamente el amarre e incrementa la producción de frutos.

Tabla 11. Prueba de Tukey 5% para porcentaje de germinación de polen *in vitro*, interacción ecotipo y tiempo.

Ecotipos	Tiempo	Medias	Rangos
Fino de Jete	24h	35.33	a
Fino de Jete	8h	31.25	b
Fabulosa	24h	30.33	b
Fino de Jete	4h	27	c
Austro	24h	25.67	c
Austro	8h	23.42	d
Austro	4h	21.92	d e
Fino de Jete	2h	21.42	e f
Fabulosa	8h	20.67	e f g
T-55	24h	19.92	f g
Fabulosa	4h	19.75	g
Guille	24h	18.08	h
T-55	8h	17.25	h
Abu	24h	16.75	h i
La Loma	24h	15.25	i j
Abue	8h	15.17	i j
Austro	2h	14.75	j k
Fabulosa	2h	14.5	j k l
T-61	24h	14.33	j k l
Abu	4h	13.25	k l m
La playa	24h	13	l m
T-61	8h	12.92	l m
La Loma	8h	12.5	m n
T-55	4h	12.5	m n
T-61	4h	12.33	m n o
La playa	8h	11	n o
Guille	8h	10.83	o
La playa	4h	8.25	p
Guille	4h	8.08	p
Abu	2h	7.92	p
T-61	2h	7.25	p Q
La Loma	4h	7.17	p Q
T-55	2h	6.08	Q r
Guille	2h	5.83	Q r



Ecotipos	Tiempo	Medias	Rangos
La Loma	2h	5.25	r
CHB027	24h	4.67	r
La playa	2h	4.58	r
CHB027	8h	2.33	s
CHB027	4h	1.5	s
CHB027	2h	1.17	s

Fuente. Información primaria.

Elaborado por. Minchala N, 2018.

4.1.5 Prueba de Tukey para la interacción ecotipos x estados fenológicos

El estado fenológico de la flor de chirimoyo tiene gran influencia en el porcentaje de germinación del polen como muestra la tabla 12, donde el porcentaje más alto se obtuvo con polen recolectado en estado macho en el caso de algunos ecotipos como Fino de Jete (45.81 %) y Austro (44,71 %), en cambio Fabulosa (34,56 %) y T-55 (27,44) presentaron mayor porcentaje de germinación en estado hembra, esto probablemente se deba a que son más sensibles a las condiciones ambientales (deshidratación) y pérdida de viabilidad tras la liberación del polen tal como lo menciona Lora, Perez , Fuentetaja, & Hormaza, (2006), por lo tanto, es aconsejable utilizar polen de los dos estados fenológicos, en cambio, polen recolectado en etapa pre hembra de la flor, el porcentaje de germinación es prácticamente nulo.

Tabla 12. Prueba de Tukey al 5% para porcentaje de germinación de polen *in-vitro*, interacción ecotipo y estado fenológico.

Ecotipos	E. fenológicos	Medias	Rangos
Fino de Jete	Macho	45.81	A
Austro	Macho	44.75	A
Fino de Jete	Hembra	38.56	b
Fabulosa	Hembra	34.56	c
T-55	Hembra	27.44	d
Fabulosa	Macho	26.75	d
La Loma	Macho	21.25	e
T-61	Macho	20.69	e
Abu	Hembra	20.31	e
Abu	Macho	17.38	f
La playa	Macho	17.19	f g
Guille	Hembra	17.13	f g
Austro	Hembra	15.94	g
T-61	Hembra	14.44	h
Guille	Macho	11.19	i
La playa	Hembra	10.44	i j



Ecotipos	E. fenológicos	Medias	Rangos
T-55	Macho	9.44	j k
La Loma	Hembra	8.25	k
CHB027	Macho	5.44	l
T-55	Prehembra	4.94	l m
Guille	Prehembra	3.81	m n
Austro	Prehembra	3.63	m n
Fabulosa	Prehembra	2.62	n o
Abu	Prehembra	2.13	o
Fino de Jete	Prehembra	1.88	o p
CHB027	Hembra	1.31	o p q
La Loma	Prehembra	0.63	p q
CHB027	Prehembra	0.5	p q
La playa	Prehembra	0	q
T-61	Prehembra	0	q

Fuente. Información primaria.

Elaborado por. Minchala N, 2018.

4.1.6 Prueba de Tukey para la interacción tiempo x estado fenológico

Los factores tiempo y estado fenológico de la flor influyeron en la germinación del polen; existiendo mejores resultados a las 8 h de la siembra en el estado macho, en comparación al estado hembra, sin embargo, transcurridas las 24 h los porcentajes de los dos estados se equiparan como muestra la tabla 13.

Durante la recolección se pudo observar que las flores en estado hembra presentaban anteras abiertas expulsando polen, esta actividad ocurre por la disminución del contenido de agua en flores recolectadas y mantenidas a temperatura ambiente, ocasionando una aceleración de la actividad celular debida a un ritmo más rápido de la mitosis II con un mayor porcentaje de polen tricelular en la dehiscencia de anteras. Una ligera deshidratación acelera la mitosis II, en cambio si ésta es fuerte provoca una reducción de la germinación o muerte del grano de polen (Lora , Herrero, & Hormaza, 2012).

Polen recolectado en estado fenológico pre hembra, presentó niveles bajos de germinación, alcanzando un incremento de germinación a las 24 h posteriores de la puesta del polen en el medio de cultivo, no se registra germinación transcurrida las 2 primeras. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Lora, Perez , Fuentetaja, & Hormaza,

(2006), quien indica que polen de flores en etapa hembra en su primer día del ciclo de floración todavía no se encuentra totalmente desarrollado.

Tabla 13. Prueba de Tukey al 5% para porcentaje de germinación de polen *in-vitro*, interacción estado fenológico y tiempo.

Ecotipos	E.fenológicos	Medias	Rangos
24h	Macho	27.75	a
24h	Hembra	27.05	a
8h	Macho	24.55	b
8h	Hembra	20.3	c
4h	Macho	20.23	c
4h	Hembra	17.65	d
2h	Macho	15.43	e
2h	Hembra	10.35	f
24h	Prehembra	3.2	g
8h	Prehembra	2.35	h
4h	Prehembra	1.65	h
2h	Prehembra	0.85	i

Fuente. Información primaria

Elaborado por. Minchala N, 2018.

4.2 Longitud del tubo polínico

Los datos registrados para la variable longitud del tubo polínico se muestran en los anexos del cuatro al seis, en tanto que las medias se detallan en la tabla 14; para el análisis de variancia se permutó la unidad de medida de micras (μm) por milímetros (mm) y se transformaron los datos a $\sqrt{X+0,5}$, debido a que existen valores cero (González G. , 1985) y por qué los datos no se distribuían de manera normal como muestra el anexo 9, la prueba de normalidad (anexo 10) muestra el comportamiento ajustado de los datos.

Tabla 14. Medias de la longitud del tubo polínico.

Longitud del tubo polínico													
Ecotipos	E. fenológicos	Pre hembra				Hembra				Macho			
	Tiempo	2 h	4 h	8 h	24 h	2 h	4 h	8 h	24 h	2 h	4 h	8 h	24 h
Fabulosa (A1)		0	471	543	1236	178	447	1494	1816	370	484	1569	2162
CHB027 (A2)		0	0	0	991	0	0	133	563	207	265	607	2007
Guille (A3)		0	291	731	1327	201	424	595	1537	268	573	722	1896
Abu (A4)		0	240	1140	1102	414	544	783	1514	699	804	913	1897
Fino de Jete(A5)		0	0	1043	1298	392	507	945	1874	461	587	1084	2017
La Loma (A6)		0	0	0	1387	221	697	887	1622	596	775	948	1950
T-55 (A7)		542	539	1023	1560	582	766	1133	1863	603	828	1358	2112
La playa (A8)		0	0	0	0	303	369	525	1440	768	878	1080	1506
T-61 (A9)		0	0	0	0	506	670	784	1646	623	806	1032	1846
Austro (A10)		525	851	1586	1673	576	909	1800	2365	699	921	2201	2415

Fuente. Información primaria

Elaborado por. Minchala N, 2018.

El ADEVA (tabla 15), muestra como los factores en estudio (ecotipos, tiempos y estados fenológicos) guardan relación con la variable longitud del tubo polínico, encontrando diferencias estadísticas significativas en cada una de ellos, al igual que en sus interacciones. El coeficiente de variación es de 3.7 %, aceptable para investigaciones a nivel de laboratorio.

Tabla 15. Análisis de varianza para la variable longitud del tubo polínico.

Datos en milímetros y transformados a $\sqrt{X+0,5}$.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamientos	38.01	119	0.32	182.12	<0.0001
Ecotipos	6.37	9	0.71	403.65	<0.0001
Tiempo	18.75	3	6.25	3563.67	<0.0001
Estados fenológicos	6.15	2	3.08	1754.58	<0.0001
Ecotipos*Tiempos	2.19	27	0.08	46.32	<0.0001
Ecotipos*Estados fenológico	2.49	18	0.14	79.01	<0.0001
Tiempo*Estados fenológicos	0.2	6	0.03	19.01	<0.0001
Ecotipos*Tiempo*Estados fenológicos.	1.84	54	0.03	19.48	<0.0001
Error	0.63	360	1.80E-03		
Total	38.64	479			

Fuente. Información primaria

Elaborado por. Minchala N, 2018.

4.2.1 Prueba de Tukey para el factor ecotipos

Realizada la prueba de Tukey al 5% para las comparaciones entre ecotipos en longitud del tubo polínico, se detectaron 10 rangos de significancia (Gráfico 4), destacándose Austro con el mayor desarrollo (1.38 mm), luego T-55 (1,08 mm) y Fabulosa (0.90 mm), finalmente CHB027 presenta 0,40 mm ubicándose en el último rango.

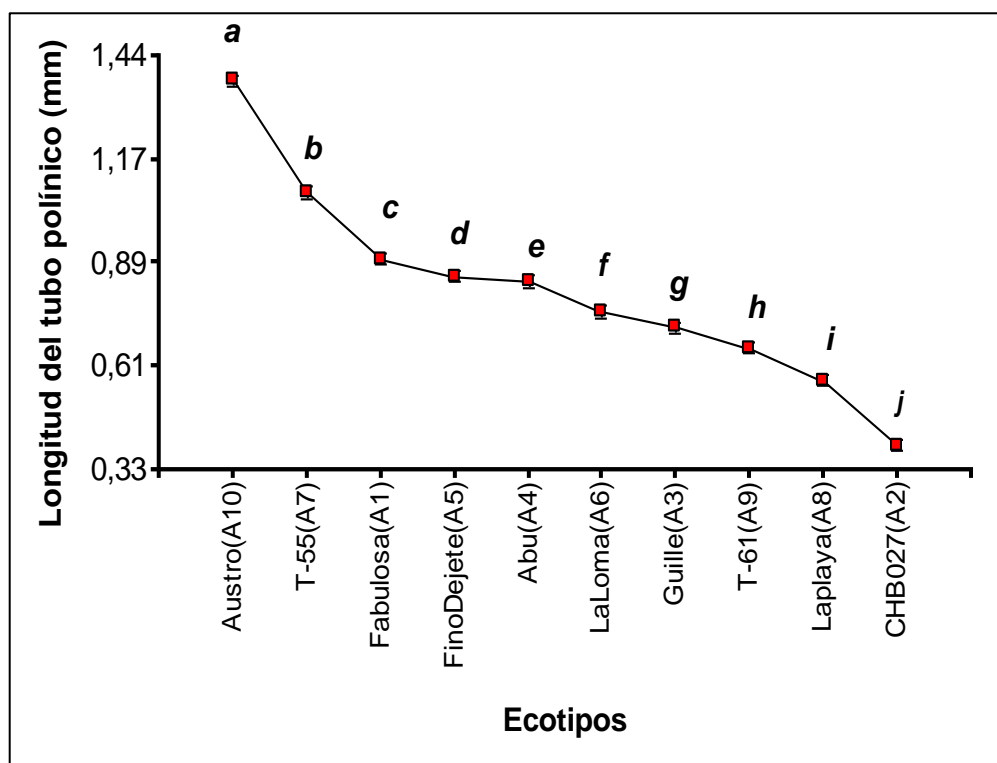


Gráfico 4. Prueba de Tukey al 5% para crecimiento del tubo polínico (mm), factor ecotipos.

Elaborado por. Minchala N, 2018.

4.2.2 Prueba de Tukey para el factor tiempo

El gráfico 5, muestra la longitud del tubo polínico alcanzado en función del tiempo transcurrido desde la siembra del polen en el medio de cultivo, evidenciándose que el mayor crecimiento (1.55 mm) fue a las 24 h (rango a). Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Rosell, Herrero, & Galán Saúco,(1999) quien indica que tras la hidratación del grano de polen de *Annona cherimola* este se separa de la condición de tétrada, aproximándose a completar el crecimiento del tubo polínico a las 2 h de realizada la siembra, es decir, si se realiza un tratamiento de pre hidratación del grano de polen el crecimiento del tubo polínico es rápido.

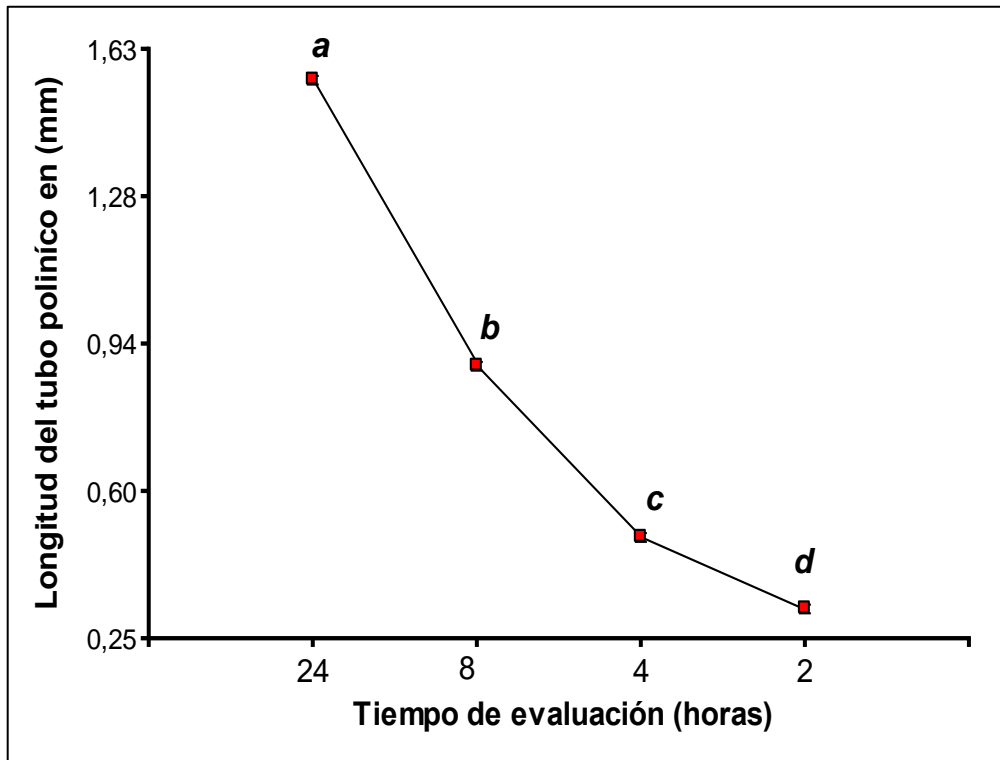


Gráfico 5. Prueba de Tukey al 5 % para crecimiento del tubo polínico (mm), factor tiempo. Elaborado por. Minchala N, 2018.

4.2.3 Prueba de Tukey para el factor estados fenológicos

El estado fenológico de la flor de *Annona cherimola* tiene influencia en la longitud del tubo polínico (Gráfico 6), pues el mayor crecimiento se obtuvo con polen recolectado en estado macho (1.09 mm) posicionándose en un rango a. Estos resultados concuerdan con lo expresado en Lora , Herrero, & Hormaza, (2007), (2006), de que el polen recolectado en estado macho debe ser utilizado inmediatamente para la polinización manual debido a su rápida germinación y crecimiento del tubo polínico. Polen extraído en estado pre hembra y hembra (día 1) tiene que ser guardado por un periodo de 15 horas para alcanzar el nivel fisiológico óptimo (2010).

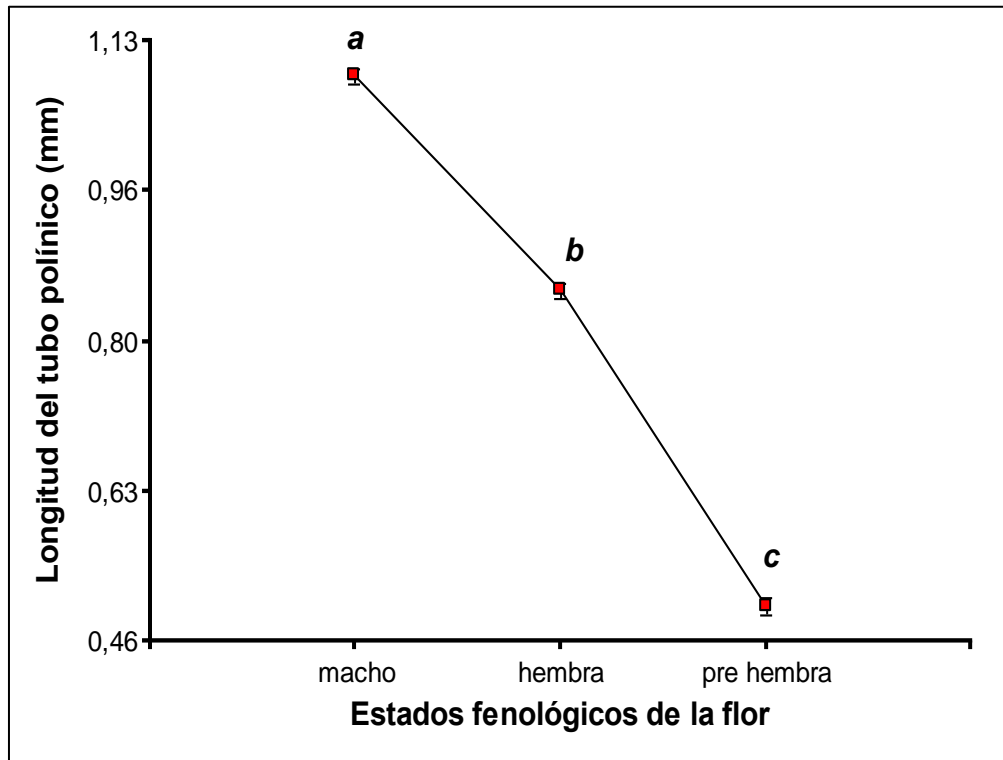


Gráfico 6. Prueba de Tukey al 5% para crecimiento de la longitud del tubo polínico (mm), factor estados fenológicos.

Elaborado por. Minchala N, 2018.

4.2.4 Prueba de Tukey para la interacción ecotipos x tiempo

La prueba de Tukey al 5% para la interacción entre ecotipos y tiempo, destaca que las mayores longitudes de tubo polínico tienen lugar a las 24h posteriores a la siembra del polen como se puede observar en el caso del ecotipo Austro con 1,86 mm a las 8 h y 2,15 mm a las 24 h de la siembra del polen en medio de germinación (rango a), T55 alcanzó 1,87 mm a las 24 h, en el mismo tiempo el menor crecimiento (0,98 mm) mostró el ecotipo La playa (rango g) (tabla16).

Tabla 16. Prueba de Tukey al 5% para crecimiento del tubo polínico (mm), interacción ecotipos y tiempo.

Ecotipos	Tiempo	Medias	Rangos																	
Austro	24h	2.15	a																	
Austro	8h	1.86	b																	
T-55	24h	1.84	b																	
Fabulosa	24h	1.74	b c																	
Fino de Jete	24h	1.73	b c																	
La Loma	24h	1.65	c d																	
Guille	24h	1.59	c d																	
Abu	24h	1.5	d																	
Fabulosa	8h	1.2	e																	
CHB027	24h	1.19	e f																	
T-55	8h	1.17	e f																	
T-61	24h	1.16	e f																	
Fino de Jete	8h	1.02	f g																	
La playa	24h	0.98	g																	
Abu	8h	0.95	g																	
Austro	4h	0.89	g																	
T-55	4h	0.71	h																	
Guille	8h	0.68	h i																	
La Loma	8h	0.61	h i j																	
T-61	8h	0.61	h i j																	
Austro	2h	0.6	h i j k																	
T-55	2h	0.58	h i j k l																	
La playa	8h	0.53	i j k l m																	
Abu	4h	0.53	i j k l m n																	
T-61	4h	0.49	j k l m n																	
La Loma	4h	0.49	j k l m n																	
Fabulosa	4h	0.47	j k l m n																	
Guille	4h	0.43	k l m n o																	
La playa	4h	0.42	l m n o p																	
T-61	2h	0.38	m n o p																	
Abu	2h	0.37	m n o p																	
Fino de Jete	4h	0.36	m n o p																	
La playa	2h	0.36	n o p																	
Fino de Jete	2h	0.28	o p q																	
La Loma	2h	0.27	o p q																	
CHB027	8h	0.25	p q r																	
Fabulosa	2h	0.18	q r s																	
Guille	2h	0.16	q r s																	
CHB027	4h	0.09	r s																	
CHB027	2h	0.07	s																	

Fuente. Información primaria.

Elaborado por. Minchala N, 2018.

4.2.5 Prueba de Tukey para la interacción ecotipos x estados fenológicos

El estado fenológico de la flor del chirimoyo tiene gran influencia sobre el desarrollo del tubo polínico como muestra la tabla 17, donde el mayor desarrollo se obtuvo en estado macho en el caso de ecotipos como Austro (1,56) (rango a) y T-55 (1,26) (rango c), sin embargo, Austro (1,41) (rango b) y T-55 (1,09) (rangos c,d,e) presentan también gran crecimiento en estado hembra, por lo que serían buenos candidatos a donantes de polen dentro de la polinización manual.

Tabla 17. Prueba de Tukey para crecimiento del tubo polínico (mm), interacción ecotipos y estados fenológicos.

Ecotipos	E.fenológicos	Medias	Rangos
Austro	Macho	1.56	a
Austro	Hembra	1.41	B
T-55	Macho	1.23	C
Austro	Prehembra	1.16	C d
Fabulosa	Macho	1.15	C d
T-55	Hembra	1.09	C d e
Abu	Macho	1.08	d e
T-61	Macho	1.08	d e
La Loma	Macho	1.07	d e f
La playa	Macho	1.06	d e f g
Fino de Jete	Macho	1.04	d e f g h
Fabulosa	Hembra	0.98	e f g h i
Fino de Jete	Hembra	0.93	f g h i j
T-55	Prehembra	0.92	g h i j k
T-61	Hembra	0.9	h i j k
Guille	Macho	0.86	i j k
La Loma	Hembra	0.86	i j k
Abue	Hembra	0.81	j k l
CHB027	Macho	0.77	k l m
Guille	Hembra	0.69	l m n
La playa	Hembra	0.66	m n
Abu	Prehembra	0.62	n
Guille	Prehembra	0.59	n
Fino de Jete	Prehembra	0.59	n
Fabulosa	Prehembra	0.56	n
La Loma	Prehembra	0.35	o
CHB027	Prehembra	0.25	o p
CHB027	Hembra	0.17	p
T-61	Prehembra	0	q
La playa	Prehembra	0	q

Fuente. Información primaria

Elaborado por. Minchala N, 2018.

4.2.6 Prueba de Tukey para la interacción tiempo x estado fenológico

Los factores tiempo y estado fenológico de la flor influyeron en el crecimiento del tubo polínico; existiendo mejores resultados a las 24 h en estado macho (1,98 mm) (rango a), como en estado hembra (1,62 mm) (rango b), (tabla 18). Condiciones climatológicas óptimas (25 °C y 80% de humedad) en este lapso de tiempo (24 h) son cruciales para lograr un buen desarrollo del tubo polínico garantizando así su llegada al saco embrionario y logrando la fecundación (Lora, Hormaza, & Herrero, 2012). Por otro lado, el desarrollo de los tubos polínicos del polen recogido en pre antesis (pre hembra) muestran longitudes pequeñas (0,11 mm) (rango j), por lo que el polen debe ser guardado por un lapso de tiempo hasta que madure fisiológicamente y sea viable su uso para la polinización manual (González, Hueso, Alonso, & Pinillos, 2010).

Tabla 18. Prueba de Tukey al 5% para crecimiento del tubo polínico (mm), interacción tiempo y estados fenológicos

Tiempo	E.fenológicos	Medias	Rangos
24h	Macho	1.98	a
24h	Hembra	1.62	b
8h	Macho	1.15	c
24h	Prehembra	1.06	d
8h	Hembra	0.91	e
4h	Macho	0.69	f
8h	Prehembra	0.61	g
4h	Hembra	0.53	g
2h	Macho	0.53	g
2h	Hembra	0.34	h
4h	Prehembra	0.24	i
2h	Prehembra	0.11	j

Fuente. Información primaria

Elaborado por. Minchala N, 2018.

4.3 Forma y tamaño de los granos de polen

4.3.1 Forma de los granos de polen

La determinación de la forma de los granos de polen se realizó mediante observación al microscopio BX41 de marca Olympus con objetivo 10x, luego de dos horas de haberlos puesto en medio de cultivo y comparándolos con la clave presentada por (Maita, 2006).

Para determinar su forma se aplicó la fórmula:

$$F = \frac{P}{E} \quad \text{Donde} \quad F = \text{Forma}$$

P = Longitud del eje polar
E = Longitud del eje ecuatorial

Valores de F, con sus respectivas denominaciones para la forma del grano de polen:

- Prolato-esferoidal (P/E = 1,14 – 1,00)
- Subprolato (P/E = 1,33 – 1,14)
- Prolato (P/E = 2 – 1,33)
- Per-prolato (P/E = 2)

Los valores de F para los diez ecotipos de *Annona Cherimola* estudiados se muestran en la tabla 19, determinándose las formas: Subprolato, alargados en dirección del eje polar y Prolato-esferoidal, de apariencia casi redonda con una leve elongación del eje polar; estos resultados concuerdan con Ortiz & Cogua, (1989), que expone la semejanza de los granos de polen de especies pertenecientes a una misma familia.

Tabla 19. Forma del grano de polen de diez ecotipos de chirimoyo *A. cherimola* (micras).

Ecotipos	Longitud eje polar (P)	Longitud eje ecuatorial €	Valor de Forma (F)	Forma
Fabulosa(A1)	133.98	115.35	1.16	Subprolato
CHB027(A2)	148.64	133.98	1.11	Prolato-esferoidal
Guille(A3)	153.66	138.5	1.11	Prolato-esferoidal
Abu(A4)	144.91	124.52	1.16	Subprolato
Fino de Jete(A5)	136.15	119.72	1.14	Subprolato
La Loma(A6)	131.58	130.77	1.01	Prolato-esferoidal
T-55(A7)	146.33	131.67	1.11	Prolato-esferoidal
La playa(A8)	136.29	122.35	1.11	Prolato-esferoidal
T-61(A9)	152.22	121.89	1.25	Subprolato
Austro(A10)	143.91	121.2	1.19	Subprolato

Fuente. Información primaria.

Elaborado por. Minchala N, 2018.



4.3.2 Tamaño del grano de polen

El tamaño del grano de polen está definido por la longitud de su eje polar y ecuatorial (Maita, 2006). Para la determinación de esta característica se utilizó polen bien desarrollado colectado en momento de la dehiscencia de la antera, teniendo en cuenta el hecho de que el tamaño del grano de polen puede variar según el grado de madurez del mismo como lo menciona Soejarto & Fonnegra, (1972); se tomaron 20 mediciones de los granos de polen tanto del eje polar como ecuatorial a las dos horas de haberlos colocado en el medio de germinación.

Para la caracterización del tamaño del polen de los diez eco tipos de chirimoyo se tomó como base la lista propuesta por Soejarto & Fonnegra, (1972) para los dos ejes (polar y ecuatorial) (tabla 20), característica relevante que permitirá plantear estudios sobre dispersión del mismo.

Tabla 20. Clasificación del grano de polen acuerdo al tamaño.

Tamaño del polen	Medidas
Muy pequeño	<10 μm
Pequeño	10 - 25 μm
Medio	25 - 50 μm
Grande	50 - 100 μm
Muy Grande	100 - 200 μm
Gigante	> 200 μm

Fuente. (Soejarto & Fonnegra, 1972)

El análisis de variancia para longitud del eje polar del grano de polen determinó alta significancia entre ecotipos (tabla 21). El coeficiente de variación es de 7,25% y se encuentra dentro de un rango aceptable.

Tabla 21. Análisis de variancia para longitud del eje polar del grano de polen de diez ecotipos de chirimoyo

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	43937.55	9	4881.95	45.56	<0.0001
Ecotipos	43937.55	9	4881.95	45.56	<0.0001
Error	84658.36	790	107.16		
Total	128595.91	799			

Fuente. Información primaria.

Elaborado por. Minchala N, 2018.

La prueba de significación de Tukey al 5% presenta 3 rangos (tabla 22). Se evidencia que la longitud del diámetro polar es propia para cada ecotipo de la colección en estudio.

De los valores registrados para el diámetro polar del grano de polen se tiene que el más alto corresponde al ecotipo Guille con 153,66 micras y el menor corresponde al La Loma con 131,58 micras, categorizándose como polen de tamaño muy grande.

Tabla 22. Prueba de Tukey al 5% para longitud del diámetro polar de grano de polen.

Ecotipos	Medias (micras)	Rangos	
Guille(A3)	153.66	a	
T-61(A9)	152.22	a	
CHB027(A2)	148.64	a	b
T-55(A7)	146.33		b
Abu(A4)	144.91		b
Austro(A10)	143.91		b
La playa(A8)	136.29		c
Fino de Jete(A5)	136.15		c
Fabulosa(A1)	133.98		c
La Loma(A6)	131.58		c

Fuente. Información primaria.

Elaborado por. Minchala N, 2018.

El análisis de varianza correspondiente al diámetro ecuatorial del grano de polen de los diez ecotipos en estudio, da como resultado diferencias altamente significativas (tabla 23). El coeficiente de variación de 7,96 (%) da confiabilidad a los resultados.

Tabla 23. Análisis de variancia para el diámetro ecuatorial del grano polen de diez ecotipos de chirimoyo.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	38644.41	9	4293.82	42.7	<0.0001
ecotipos	38644.41	9	4293.82	42.7	<0.0001
Error	79446.88	790	100.57		
Total	118091.3	799			

Fuente. Información primaria.

Elaborado por. Minchala N, 2018.

La prueba de Tukey al 5% para el diámetro ecuatorial del grano de polen establece cuatro rangos, en donde el Ecotipo Guille ocupa el primer rango con un valor de 138,50 micras y el último rango corresponde a Fabulosa con un valor de 115,35 micras



respectivamente. Estos resultados determinan que el polen de *Annona cherimola* es de tamaño muy grande, esta particularidad junto a la característica de permanecer unidos en tétrada tras la apertura de la antera dificultan seriamente la dispersión del polen de esta especie por el agua o viento, limitando la polinización (Atiencia, 2010).

Tabla 24. Prueba de Tukey al 5% para en diámetro ecuatorial del grano de polen

Ecotipos	Medias (micras)	Rangos
Guille(A3)	138.5	a
CHB027(A2)	133.98	a b
T-55(A7)	131.67	b
La Loma(A6)	130.77	b
Abu(A4)	124.52	c
La playa(A8)	122.35	c
T-61(A9)	121.89	c
Austro(A10)	121.2	c
FinoDejete(A5)	119.72	c d
Fabulosa(A1)	115.35	d

Fuente. Información primaria.

Elaborado por. Minchala N, 2018.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos y en respuesta a los objetivos planteados se concluye:

El ecotipo Fino de Jete presenta un mayor porcentaje de germinación de polen en cada periodo de tiempo evaluado (2, 4, 8 y 24 h) desde la siembra *in-vitro* y en los estados fenológicos de la flor (hembra y macho), el ecotipo CHB027 muestra un promedio bajo de germinación para los mismos tiempos y estados fenológicos de la flor.

El estado ideal de la flor de chirimoyo para la recolección de polen, se establece en el momento de la apertura de las anteras (estado macho), resultando esta etapa fundamental por presentar mayor porcentaje de germinación y longitud del tubo polínico.

De los diez ecotipos de chirimoyo estudiados, Austro presenta el mayor desarrollo del tubo polínico en cada lapso de tiempo analizado (2, 4, 8 y 24 h) desde la siembra en el medio de germinación y en los tres estados fenológicos de la flor; este cultivar a pesar de no presentar el mayor porcentaje de germinación, es uno de los mejores valorados, con diferencia de los ecotipos CHB027 y La Playa que evidencian bajos porcentajes de germinación como de longitud del tubo polínico.

Realizada la valoración de la calidad de polen de los diez ecotipos de chirimoyo (*Annona cherimola*) de la colección *ex situ* de la Estación Experimental del Austro (del INIAP), se infiere la existencia de ecotipos generadores de polen de diferente calidad, por tanto se acepta la hipótesis planteada en la investigación.

El polen del chirimoyo tiene forma subprolato, y prolato-esferoidal, guardando semejanzas entre ellos. En cuanto a su tamaño se clasifica como muy grande.

6. RECOMENDACIONES

Para la polinización de *Annona cherimola* se recomienda efectuar la recolección de polen en estado macho de la flor, estado fenológico que muestra mayor porcentaje de germinación y longitud del tubo polínico.

Se sugiere la utilización de polen del ecotipo Fino de Jete como de Austro por la valoración obtenida en la calidad de polen.

Se recomienda desarrollar ensayos para la determinación precisa del inicio de la apertura de las anteras de la flor y periodo de receptividad estigmática en esta especie.

El mantenimiento e incremento de la colección *ex-situ* de chirimoyo *Annona cherimola* por parte de la Estación Experimental del Austro (INIAP).

El desarrollo de programas de mejoramiento genético con los ecotipos de la zona para proporcionar a los fruticultores material productivo de mejor calidad.



BIBLIOGRAFÍA

- Kuroki , K., Takemura, Y., Mingfe, J., Marumori , H., Teratani , N., Matsumoto , K., . . . Tamura, F. (Enero de 2017). Pear pollen selection using higher germination properties at low temperatures and the effect on the fruit set and quality of Japanese pear cultivars. *Scientia Horticulturae*(200,204).
- Rosell, P., Herrero, M., & Galán Saúco, V. (1999). Pollen germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). In vivo characterization and optimization of in vitro germination. *Scientia Horticulturae*(81), 251-265.
- Rosell, P., Herrero, M., & Galán Saúco, V. (1999). Pollen germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). In vivo characterization and optimization of in vitro germination. *Scientia Horticulturae*, 251-265.
- Agusti, M. (2010). *Fruticultura*. Madrid: Mundiprensa.
- Andino, F. (2014). Determinación de la eficiencia de cuatro niveles de flores polinizadas, utilizando dos métodos de polinización manual, en chirimoya (*Annona cherimola* Mill), Guachapala-Azuay-Ecuador. *Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo*. Cuenca, Azuay, Ecuador: Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias .
- Apolonio, I., Castañeda, Á., Franco, O., Morales, E., & González, A. (Julio de 2015). Influencia de la fuente de polen y su efectividad en la calidad de frutos de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Agronomía Costarricense*, 39(1).
- Arribasplata, R. (2013). Efecto de la aplicación foliar de calcio, en precosecha, en la calidad de fruta del cultivo de chirimoya (*Annona cherimola* Mili.). *Para optar el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo*. Cajamarca, Peru: Universidad Nacional de Cajamarca. Recuperado el 2017
- Atienza, V. (2010). Estudio de la viabilidad del polen de chirimoya (*Annona cherimola* Mill) almacenado en condiciones ambientales y controladas, como base para la polinización manual en la granja Tumbaco del programa de Fruticultura del INIAP. *Tesis previa a la obtención del Título de Ingeniero Agrónomo*. Tumbaco, Tumbaco, Ecuador: Univesidad Estatal de Bolivar.
- BioBanco. (7 de 2 de 2018). *Proyecto BioBanco, Ecuador: "Distribución de la especie cherimola en Ecuador"*. Obtenido de <http://www.biobanco.org/busqueda.php?query=cherimola>
- Čalić, D., & Radojević, L. (2017). Horse Chestnut pollen Quality. *Biologica Nyssana*, 49(1), 105-115. Recuperado el septiembre de 2017
- Dominguez, J., & Castañeda , A. (2002). Guía técnica para la producción de chirimoya. *Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de Mexico*. Obtenido de <http://cictamex.edu.mx/pdf/Chirimoya.pdf>

- Duchi, M. (2017). Caracterización pomológica y agromorfológica de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.), existentes en el INIAP y Universidad de Cuenca. *Tesis previa la obtención del título de Ingeniero Agrónomo*. Cuenca: Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Encalada, C. (20 de julio de 20). Visita técnica a Fruticultores. Paute .
- Escobar, M. (Diciembre de 1996). Polinización Artificial en Chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo*. San Antonio de Oriente , Honduras: Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano.
- García, W., Guzmán, B., Lino, B., Jorge , R., Hermoso, J., Guirado, E., . . . Iñaki, O. (2010). *Manual de manejo integrado del cultivo de chirimoya*. Cochabamba, Cochabamba , Bolivia: PROINPA.
- González, M. (Septiembre de 2013). Chirimoya (*Annona cherimola* Miller), Frutal Tropical y Sub-Tropical de valores Promisorios. *Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.*, 34(3), 52-63. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v34n3/ctr08313.pdf>
- González, G. (1985). *Métodos estadísticos y principios de diseño experimental* (221-222 ed.). Quito, Ecuador: Editorial Universitaria.
- González, M., Hueso, J., Alonso, F., & Pinillos, V. (2010). Diferencias en la viabilidad del polen de chirimoyo extraído en distintos momentos del ciclo de la flor. *Actas Horticultura*, 1(60).
- INIAP. (2015). *Fabulosa 2015. Nuevo clon de chirimoya (Annona cherimola Mill)*. Cuenca: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.
- Instituto Nacional de Invesigaciones Agropecuarias. (2018). *Condiciones Climatológicas de la Estación Experimental del Austro (INIAP)*. Gualaceo: INIAP.
- Larranaga, N., Albertazzi, F., Fontecha, G., Palmieri, M., Rainer, H., van Zonneveld, M., & Hormaza, J. (2017). A Mesoamerican origin of chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). Implications for the conservation of plant genetic resources. *Molecular Ecology*, 1-37. doi:0000-0001-5449-7444
- León, J. (2000). *Annona cherimola*. En *Botánica de los cultivos Tropicales*. San Jose, Costa Rica: Agroamérica.
- Lora , J., Herrero, M., & Hormaza, I. (2007). Germinación de polen de chirimoyo. Implicaciones para la optimización de la polinización manual. *Sociedad Española de Ciencias Hortícolas*(48).
- Lora , J., Herrero, M., & Hormaza, J. (2012). Pollen performance, cell number, and physiological state in the early-divergent angiosperm *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae) are related to environmental conditions during the final stages of pollen development. *Sexual Plant Reproduction*. Alemania. doi:DOI 10.1007/s00497-012-0187-2



- Lora, J., Hormaza, J., & Herrero, M. (2012). Pollen performance of *Annona cherimola* mill. (*Annonaceae*) is affected by temperature and moisture content during the final stages of Pollen development. *Acta Horticulturae*, 932(25). doi:10.17660 / ActaHortic.2012.932.8
- Lora, J., Perez , M., Fuentetaja, P., & Hormaza, J. (2006). Low temperature storage and in vitro germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) pollen. *Scientia Horticulturae*(108).
- Lora, J., Testillano, P., Risueño,, M., Hormaza, J., & Herrero, M. (2009). Pollen development in *Annona cherimola* Mill. (*Annonaceae*). Implications for the evolution of aggregated pollen. *BMC plant Biol*, 9(129). doi:10.1186/1471-2229-9-129
- Maita, S. (2006). Fenología de la Floración de las especies *Heilbornii*, *Cundinamarcensis*, *Palandensis* y *Stipulata* del Genero *Vasconcellea*, en la colección Ex - Situ del INIAP, Granja Bullcay, Gualaceo. *Tesis de grado previa la obtención del Título de Magíster en Producción Agrícola Sustentable*. Ambato, Ecuador: Universidad Técnica de Ambato.
- MAITA, S. (2011). *Manejo del ojo de pollo o antracnosis (Colletotrichum acutatum Simmonds) en el cultivo del tomate de árbol (Solanum betaceum Cav)*. Cuenca: Universidad Católica de Cuenca.
- Montiel, M. (2007). Fenología Floral y técnica de polinización artificial. *Taller Internacional de Manejo del chirimoyo*. Valparaiso: PUCV.
- Muradoglu, F., Beyhan, O., & Sonmez, F. (2017). Response to heavy metals on pollen viability, germination and tube growth of some apple cultivars. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26(7), 4456-4461.
- Ortiz, D., & Cogua, J. (1989). Reconocimiento de Granos de Polen de Algunas Plantas Melíferas en la Sabana de Bogotá. 6.
- Palanivelu, R., & Tsukamoto, T. (1012). Pathfinding in angiosperm reproduction: pollen tube guidance by pistils ensures successful double fertilization. *Developmental Biology*, 1.
- Pino, G. (2008). Obtención de frutos partenocárpicos de chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.) mediante el uso de reguladores de crecimiento. Quillota: Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Obtenido de <http://www.agronomia.ucv.cl>
- Rodríguez, M. (2013). Estudio de la chirimoya y propuesta de perostería de autor. *Disertación de grado previo a la obtención de Título de Ingeniera en Gastronomía*. Quito: Universidad Internacional del Ecuador.
- Rosell, P., Galán Saúco , V., & Herrero, M. (2006). Pollen germination as affected by pollen age in cherimoya. 109, 97-100. doi:10.1016/j.scienta.2006.02.022
- Soejarto, D., & Fonnegra, R. (1972). Polen: Diversidad en Formas y Tamaños. 1(1).

- Solís, L. (2011). Efecto de los fungicidas unisitios (curativos) sobre el porcentaje de germinación de granos germinados y la longitud del tubo polínico. *Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Ingeniero Ambiental*. Cuenca: Universidad Católica de Cuenca.
- Solís, M. (2012). Reprogramación del polen a embriogénesis inducida por estrés: identidad celular, muerte celular programada y papel de la metilación de DNA. *Tesis Doctoral*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Urbina, V. (2002). Fructificación de los frutales. *Paperkite*, 1(6).
- Vanegas, E., Encalada, C., Feicán, C., Gómez, M., & Veria, W. (2016). *Cianamida Hidrogenada y Nitrato de Potasio para manipular épocas de cosecha en Chirimoya (Annona cherimola Mill.)*. Cuenca: INIAP.
- Vanegas, I. (2014). Evaluación de cuatro niveles de polinización manual, en tres densidades de plantación en chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.), de cuatro años de edad, cantón Gualaceo, provincia del azuay - Ecuador. *Tesis de pregrado previo a la Obtención del Título de Ingeniero Agrónomo*. Gualaceo: Universidad Católica de Cuenca.
- Vásquez, W., Viteri, P., & León, J. (Febrero de 2007). El Chirimoyo (*Annona cherimola* mill) tecnología para mejorar la productividad y calidad de la fruta. *INIAP Programa de Fruticultura granja experimental Tumbaco*.
- Viera, W. (2016). Taller internacional de producción sustentable de cultivos agrícolas. *Producción sustentable de frutas*. Quito.



ANEXOS

En los anexos del uno al seis se muestra los valores obtenidos para la variable porcentaje de germinación y longitud del tubo polínico de los diez ecotipos analizados de la colección de chirimoyo (*Annona cherimola* Mill). Del siete al doce se presenta la prueba de normalidad de los datos transformados como los sin transformar para cada una de las variables en estudio. En el anexo trece se presenta el reporte de lluvia, viento y temperatura del lugar de recolección del material vegetal utilizado en la presente investigación y por último en el anexo catorce se presenta una imagen de los productos utilizados en la elaboración del medio de cultivo para la siembra de polen.

Anexo 1. Porcentajes de germinación de polen *in-vitro* de diez ecotipos de chirimoyo en estado fenológico pre-hembra evaluado en cuatro tiempos.

Porcentaje de germinación estado fenológico pre-hembra					
Tratamientos	Repeticiones	Tiempo			
		2h	4h	8h	24h
E1 (Fabulosa)	RI	0	3	3	5
E1 (Fabulosa)	R2	0	2	2	4
E1 (Fabulosa)	R3	0	4	4	3
E1 (Fabulosa)	R4	0	3	3	6
E2 (O27)	RI	0	0	0	2
E2 (O27)	R2	0	0	0	2
E2 (O27)	R3	0	0	0	2
E2 (O27)	R4	0	0	0	2
E3 (Guille)	RI	0	3	3	9
E3 (Guille)	R2	0	5	3	9
E3 (Guille)	R3	0	3	3	8
E3 (Guille)	R4	0	4	1	8
E4 (Abue)	RI	0	3	3	2
E4 (Abue)	R2	0	2	3	4
E4 (Abue)	R3	0	3	3	4
E4 (Abue)	R4	0	2	3	2
E5 (Fino de jete)	RI	0	0	3	5
E5 (Fino de jete)	R2	0	0	3	5
E5 (Fino de jete)	R3	0	0	4	4
E5 (Fino de jete)	R4	0	0	2	4
E6 (La loma)	RI	0	0	0	3
E6 (La loma)	R2	0	0	0	2
E6 (La loma)	R3	0	0	0	3
E6 (La loma)	R4	0	0	0	2
E7 (T-55)	RI	6	4	7	3
E7 (T-55)	R2	4	5	8	4
E7 (T-55)	R3	5	3	7	3
E7 (T-55)	R4	5	3	8	4
E8 (La playa)	RI	0	0	0	0
E8 (La playa)	R2	0	0	0	0
E8 (La playa)	R3	0	0	0	0
E8 (La playa)	R4	0	0	0	0
E9 (T-61)	RI	0	0	0	0
E9 (T-61)	R2	0	0	0	0
E9 (T-61)	R3	0	0	0	0
E9 (T-61)	R4	0	0	0	0
E10 (Austro)	RI	4	3	4	4
E10 (Austro)	R2	3	4	4	3



Porcentaje de germinación estado fenológico pre-hembra					
E10 (Austro)	R3	4	4	4	4
E10 (Austro)	R4	3	3	4	3

Fuente. Información primaria

Elaborado por. Minchala N, 2018.

Anexo 2. Porcentaje de germinación de polen *in vitro* en estado fenológico hembra evaluado en cuatro tiempos

Porcentaje de germinación estado fenológico macho					
Tratamientos	Repeticiones	Tiempo			
		2h	4h	8h	24h
E1 (Fabulosa)	R1	17	26	30	37
E1 (Fabulosa)	R2	17	28	25	34
E1 (Fabulosa)	R3	15	30	30	35
E1 (Fabulosa)	R4	15	28	25	36
E2 (O27)	R1	4	4	6	7
E2 (O27)	R2	4	4	5	9
E2 (O27)	R3	3	5	6	9
E2 (O27)	R4	3	5	5	8
E3 (Guille)	R1	2	5	12	25
E3 (Guille)	R2	3	5	14	24
E3 (Guille)	R3	2	6	11	26
E3 (Guille)	R4	3	4	13	24
E4 (Abue)	R1	17	17	23	15
E4 (Abue)	R2	15	16	23	14
E4 (Abue)	R3	16	16	25	14
E4 (Abue)	R4	15	16	21	15
E5 (Fino de jete)	R1	40	43	47	50
E5 (Fino de jete)	R2	41	46	47	51
E5 (Fino de jete)	R3	41	46	49	50
E5 (Fino de jete)	R4	43	43	45	51
E6 (La loma)	R1	12	16	29	28
E6 (La loma)	R2	11	17	26	29
E6 (La loma)	R3	14	16	28	29
E6 (La loma)	R4	14	15	29	27
E7 (T-55)	R1	5	7	11	12
E7 (T-55)	R2	5	7	12	12
E7 (T-55)	R3	7	7	13	13
E7 (T-55)	R4	5	8	13	14
E8 (La playa)	R1	11	15	18	21
E8 (La playa)	R2	10	14	21	24
E8 (La playa)	R3	11	15	21	26
E8 (La playa)	R4	9	16	19	24
E9 (T-61)	R1	18	20	21	27
E9 (T-61)	R2	16	21	22	25
E9 (T-61)	R3	14	22	21	24
E9 (T-61)	R4	17	20	23	23
E10 (Austro)	R1	28	46	50	54
E10 (Austro)	R2	32	46	47	58
E10 (Austro)	R3	32	44	49	54
E10 (Austro)	R4	30	44	47	55

Fuente. Información primaria.



Anexo 3: Porcentajes de germinación de polen *in vitro* de chirimoyo en estado fenológico macho, evaluado en cuatro tiempos.

Porcentaje de germinación estado fenológico hembra					
Tratamientos	Repeticiones	Tiempo			
		2h	4h	8h	24h
E1 (Fabulosa)	1	29	30	31	53
E1 (Fabulosa)	2	26	29	33	50
E1 (Fabulosa)	3	26	27	30	52
E1 (Fabulosa)	4	29	27	32	49
E2 (O27)	1	0	0	1	3
E2 (O27)	2	0	0	1	4
E2 (O27)	3	0	0	2	4
E2 (O27)	4	0	0	2	4
E3 (Guille)	1	13	15	16	20
E3 (Guille)	2	15	15	17	22
E3 (Guille)	3	16	16	17	20
E3 (Guille)	4	16	16	18	22
E4 (Abue)	1	9	20	37	35
E4 (Abue)	2	9	22	37	32
E4 (Abue)	3	7	22	36	30
E4 (Abue)	4	7	20	43	34
E5 (Fino de jete)	1	23	36	47	50
E5 (Fino de jete)	2	25	21	43	52
E5 (Fino de jete)	3	22	39	40	50
E5 (Fino de jete)	4	22	36	45	52
E6 (La loma)	1	3	5	10	15
E6 (La loma)	2	3	6	9	16
E6 (La loma)	3	3	5	10	15
E6 (La loma)	4	3	6	9	14
E7 (T-55)	1	8	26	33	42
E7 (T-55)	2	9	26	31	43
E7 (T-55)	3	7	28	31	45
E7 (T-55)	4	7	26	33	44
E8 (La playa)	1	3	10	14	16
E8 (La playa)	2	3	10	15	15
E8 (La playa)	3	4	10	12	15
E8 (La playa)	4	4	9	12	15
E9 (T-61)	1	5	17	18	18
E9 (T-61)	2	6	16	16	20
E9 (T-61)	3	6	17	17	19
E9 (T-61)	4	5	15	17	19
E10 (Austro)	1	10	18	17	17
E10 (Austro)	2	10	17	19	20
E10 (Austro)	3	11	16	16	16
E10 (Austro)	4	10	18	20	20

Fuente. Información primaria

Elaborado por. Minchala N, 2018.



**Anexo 4. Crecimiento del tubo polínico (micras) de diez ecotipos de chirimoyo
Polen recolectado en estado fenológico pre-hembra.**

Longitud del tubo polínico estado fenológico pre-hembra					
Tratamientos	Repeticiones	Tiempo			
		2h	4h	8h	24h
E1 (Fabulosa)	R1	0	471	543	1008
E1 (Fabulosa)	R2	0	421	574	1642
E1 (Fabulosa)	R3	0	523	512	1355
E1 (Fabulosa)	R4	0	471	544	937
E2 (O27)	R1	0	0	0	992
E2 (O27)	R2	0	0	0	1017
E2 (O27)	R3	0	0	0	966
E2 (O27)	R4	0	0	0	991
E3 (Guille)	R1	0	245	707	1563
E3 (Guille)	R2	0	283	761	1106
E3 (Guille)	R3	0	344	761	1140
E3 (Guille)	R4	0	293	694	1498
E4 (Abue)	R1	0	240	1208	1103
E4 (Abue)	R2	0	192	1138	1162
E4 (Abue)	R3	0	253	986	1032
E4 (Abue)	R4	0	275	1227	1109
E5 (Fino de jete)	R1	0	0	1054	1357
E5 (Fino de jete)	R2	0	0	965	1142
E5 (Fino de jete)	R3	0	0	1015	1242
E5 (Fino de jete)	R4	0	0	1139	1451
E6 (La loma)	R1	0	0	0	1387
E6 (La loma)	R2	0	0	0	1124
E6 (La loma)	R3	0	0	0	1530
E6 (La loma)	R4	0	0	0	1507
E7 (T-55)	R1	534	591	1047	1068
E7 (T-55)	R2	550	512	1021	1024
E7 (T-55)	R3	542	477	1018	1963
E7 (T-55)	R4	541	574	1005	2183
E8 (La playa)	R1	0	0	0	0
E8 (La playa)	R2	0	0	0	0
E8 (La playa)	R3	0	0	0	0
E8 (La playa)	R4	0	0	0	0
E9 (T-61)	R1	0	0	0	0
E9 (T-61)	R2	0	0	0	0
E9 (T-61)	R3	0	0	0	0
E9 (T-61)	R4	0	0	0	0
E10 (Austro)	R1	551	880	1667	1640
E10 (Austro)	R2	463	799	1460	1766
E10 (Austro)	R3	599	853	1657	1566
E10 (Austro)	R4	486	872	1560	1720

Fuente. Información primaria
Elaborado por. Minchala N, 2018.



Anexo 5. Crecimiento del tubo polínico (micras) de diez ecotipos de chirimoyo
Polen recolectado en estado fenológico hembra.

Crecimiento del tubo polínico estado fenológico hembra					
Tratamientos	Repeticiones	Tiempo			
		2h	4h	8h	24h
E1 (Fabulosa)	R1	155.69	495.31	1840.59	1991.53
E1 (Fabulosa)	R2	206.08	440.83	1710.84	1979.10
E1 (Fabulosa)	R3	164.43	529.07	1673.46	2088.74
E1 (Fabulosa)	R4	187.46	491.34	2052.29	2143.85
E2 (O27)	R1	0.00	0.00	142.64	1518.11
E2 (O27)	R2	0.00	0.00	163.00	1457.45
E2 (O27)	R3	0.00	0.00	162.91	1581.87
E2 (O27)	R4	0.00	0.00	152.00	1692.72
E3 (Guille)	R1	221.83	445.25	456.48	1571.04
E3 (Guille)	R2	180.79	582.78	547.83	1433.75
E3 (Guille)	R3	245.29	644.12	698.20	1594.12
E3 (Guille)	R4	154.93	592.87	579.07	1550.63
E4 (Abue)	R1	358.06	578.00	716.46	1527.86
E4 (Abue)	R2	462.64	610.88	813.03	1660.88
E4 (Abue)	R3	362.66	490.03	804.95	1343.50
E4 (Abue)	R4	471.54	495.37	799.11	1524.07
E5 (Fino de jete)	R1	366.55	470.50	1596.24	2208
E5 (Fino de jete)	R2	434.24	581.62	896.24	1808.41
E5 (Fino de jete)	R3	367.46	540.17	948.62	1904.28
E5 (Fino de jete)	R4	399.84	435.27	1021.21	1957.57
E6 (La loma)	R1	404.36	439.66	913.78	1825.41
E6 (La loma)	R2	479.66	388.63	752.46	1696.45
E6 (La loma)	R3	442.50	363.32	936.36	1581.60
E6 (La loma)	R4	441.00	397.20	876.30	1654.31
E7 (T-55)	R1	581.02	730.88	1089.62	1999.39
E7 (T-55)	R2	567.90	829.39	1138.91	1804.18
E7 (T-55)	R3	551.71	724.21	1148.87	1721.89
E7 (T-55)	R4	626.70	780.47	1152.81	1925.45
E8 (La playa)	R1	344.02	402.57	438.96	1501.49
E8 (La playa)	R2	281.23	394.05	514.30	1386.77
E8 (La playa)	R3	289.99	291.99	639.47	1511.81
E8 (La playa)	R4	296.19	388.57	505.76	1357.97
E9 (T-61)	R1	477.28	755.40	739.66	1645.64
E9 (T-61)	R2	583.86	632.19	746.07	1673.72
E9 (T-61)	R3	545.56	702.83	810.74	1722.18
E9 (T-61)	R4	416.42	590.40	839.22	1540.45
E10 (Austro)	R1	521.26	938.42	1947.77	2434.73
E10 (Austro)	R2	606.53	861.63	1864.04	2326.44
E10 (Austro)	R3	683.86	950.38	1683.88	2403.83
E10 (Austro)	R4	592.02	835.51	1706.22	2296.22

Fuente. Información primaria
Elaborado por. Minchala N, 2018.



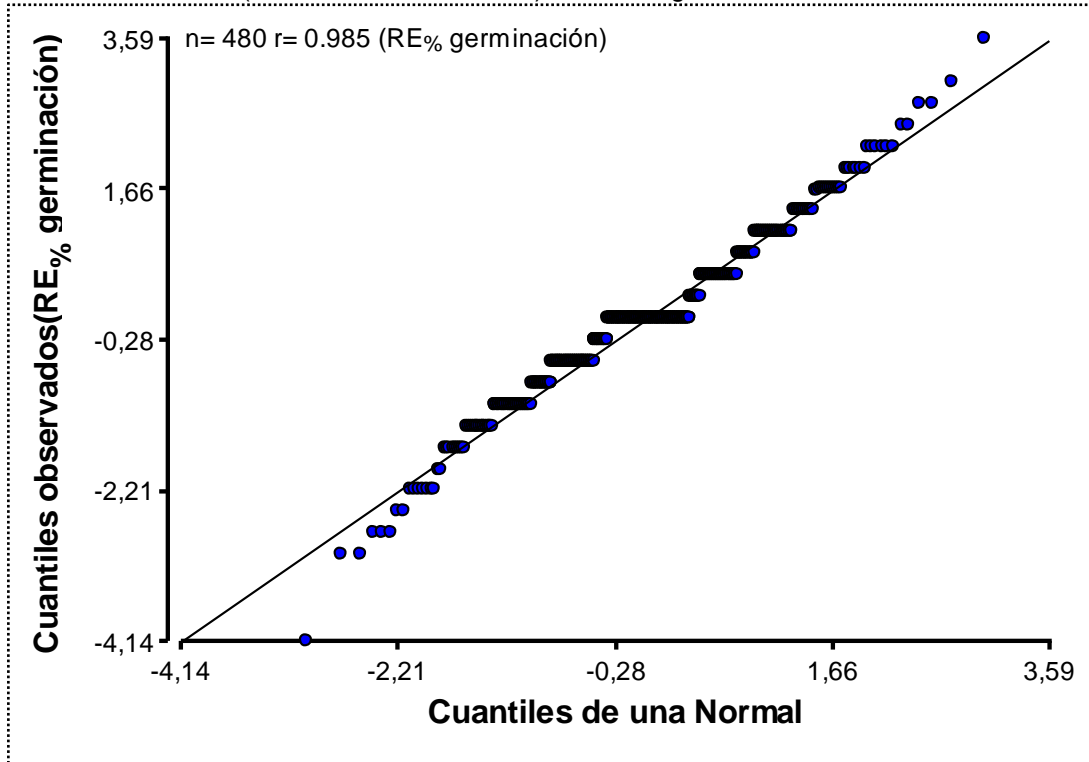
Anexo 6: Crecimiento del tubo polínico (micras) de diez ecotipos de chirimoyo
Polen recolectado en estado fenológico macho.

Longitud del tubo polínico estado fenológico macho					
Tratamientos	Repeticiones.	Tiempo			
		2h	4h	8h	24h
E1 (Fabulosa)	R1	361.58	438.23	1523.00	2019.96
E1 (Fabulosa)	R2	402.38	542.29	1603.00	2285.82
E1 (Fabulosa)	R3	329.47	542.13	1597.48	2116.00
E1 (Fabulosa)	R4	385.60	411.48	1553.26	2228.00
E2 (O27)	R1	150.20	284.65	666.39	1901.00
E2 (O27)	R2	253.17	327.03	739.23	1999.90
E2 (O27)	R3	250.53	245.64	562.99	2000.65
E2 (O27)	R4	173.17	203.00	460.88	2126.00
E3 (Guille)	R1	212.33	515.02	656.31	1834.65
E3 (Guille)	R2	286.64	583.00	738.26	1872.75
E3 (Guille)	R3	315.85	587.00	810.02	1996.33
E3 (Guille)	R4	256.99	606.00	681.70	1879.95
E4 (Abue)	R1	699.61	850.00	961.13	1929.30
E4 (Abue)	R2	645.40	754.61	913.22	1959.64
E4 (Abue)	R3	704.92	791.16	883.40	1874.69
E4 (Abue)	R4	745.57	820.66	894.03	1825.64
E5 (Fino de jete)	R1	465.63	634.50	1041.80	1970.08
E5 (Fino de jete)	R2	407.41	537.74	1081.20	1987.47
E5 (Fino de jete)	R3	532.57	576.81	1118.70	2092.12
E5 (Fino de jete)	R4	438.64	600.25	1092.38	2019.00
E6 (La loma)	R1	605.28	795.69	1004.19	1919.17
E6 (La loma)	R2	558.59	824.11	1056.70	1986.66
E6 (La loma)	R3	649.80	787.85	902.35	1935.79
E6 (La loma)	R4	571.66	694.16	827.04	1960.20
E7 (T-55)	R1	602.52	797.25	1413.90	2096.15
E7 (T-55)	R2	571.76	809.08	1337.03	2175.94
E7 (T-55)	R3	594.31	835.65	1414.10	2119.02
E7 (T-55)	R4	643.96	868.85	1266.25	2056.23
E8 (La playa)	R1	694.48	861.19	1137.94	1601.89
E8 (La playa)	R2	606.55	901.64	997.63	1475.63
E8 (La playa)	R3	889.74	910.80	1083.09	1500.40
E8 (La playa)	R4	882.08	839.51	1099.90	1445.58
E9 (T-61)	R1	605.04	779.87	1056.79	1896.82
E9 (T-61)	R2	619.85	796.89	995.22	1768.86
E9 (T-61)	R3	666.12	810.84	1083.94	1879.70
E9 (T-61)	R4	599.63	837.37	992.43	1837.23
E10 (Austro)	R1	695.78	868.15	2175.13	2562.08
E10 (Austro)	R2	653.42	955.99	2198.56	2376.28
E10 (Austro)	R3	708.22	992.67	2252.19	2426.32
E10 (Austro)	R4	737.59	868.66	2176.31	2293.99

Fuente. Información primaria
Elaborado por. Minchala N, 2018.

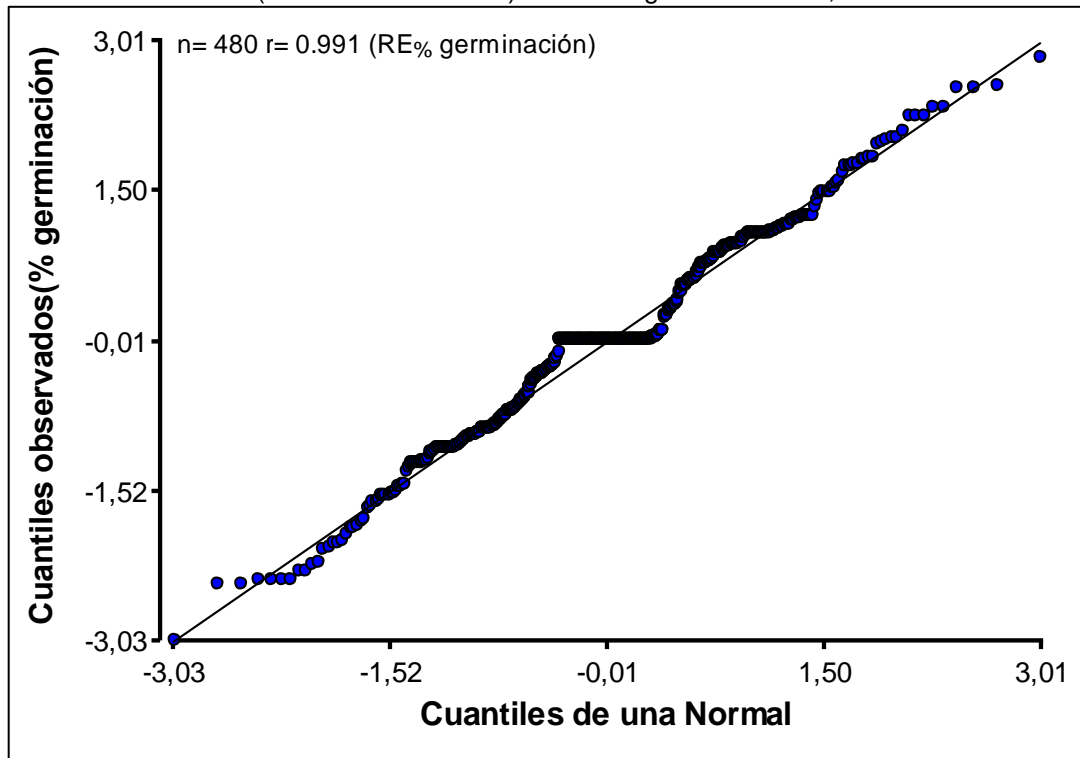


Anexo 7. Prueba de normalidad para porcentaje de germinación (datos sin transformados) utilizando gráfico QQ-Plot,



Elaborado por. Minchala N, 2018.

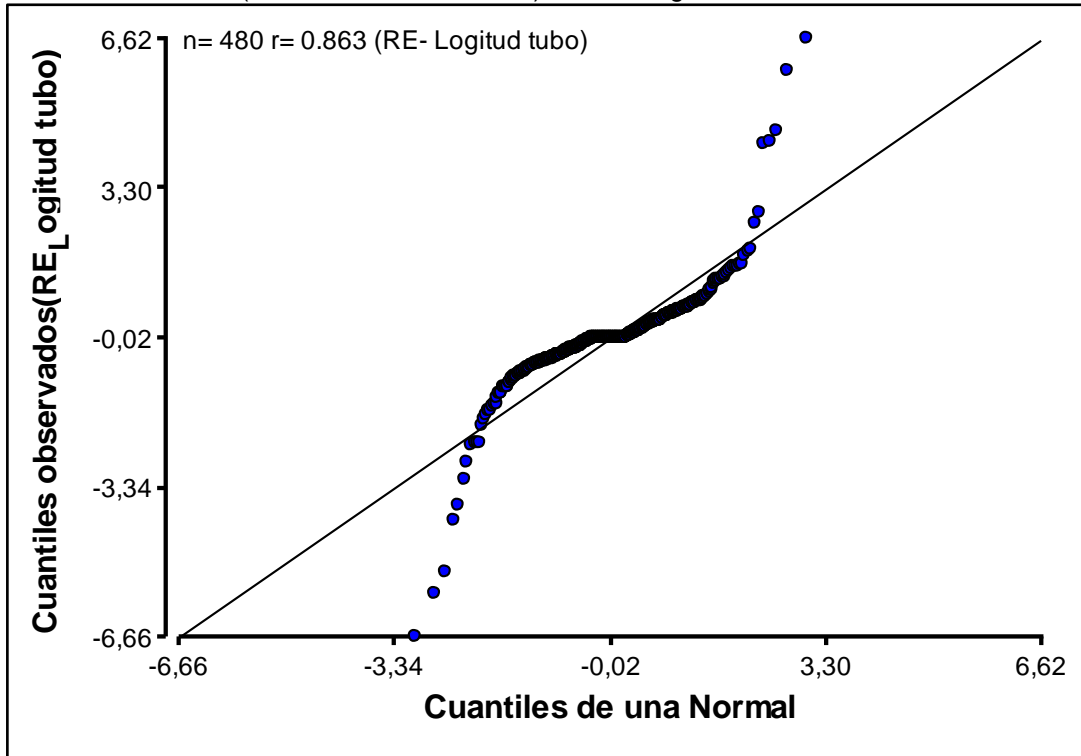
Anexo 8. Prueba de normalidad para porcentaje de germinación (datos transformados) utilizando gráfico QQ-Plot,



Elaborado por. Minchala N, 2018.

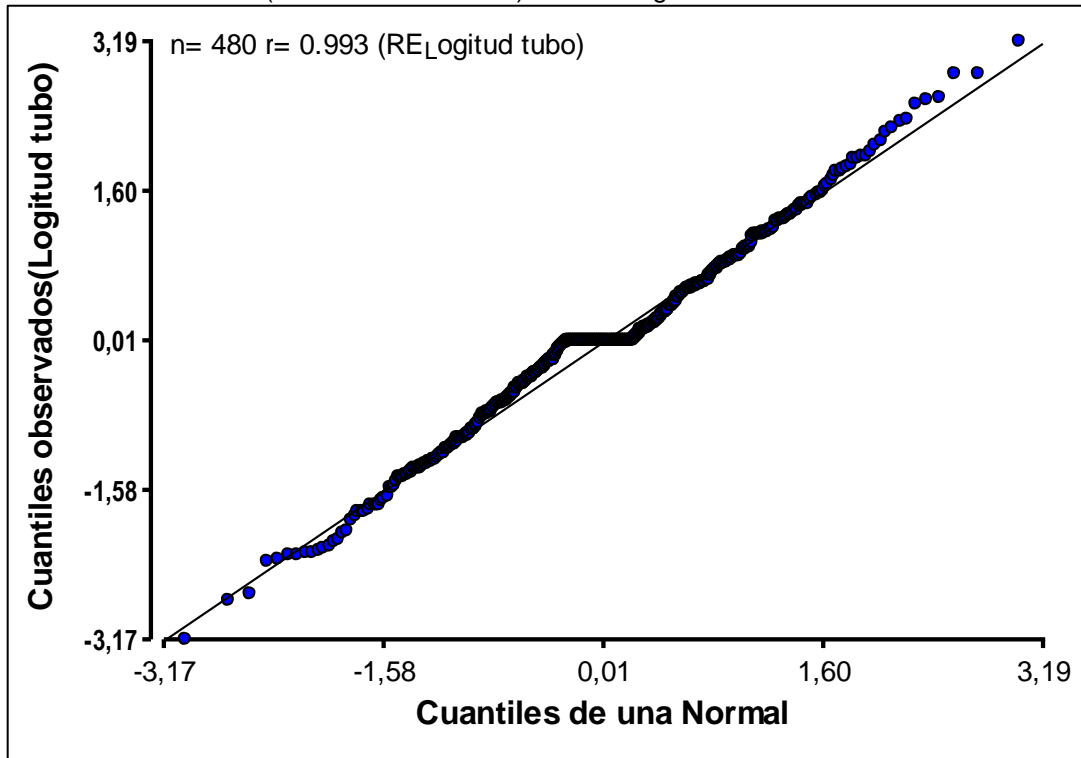


Anexo 9. Prueba de normalidad para longitud del tubo polínico (datos sin transformados) utilizando gráfico QQ-Plot



Elaborado por. Minchala N, 2018.

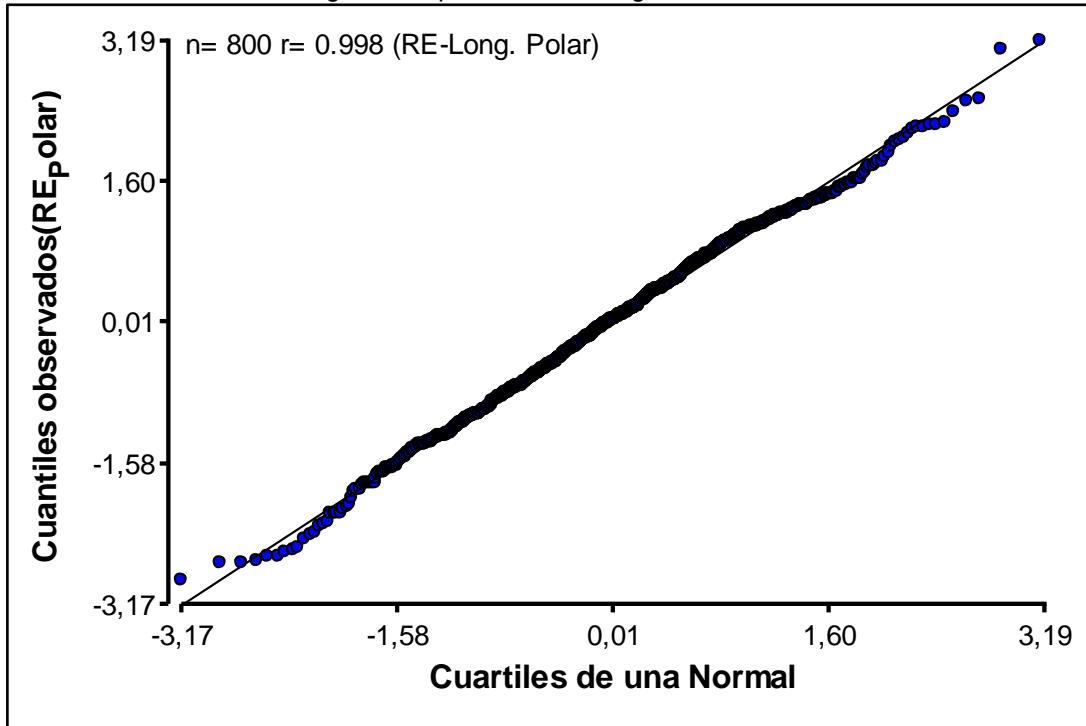
Anexo 10. Prueba de normalidad para longitud del tubo polínico (datos transformados) utilizando gráfico QQ-Plot



Elaborado por. Minchala N, 2018.

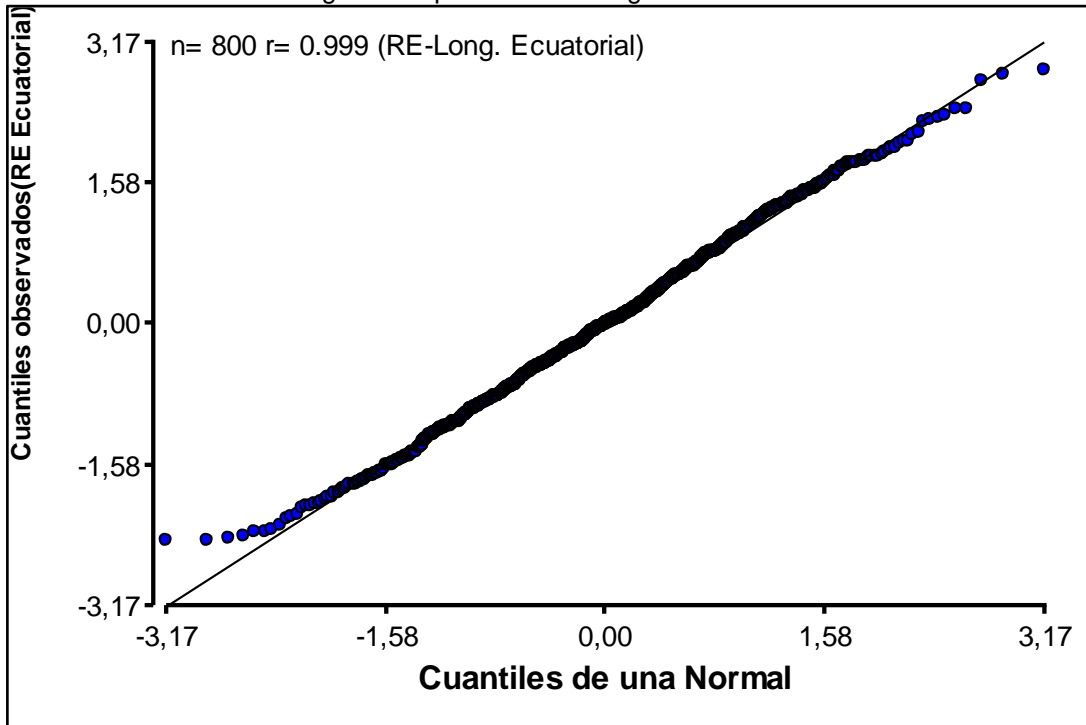


Anexo 11. Prueba de normalidad para medición de la longitud polar del grano de polen utilizando gráfico QQ-Plot



Elaborado por. Minchala N, 2018.

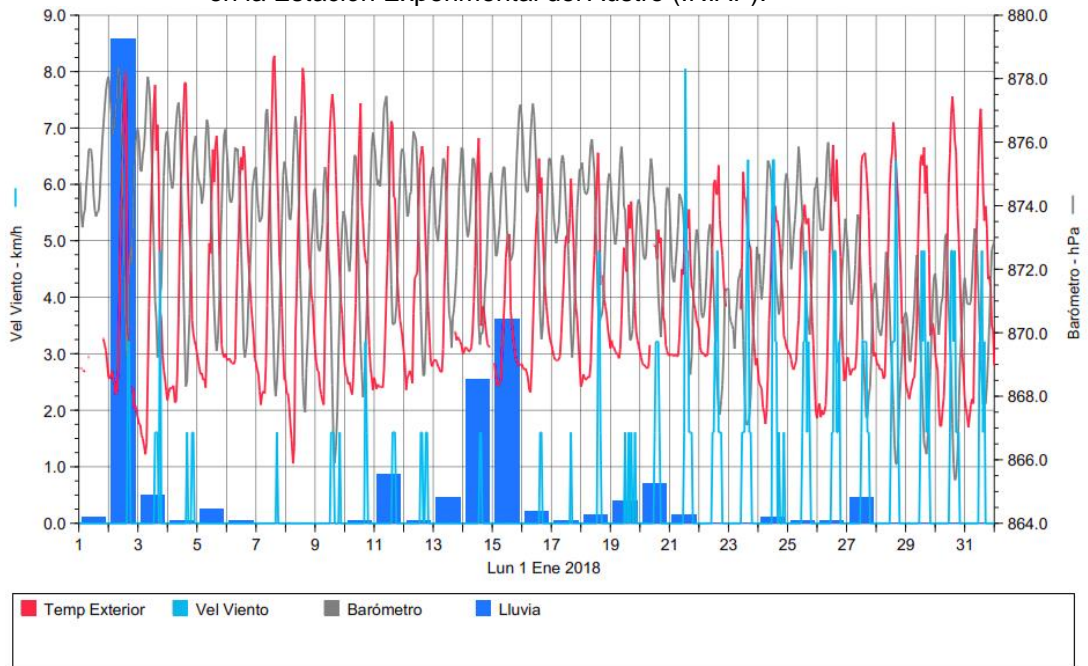
Anexo 12. Prueba de normalidad para medición de la longitud polar del grano de polen utilizando gráfico QQ-Plot.



Elaborado por. Minchala N, 2018.



Anexo 13. Reporte de lluvia, viento y temperatura para el mes de enero de 2018 en la Estación Experimental del Austro (INIAP).



Elaborado por. Minchala N, 2018.

Anexo 14. Materiales utilizados



Imagen 1. Reactivos utilizados para la preparación de medio de cultivo