



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Facultad de Ciencias Agrarias

Escuela de Agronomía

Determinación de la viabilidad en la carga polínica de insectos, que visitan flores de avellano chileno (*Gevuina avellana* Mol.)

Tesis presentada como parte de los
requisitos para optar al grado de
Licenciado en Agronomía.

Juan Marcelo Miranda Villalón

Valdivia Chile 2002

PROFESOR PATROCINANTE

Magaly Rivero G.
Prof. Biol. y Quím., Dr. Cs.

PROFESORES INFORMANTES

Roberto Carrillo Ll.
Ing. Agr., M. Sc., Ph. D.

Miguel Neira C.
Ing. Agr.

...Gracias a Dios, por el fantástico viaje recorrido, a mis padres Juan y María Angélica, por todo el amor recibido, a mi hermana María Fernanda por su cariño y comprensión.....

.....A mi Pamela por su gran corazón, incondicional apoyo y todo su amor.....

.....A mi tía Gladys, por el amor brindado de toda una vida.....

.....A los mosqueteros: Claudio (FT) y Victor Hugo (CHE GORDO), por toda su amistad.....

.....A mis amigos Fabián y Lorena por todo su apoyo.....

.....A mis profesores Sra. Magali Riveros, Sr. Miguel Neira, Sr. Roberto Carrillo, gracias por toda la ayuda, consejos y compromiso recibido.

..... gracias a todas las personas que me ayudaron en el instituto de Botánica como de Producción y Sanidad Vegetal.

.....y a todos los amigos de aquí y del mundo entero: Eduardo, Roberto, Osvaldo, Italo, Esteban, Alexis, Juan Miguel, Jorge, Edgard, Rafael, Gabriel, Marcelo, Alejandro, Carlos, Mayo, José Miguel, Viviana, Salvador, Tote, Joaquín, Christian, Pedro, Pez, Colombiano, Nano, Omar, Mario, Fabián C., Ricardo.....

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISION BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Antecedentes generales sobre la especie	3
2.1.1	Ubicación taxonómica	3
2.2	Las proteáceas en Chile	4
2.3	El avellano chileno	5
2.3.1	Utilización de la avellana	8
2.3.2	Requerimientos climáticos	9
2.4	Agentes polinizantes	9
2.4.1	Vectores abióticos	10
2.4.2	Vectores bióticos	10
2.4.2.1	Polinización entomófila	11
2.4.2.1.1	Constancia floral	13
2.4.2.1.2	Frecuencia de visitas	14
2.4.2.1.3	Tiempo de visitas	15
2.4.2.1.4	Período de floración	15
2.4.2.1.5	Características de la flor	16
2.4.2.1.6	Clasificación de los insectos polinizantes	16
2.5	Factores ambientales que condicionan el comportamiento de los insectos	19
2.5.1	Temperatura	19
2.5.2	Viento	20
2.5.3	Luminosidad	21
2.5.4	Humedad	21
2.6	Mecanismos de atracción floral	21
2.6.1	Producción de néctar	23
2.6.2	Producción de polen	24
2.6.3	Aroma floral	25

Capítulo		Página
2.6.4	Color de las flores	26
2.6.5	Otros atractivos	26
2.7	Viabilidad polínica	27
2.7.1	Métodos directos e indirectos de viabilidad polínica	27
2.8	Germinación polínica	28
2.8.1	Medios de germinación	28
2.8.2	Efecto de los azúcares	29
2.8.3	Efecto del boro	30
2.8.4	Calcio y otros iones	31
2.8.5	Agar	32
3	MATERIAL Y METODO	33
3.1	Material	33
3.1.1	Ubicación del ensayo	33
3.1.2	Características del suelo	33
3.1.3	Características climáticas de la localidad	33
3.1.4	Características de la plantación	34
3.1.5	Materiales e instrumentos	34
3.2	Método	34
3.2.1	Período de experimentación	35
3.2.2	Colecta de los insectos	35
3.2.3	Determinación del polen de avellano y de otras especies sobre el cuerpo de los insectos analizados	36
3.2.4	Determinación de la viabilidad polínica	37
3.2.5	Preparación de medios de cultivo <i>in vitro</i>	39
3.2.5.1	Extracción de polen de la superficie del cuerpo del insecto	39
3.2.5.2	Siembra de polen en un medio nutritivo	40
3.2.5.3	Determinación del porcentaje de germinación	40

Capítulo		Página
3.2.6	Análisis estadístico	40
4	PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	42
4.1	Determinación del porcentaje de polen de avellano chileno (<i>Gevuina avellana</i> Mol.) y de otras especies presente sobre el cuerpo de los insectos analizados	42
4.2	Viabilidad de los granos de polen de avellano (<i>Gevuina avellana</i> Mol.)	44
4.2.1	Determinación de la viabilidad del polen de avellano chileno	44
4.2.2	Análisis de los métodos de tinción ocupados para determinar el porcentaje de viabilidad de los granos de polen	45
4.2.3	Determinación del porcentaje de viabilidad de los granos de polen de avellano presente en el cuerpo de cada insecto	47
4.3	Germinación del polen de avellano chileno, en porcentaje	51
4.3.1	Germinación total de los granos de polen de avellano, presente en el cuerpo de los insectos analizados, en porcentaje	51
4.3.2	Germinación total de los granos de polen de avellano presente en el cuerpo de cada uno de los insectos analizados	54
5	CONCLUSIONES	58
6	RESUMEN	59
	SUMMARY	60
7	BIBLIOGRAFÍA	61
8	ANEXOS	69

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición química de la avellana fresca (<i>Gevuina avellana</i> Mol.)	7
2	Importancia porcentual de insectos domesticados y silvestres como visitantes de las flores en los cultivos	17
3	Porcentaje de viabilidad del polen, según método utilizado	46

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Granos de polen de avellano y otras especies, presente sobre el cuerpo de los insectos analizados, en porcentaje	42
2	Viabilidad total de los granos de polen de avellano, presente en el cuerpo de los insectos analizados, en porcentaje	44
3	Granos de polen viables según el método de Alexander y el método de Pdfa (40 x)	45
4	Viabilidad de los granos de polen de avellano, presente en el cuerpo de cada especie de insecto, en porcentaje	47
5	Granos de polen de avellano, mostrando desarrollo de tubo polínico (40 x)	50
6	Germinación total de los granos de polen de avellano, presente en el cuerpo de los insectos analizados, en porcentaje	51
7	Germinación de los granos de polen de avellano, presente en los cuerpos de cada especie de insecto, en porcentaje	55
8	Comparación entre viabilidad y germinación de los granos de polen de avellano, presente en el cuerpo de cada especie de insecto	56

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Cantidad y porcentajes de polen de avellano chileno (<i>Gevuina avellana</i> Mol.), y otras especies colectadas sobre el cuerpo de los insectos analizados	70
2	Porcentaje de germinación de los granos de polen de avellano presente en el cuerpo de cada insecto	71
3	Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de los granos de polen de ave llano presente en el cuerpo de cada insecto	75
4	Prueba de Tukey para el porcentaje de germinación de los granos de polen de avellano presente en el cuerpo de cada insecto	75
5	Porcentaje de viabilidad de los granos de polen de avellano presente en el cuerpo de cada insecto	75
6	Análisis de varianza para el porcentaje de viabilidad de los granos de polen de avellano presente en el cuerpo de cada insecto	83
7	Prueba de Tukey para el porcentaje de viabilidad entre especies de insectos	84
8	Prueba de Tukey para el porcentaje de viabilidad entre productos aplicados	84
9	Insectos visitantes del avellano (<i>Gevuina avellana</i> Mol.)	85

1 INTRODUCCION

El avellano chileno (*Gevuina avellana* Mol.) es un árbol nativo de Chile, de amplia distribución. Esta especie es conocida por su madera, flores de valor melífero, valor ornamental y frutos comestibles.

En el mercado mundial ha crecido en forma importante la demanda por frutos de nuez, introduciéndose últimamente especies silvestres mejoradas con gran éxito. Por lo que es interesante estudiar las posibilidades de nuevos cultivos frutales, características principales de sus procesos biológicos, tecnológicos, y mercados de los mismos.

El avellano chileno es una especie nativa de los bosques chilenos, siendo mínima su producción a gran escala. Es por ello tal vez, que muy poco se ha estudiado acerca de sus técnicas de cultivo, ya que sólo en los últimos años ha despertado un interés económico a escala comercial. Para lograrlo se necesita precisar dichas técnicas, como también las áreas agroecológicas más adecuadas para un buen comportamiento productivo, en cada una de ellas.

Este estudio tiene como objetivo general determinar la viabilidad de la carga polínica, transportada sobre la superficie corporal de los insectos visitantes que se presentan con mayor frecuencia en las flores del avellano chileno (*Gevuina avellana* Mol.). Para lograr el objetivo mencionado se establecen los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el porcentaje de polen de avellano y de otras especies presente en las cargas polínicas de los insectos analizados.

- Determinar la viabilidad polínica de los granos de polen de avellano presentes en las cargas polínicas.

- Evaluar la capacidad germinativa de los granos de polen de avellano presentes en las cargas polínicas.

2 REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Antecedentes generales sobre la especie

El avellano chileno es una especie nativa de Chile, se destaca por su amplia distribución geográfica, se puede encontrar entre Colchagua y las Islas Guaitecas en una gran variedad de condiciones o hábitats, y en forma mayoritaria se encuentra en localidades precordilleranas a una altitud no superior a los 600 m.s.n.m.(DONOSO, 1978). Además, es una especie que en la actualidad tiene importancia económica, por su aspecto forestal, ornamental y especialmente por la calidad organoléptica y nutricional de su fruta (INSTITUTO TECNOLOGICO DE CHILE, INTEC. 1982).

2.1.1 Ubicación taxonómica. La ubicación taxonómica según STRASBURGER et al. (1994), es la siguiente:

Especie: *Gevuina avellana* Mol.

Familia: Proteaceae

Orden: Proteales

Subclase: Rosidae

Clase: Dicotyledoneae

Subdivisión: Angiosperma

Nombre vernacular: Avellano chileno, Guevín, Neufén

2.2 Las Proteáceas en Chile.

La familia botánica Proteaceae, especialmente importante en Australia y Africa del Sur, tiene en Chile seis representantes, distribuidos en cuatro géneros y diversas especies. Ellas son, *Gevuina avellana* Mol., *Embothrium coccineum* J.R. et G. Forster, *Lomatia hirsuta* (Lam.) Diels ex Macbr, *Lomatia dentata* (R. et P.) R. Br., *Lomatia ferruginea* (Cav.) R.Br., y *Orites myrtoidea* (P. et E.) B. et H. ex Sleumer. De ellas, las cinco primeras tienen características arbóreas y se desarrollan, dentro de un amplio rango de distribución en la Décima Región de Chile; la última *Orites myrtoidea* de carácter arbustivo, crece en los Andes de la Séptima a Octava Región, es decir, al sur de la región mediterránea de Chile (DONOSO y ESCOBAR 1986).

Una de las características de la familia Proteaceae es la presencia de raíces proteiformes, tipo anormal de ramificación que origina densos conglomerados de raicillas, con abundantes pelos radicales, dispuestos en torno a un eje. Esta característica da ventajas a las plantas que las poseen, al aumentar la superficie de absorción, permitiendo obtener desde el suelo mayor cantidad de agua y nutrientes, aumentando con ello la fotosíntesis y favoreciendo la producción de biomasa. Cada especie forma un tipo particular de raíces proteiformes cuya formación depende de múltiples factores de tipo genético, microbiológico y edáfico (GRINBERGS et al., 1986).

Entre las proteáceas chilenas se encuentra una gran variabilidad en sus raíces proteiformes, lo que estaría de acuerdo con la gran variedad de requerimientos ecológicos que ellas tienen, así cada representante de esta familia tiene características diferentes, dadas principalmente por el hábitat en que se desarrollan y las adaptaciones de la especie (RAMIREZ, 1988).

La familia Proteaceae en Chile no forma comunidades puras, sino que se presenta en bosques con otras especies, especialmente cuando estas son destruidas o en áreas marginales. Muchas de ellas colonizan suelos primitivos, arenosos, actuando como especie pionera, en lugares donde la insolación es muy grande y la humedad es escasa (RAMIREZ, 1988).

2.3 El avellano chileno.

Se encuentra en variadas condiciones de suelo, grado de humedad y luz. No forma habitualmente bosques puros; se desarrolla de manera aislada o mezclada con las demás especies típicas del bosque húmedo, por lo general cerca de las quebradas (HOFFMANN, 1982).

Las especies con las que normalmente se encuentra asociado en su área de distribución son fagáceas, particularmente roble (*Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst.) y raulí (*Nothofagus alpina* (P. et E.) Oerst.) (DONOSO y ESCOBAR, 1986).

El avellano crece como árbol en forma erecta, cuando está asociado, o en forma globosa, cuando se encuentra aislado; alcanza alturas de hasta 20 m. También se presenta corrientemente en forma de arbusto. Su corteza es gris cenicienta, con manchas oscuras. Los brotes nuevos están cubiertos por pelillos densos de color rojizo. Posee hojas siempreverdes, brillantes, compuestas, imparipinadas, con borde aserrado, coriáceas, y de nervadura reticulada. Sus folíolos son de tamaño y forma variables, con pecíolos pubescentes (HOFFMANN, 1982).

Se caracteriza por presentar flores pequeñas y dispuestas en largos racimos axilares de color blanco o rosado, reunidas en parejas; los pedúnculos se encuentran cubiertos de pelillos rojizos. Son hermafroditas, y están compuestas por un tubo floral encorvado, cuatro estambres casi sésiles y un ovario que contiene dos óvulos con el estilo largo. Su floración ocurre durante los meses de enero a marzo, incluso a veces llega al mes de abril (HOFFMANN, 1982).

Su fruto, una nuez drupácea, globosa, de 1.5 a 2 cm de diámetro. La cáscara es leñosa, y su color varía de verde a negro, pasando por los tonos rojo, marrón y violeta. Durante su desarrollo el fruto adquiere diferentes colores, todos se inician con un color verde, posteriormente se tornan de un rojo intenso y terminan violáceos (HOFFMANN, 1982).

LOBOS (1987), señala que el fruto alcanza un peso promedio de 2.0 g de los cuales el 59.8% corresponde a la cáscara, 34.7% a la semilla y que un 5.6% corresponde a los tegumentos seminales. Los frutos al madurar caen al suelo, de donde son recolectados para su consumo, tienen una cáscara leñosa y la parte comestible es la semilla que se separa en dos cotiledones, de color blanquecino y están cubiertos por una cutícula de color violáceo oscuro (INTEC-CHILE, 1982).

Los frutos son ostensiblemente más grandes en el norte, disminuyendo de tamaño en forma más o menos gradual hacia el sur, por lo cual el número de semillas por kilo varía con la latitud (DONOSO y ESCOBAR, 1986).

Las semillas del avellano que son la parte comestible del fruto, junto con presentar un sabor agradable, poseen un gran valor alimenticio y calórico, especialmente por sus contenidos en proteínas y lípidos (INTEC-CHILE, 1982).

La nuez del avellano posee un sabor y aspecto similar a la nuez de macadamia (*Macadamia integrifolia* y *M. tetraphylla*), que pertenece también a la familia Proteaceae pero de clima subtropical; la cual se ha incorporado con éxito al mercado mundial de nueces finas (HALLOY, 1993).

MEDEL (1987); HALLOY et al. (1996) y DONOSO (1997), señalan que una de las características más relevantes de la avellana es su aceite, cuyo contenido es de 49.3 g por 100 g de frutos. Especialmente valioso para fines cosmetológicos debido a que contiene un 27.6% de ácido graso palmitoléico, el cual penetra muy bien en la piel y presenta una fuerte absorción de la luz ultravioleta.

La calidad del aceite para consumo alimenticio es comparable al aceite de oliva, y además esta semilla posee un alto contenido proteico el cual aumenta a un 16% luego de extraer el aceite, superior al que presentan nueces y castañas, siendo una atractiva opción para alimentación de animales (NUESTRA TIERRA, 1993 y DONOSO, 1997).

CUADRO 1. Composición química de la avellana fresca (*Gevuina avellana* Mol.).

Componentes	%
Humedad	7,07
Extracto etéreo	47,69
Glúcidos totales	20,44
Fibra cruda	4,90
Cenizas	4,12
Proteínas	12,66
Calorías	680 cal/g

FUENTE: INTEC-CHILE (1982).

En cuanto a la densidad de plantación, DONOSO et al. (1992), sugiere para la producción de frutos de 625 plantas por hectárea, esto corresponde a un marco de plantación de 4 x 4 m.

2.3.1 Utilización de la avellana. Los múltiples usos de esta especie son aprovechables en sus distintas etapas de crecimiento, tardando entre tres y siete años la primera producción de frutos (HALLOY et al., 1996 y DONOSO, 1997).

Esta especie tiene importancia por sus flores melíferas, su uso ornamental, su aspecto forestal, y en especial por la calidad organoléptica y nutricional de su fruto (DONOSO, 1997).

Las principales alternativas de industrialización de la avellana corresponden a la avellana tostada para uso directo o en confitería y salado como "snack", el aceite comestible o para uso cosmético y la harina de avellana entera o desgrasada utilizada en confitería, pastelería, alimentos infantiles y del ganado (INTEC-CHILE, 1982).

La madera del avellano es de hermosa veta, firme, liviana y elástica. Se emplea en carpintería y ebanistería, y también para construir embarcaciones y fabricar remos, instrumentos musicales y chapas. La corteza del fruto contiene taninos en abundancia, que se destinan a curtiduría. Dada su hermosura y gran durabilidad, las ramas son muy apreciadas para arreglos florales. Por su rápido crecimiento y aspecto, este árbol se presta mucho como elemento ornamental en paisajismo y jardinería (HOFFMANN, 1982).

2.3.2 Requerimientos climáticos. Clima. DONOSO et al. (1992), establece para esta especie un clima templado húmedo mediterráneo en su distribución septentrional y templado húmedo lluvioso en su área austral. Crece bajo un régimen de temperaturas cálidas a muy bajas. Al respecto HALLOY (1993), destaca la buena tolerancia al frío de esta especie (incluso -8° C).

Suelo. Debido a la plasticidad ecológica de este especie, es capaz de crecer en suelos profundos, con densidades bajas, buena porosidad y buen nivel de nutrientes y también sobre sustratos volcánicos (lavas y escorias) y en suelos ñadis (DONOSO et al., 1992).

Luminosidad. Una de las características de esta especie es su adaptabilidad a diferentes condiciones de luminosidad (DONOSO et al., 1992). Su hábito colonizador le permite tolerar situaciones expuestas al sol, viento y heladas (HALLOY et al., 1996).

2.4 Agentes polinizantes.

Los agentes dispersores de polen pueden ser bióticos o abióticos, de acuerdo a esto, las estructuras florales han evolucionado y han llegado a ser específicas para el agente dispersor más eficiente presente en la región en que la planta ha experimentado su proceso evolutivo (FRANKEL y GALUN, 1977).

Normalmente alguno de los vectores predomina, es así como las gimnospermas son principalmente polinizadas por vectores abióticos y las angiospermas por vectores bióticos (FRANKEL y GALUN, 1977).

2.4.1 Vectores abióticos. Aquí se distinguen la anemofilia y la hidrofilia (FRANKEL y GALUN, 1977).

La anemofilia requiere que se produzcan y se dispersen grandes cantidades de polen muy pequeño y ligero (20-40 nm), además, los estigmas deben ser libres y grandes, de modo que sea mayor la posibilidad que los granos de polen los alcancen (FRANKEL y GALUN, 1977; WESTWOOD, 1982; y STRASBURGER et al., 1986). En Chile, existen especies nativas que emplean la anemofilia como mecanismo dispersor de polen, especialmente especies del género *Nothofagus*, tales como *N. obliqua* Mirb. y *N. dombeyi* Mirb. (BAEZ, 1998).

La hidrofilia se presenta sólo en pocas angiospermas, donde el polen es liberado al medio acuático, el cual se encarga de dispersarlo (por flotación), también el agua de lluvia puede provocar la autopolinización y rara vez la polinización cruzada (por salpicadura) (Mc GREGOR, 1976; FRANKEL y GALUN, 1977; STRASBURGER et al., 1986).

2.4.2 Vectores bióticos. Aquí se encuentra un gran número de insectos y algunos pequeños vertebrados (FRANKEL y GALUN, 1977).

Las flores zoofilas deben poseer productos atractivos (polen, néctar, etc.), además de polen viscoso, de este modo se asegura que los animales polinizantes visiten las flores regularmente y se detengan el tiempo suficiente como para que se adhiera el polen al visitante y así pueda llegar al estigma de otras flores (Mc GREGOR, 1976).

Dentro de la zoofilia se distinguen flores ornitófilas (polinizadas por aves), flores quiropterófilas (polinizadas por murciélagos) y flores entomófilas (polinizadas por insectos)(STRASBURGER et al., 1986).

2.4.2.1 Polinización entomófila. Los insectos reciben gran importancia como agentes polinizadores, ellos visitan las flores de distintas plantas para extraer néctar y polen, los que constituyen una fuente nutricional. Como consecuencia secundaria a esta actividad, contribuyen a la transferencia del polen desde las anteras hasta el estigma de la misma flor o de otras flores (FREE, 1993).

La efectividad de la polinización está determinada por la estructura floral, el volumen de néctar, su concentración y constituyentes, así como la distribución de néctar entre las flores, distribución entre los visitantes y competencia intraespecífica. Los polinizadores se benefician de la interacción del mismo fenómeno coadaptativo, además, del uso óptimo del tiempo y energía que emplean en sus visitas (KEVAN y BAKER, 1983).

La adherencia del grano de polen al cuerpo del insecto no es sólo función de las características del grano de polen, sino también de las características del insecto como cantidad, largo, densidad y complejidad del pelo corporal de éste (Pellmyr y Thompson, 1996; citados por DAVIS, 1997).

ROOT (1976), sostiene que en un huerto frutal de cultivares autoestériles es necesaria la presencia de poblaciones de insectos adecuados para asegurar una efectiva polinización cruzada. Además tratándose de plantas autofecundadas, si bien se necesita menos actividad, puesto que prácticamente todas las flores visitadas son autopolinizadas, es importante la intervención de insectos polinizadores si se quiere obtener una cosecha abundante de estas variedades y

que a su vez la población de insectos esté distribuida uniformemente en todo el huerto, para aprovechar mejor la posibilidad de polinización y fecundación en el mayor número de flores.

Los insectos polinizadores deben visitar las flores de manera regular y se deben detener en ellas el tiempo suficiente, para esto las flores deben estar a la altura de las exigencias mecánicas requeridas, el polen y el estigma deben ser rozados con cierta normalidad, y que el primero quede adherido a los estigmas de otras flores. El resultado de la polinización por insectos depende de que éstos puedan reconocer las flores desde una cierta distancia y que se vean compelidos a visitar durante un cierto tiempo flores de la misma especie (EHRENDORFER, 1986).

La forma de pecorear de los insectos es una característica importante, ya que el valor de los insectos como agentes polinizadores se debe primariamente tanto a su constancia a las especies florales, como también, a su forma de pecorear, en relación a las estructuras florales. Para que la polinización sea efectiva el cuerpo del insecto debe estar en contacto con las anteras y estigmas (FREE, 1993)

Los insectos polinizadores definen su conducta de acuerdo a la estructura de la población y a factores que son: morfología floral, arquitectura de la planta, modelo fenológico de floración y diversidad de sistemas sexuales. Antes de ser escogida un área para repetir las visitas es muy probable que muchas otras flores de varios manchones sean probadas (Rathcke, 1983; citado por LOVERA, 1999).

Las flores recientemente polinizadas pueden sufrir cambios en su pigmentación, senescencia y abscisión de los órganos florales y crecimiento y

desarrollo del ovario. Los polinizadores reconocen los cambios de color y prefieren visitar flores no polinizadas previamente (O'NEILL, 1997).

Al parecer la más eficiente polinización entomófila es la melitófila, sin embargo, la diversidad de especies no sociales, abejas solitarias y otros también participan como vectores en la polinización cruzada y pueden llegar a ser importantes elementos adaptados a plantas cuyos períodos de floración ocurren en momentos en que por alguna razón no está disponible la abeja melífera o bien por factores limitantes de lluvia, temperatura baja u otros, no puede actuar como polinizador. Los mecanismos de polinización en las plantas se pueden separar diferenciando la visita del polinizador y la transferencia de polen impropio, siendo la interacción de estos dos aspectos determinantes en el éxito de la fertilización o fecundación. La transferencia de polen intraespecífico puede ocasionar disminución en la formación de semillas, al igual que si llegara polen intraespecífico pero genéticamente incompatible (RATHCKE, 1983).

2.4.2.1.1 Constancia floral. Cuando un polinizador restringe sus visitas a un determinado tipo de flor, incluso cuando existen otras recompensas disponibles, puede decirse que éste muestra constancia floral (O'NEILL, 1997).

Se ha enfatizado mucho que la polinización biótica es bidireccional, es decir, que tanto el agente polinizante, como el polinizador sean beneficiados.

Las plantas se benefician por la constancia de los polinizadores al limitar sus viajes a una sola especie vegetal en un determinado período, aumentando así enormemente la probabilidad que tiene el grano de polen de ser transferido al estigma de las flores de la misma especie y asegurar una polinización efectiva (SCHOONHOVEN *et al.*, 1998).

La estrategia de la constancia floral puede incrementar la eficacia del pecoreo debido a que los insectos conocen las características de la flor y saben donde están los nectarios de un determinado tipo de flor y por lo tanto, el insecto busca la manera de alcanzarlos con el menor esfuerzo posible, ahorrando tiempo y energía (SCHOONHOVEN *et al.*, 1998).

Las abejas retornan a sus colmenas con cargas polínicas completas, lo que significa que hacen numerosas visitas intraespecíficas para recolectar suficiente polen. Estas visitas intraespecíficas aseguran el transporte de polen de una flor a otra de la misma especie, produciendo así la polinización cruzada y beneficiando de ésta manera a plantas autoincompatibles. También, esta actividad intraespecífica favorece el proceso reproductivo de la planta ya que el transporte de polen compatible de una flor a otra fertiliza un mayor número de óvulos, aumentando por consiguiente el número de frutos y semillas (FREE, 1993).

Las abejas solitarias constantemente revisan flores de otras especies para estimar si estas especies poseen algún tipo de recompensa disponible y consecuentemente muestran un menor grado de constancia floral que la abeja melífera (SCHOONHOVEN *et al.*, 1998).

2.4.2.1.2 Frecuencia de visitas. Un buen polinizador debería moverse con frecuencia de una flor a otra en individuos de la misma especie. Existe una estrecha relación entre los granos de polen depositados en el estigma y la formación de semillas, por lo tanto debe existir un número mínimo de granos de polen necesarios para su formación (FREE y WILLIAMS, 1977).

Para que la polinización sea efectiva las plantas deben recibir la visita de numerosos insectos para una mayor transferencia de granos de polen al estigma,

es así como las flores han desarrollado diversos mecanismos para atraer un número mayor de agentes polinizantes, entre estos están las recompensas energéticas que ofrecen en forma de polen y néctar. La mejor forma para asegurar una polinización adecuada, es aquella que induce a altas tasas de visitas de insectos, ya que esto aumenta la probabilidad de fertilizar todos los óvulos fisiológicamente capaces de desarrollar semilla, produciéndose un incremento en el rendimiento del cultivo (Gary *et al.*, 1977; citado por VIZCARRA, 1999).

2.4.2.1.3 Tiempo de visitas. El tiempo empleado por las abejas en sus visitas a las flores depende de la cantidad de polen y néctar que se encuentre en ellas. La duración de las visitas varía con el tipo de flor, el estado fenológico, condiciones climáticas y el número de insectos competidores (FREE, 1993).

2.4.2.1.4 Período de floración. Según AUGSPURGER (1980), los polinizadores que visitan las especies que presentan floración masiva, generalmente efectúan un bajo movimiento de polen entre plantas. Los polinizadores que son atraídos por estas especies son muchos y se les clasifica como oportunistas.

Un alto porcentaje de especies presentan floración masiva, desarrollándose la fase de floración y fructificación en una temporada. Este mecanismo favorece la afluencia masiva de polinizadores, pero a su vez provoca un alto grado de autopolinización al visitar un mismo agente numerosas flores en un mismo individuo (geitonogamia) (Arroyo (1976), citado por HUMAÑA y RIVEROS, 1994).

Una situación opuesta la presentan aquellas especies con período de floración muy extenso, en aquellas la duración de la floración muchas veces alcanza a varios meses, estaciones o todo el año. En estos casos el número de

flores que emergen por día tiende a ser bajo, siendo la duración de la vida de una flor de varios días. En general, la afluencia de polinizadores es baja, pero las posibilidades que una misma flor sea visitada más frecuentemente son mayores (Bawa (1983), citado por HUMAÑA y RIVEROS, 1994).

2.4.2.1.5 Características de la flor. Las flores de las plantas entomófilas producen una menor cantidad de granos de polen que las flores de plantas anemófilas. Los granos de polen de plantas entomófilas son pegajosos y tienden a aglomerarse unos con otros, lo que facilita que se adhieran al cuerpo del polinizador. La mayoría de las flores polinizadas por insectos tienen uno o más nectarios dentro de la flor, ubicados generalmente en la base de la corola, hasta donde el insecto puede llegar con estructuras de su aparato bucal para extraer el néctar (MC GREGOR, 1976).

La posición de la antera influye sobre la remoción del polen, ya que de su contacto directo depende la adhesión e incremento de la carga de polen sobre el cuerpo del polinizador. Además, determina la zona del cuerpo del insecto sobre la que se ha depositado el polen, y por ende, las pérdidas de polen durante el acicalado (HARDER y BARRET, 1983).

2.4.2.1.6 Clasificación de los insectos polinizantes. A menudo los conceptos polinizante y polinizador se confunden, siendo totalmente diferentes, ya que polinizante se aplica al vector que transporta el polen y polinizador es aquella que aporta el polen (WESTWOOD, 1982).

Según FRANKEL y GALUN (1977), los insectos polinizantes se encuentran principalmente en los órdenes: Coleoptera, Hymenoptera, Diptera y Lepidoptera.

ROOT (1976), señala que en la apreciación de los insectos polinizantes, es necesario considerar que hay 2 grupos:

- a) Insectos polinizantes silvestres, sobre los cuales el hombre no tiene ninguna influencia.
- b) Insectos polinizantes domesticados, sobre los cuales se tiene un control y están representados principalmente por abeja melífera, (*Apis mellifera* L.) y algunos abejorros del género *Bombus*.

El Cuadro 2, muestra los diferentes insectos de los dos grupos y su importancia porcentual en sus visitas a los cultivos. El valor de los insectos silvestres como polinizantes está realmente delimitado por el hecho de no buscar el polen como reserva alimenticia para sus estados inmaduros, sino sólo y exclusivamente para satisfacer momentáneamente sus necesidades de alimento (ROOT, 1976; y RALLO, 1986).

CUADRO 2. Importancia porcentual de insectos domesticados y silvestres, como visitantes de las flores, en los cultivos.

Tipo de insecto	Visita (%)
1. Insectos domesticados (abejas)	73 – 88
2. Insectos silvestres:	
(Abejorros y abejas silvestres)	6 – 21
(moscas, polillas, mariposas, escarabajos y mosquitos.)	6 – 24

FUENTE: RALLO (1986).

Las abejas, en algunos casos, serían las más eficientes, pues visitan las flores metódicamente colectando polen y néctar, sin dañar las flores al alimentarse, contribuyendo eficazmente a la polinización (ROOT, 1976).

Debido a la gran cantidad de insectos que visitan las flores, diversos autores los clasifican de acuerdo a sus características, es así como ROOT (1976), les ha agrupado en:

Grupo 1: Especies que tienen efecto polinizante muy limitado, ya que su acercamiento al polen o néctar estaría determinado por la exclusiva y única necesidad de satisfacer requerimientos alimentarios, que luego de ser satisfechas se alejan y, además, carecen de estructuras adaptadas para la polinización. Entre estos insectos están, trips, escarabajos, mariposas, polillas y moscas. Por lo tanto, toda polinización que realicen es un efecto casual.

Grupo 2: Comprende abejas solitarias de muchas especies, ellas se aprovisionan de alimentos para su descendencia en desarrollo. Aventajan al grupo anterior por su abundante pilosidad y adaptaciones especiales para llevar el polen. Un factor que limita su efecto polinizante, es la incapacidad de la reina de tener abundante postura, lo cual reduce su población, a esto se agrega la desventaja de tener un número reducido de generaciones anuales.

Grupo 3: Los insectos aquí presentes son más evolucionados y eficientes en la polinización que los grupos tratados previamente. El insecto más representativo aquí es el abejorro (*Bombus sp.*), el cual se caracteriza por acopiar alimentos, guardando los excedentes en celdillas especiales de sus nidos. Tienen organización social, donde la reina es protegida por las obreras, además tiene una vida más prolongada, 3-4 meses. La intensidad de visitas de los abejorros a las flores es muy pronunciada; por su tamaño y características físicas pueden llevar grandes cantidades de néctar y polen, pero éstas también son una desventaja, ya que las flores pequeñas no soportan su peso.

Grupo 4: Insectos altamente evolucionados, su representante máximo es la abeja melífera, aventaja a los otros insectos por su desarrollada vida social, que le permite perdurar a través del tiempo, sobreviviendo el invierno como unidad social compacta. En la compleja estructura social, la reina es la única que normalmente ovipone, haciéndolo en forma abundante, otra característica de las abejas es su constante inclinación por el acopio de polen y néctar, ubicándola como el principal insecto polinizante.

2.5 Factores ambientales que condicionan el comportamiento de los insectos.

Las condiciones atmosféricas tienen una acción directa sobre el comportamiento y la actividad de los insectos polinizadores (FREE, 1993).

Las variables microclimáticas como radiación solar, viento, humedad y temperatura afectan la actividad de los polinizadores en su comportamiento en las flores, así diferentes polinizadores pueden responder diferencialmente a variaciones en el ambiente físico (KEVAN y BAKER, 1983).

La actividad de las abejas prácticamente se detiene bajo condiciones de lluvia, y puede ser muy influenciada por factores como temperatura, viento y luminosidad (KEVAN y BAKER, 1983).

2.5.1 Temperatura. La temperatura ambiente es un factor importante para el desarrollo de las actividades de los polinizadores. Las temperaturas bajas afectan la actividad de recolección de alimento, como también de vuelo (WESTWOOD, 1983).

Según FREE (1993), la temperatura tiene influencia sobre la fisiología de las flores, influyendo sobre su producción de polen y néctar, por lo que la atracción de ellas sobre los polinizadores puede variar en distintas etapas de la floración.

KEVAN y BAKER (1983), sostienen que la temperatura mínima a la cual comienza la actividad de pecoreo en abejas es aproximadamente 10°C. En primavera, generalmente comienzan a temperaturas inferiores a 12°C o 14°C y en verano temperaturas superiores a 16°C o 18°C.

HOOPINGARNER y WALLER (1993), sostienen que sobre 55°F (12,8°C) aumenta linealmente el número de vuelos al aumentar la temperatura, hasta alcanzar aproximadamente 90°F (32,2°C). A temperaturas mayores existe una reducción de los vuelos que se atribuye a la necesidad de enfriar la colmena.

2.5.2 Viento. El viento influye en la actividad de los insectos de tal forma que si éste aumenta, el número de vuelos disminuye, generalmente en una relación directa, cesando el vuelo cuando el viento alcanza una velocidad de 24 a 34 km/h (KEVAN y BAKER, 1983).

A veces el viento puede ocasionar cambios en la preferencia de las abejas por un cultivo. Se ha observado que cuando el viento comienza a aumentar, la mayoría de las abejas cesan sus visitas a las flores que se encuentran a mayor altura del suelo y prefieren visitar flores de otras especies que se encuentren más cercanas al suelo, aunque tengan menor cantidad de néctar, debido a que estas últimas pasan a ser un cultivo que les entrega mayor cantidad de calorías netas debido al menor gasto energético en el vuelo (HOOPINGARNER y WALLER, 1993).

2.5.3 Luminosidad. Las abejas prefieren visitar las partes iluminadas de un árbol más que las sombreadas, además éstas se orientan durante el vuelo gracias al sol, a pesar que exista nubosidad (WESTWOOD, 1982).

La abeja melífera es un insecto de hábito diurno que presenta una mejor adaptación a intensidades luminosas de 500 lux o superiores, con intensidades de luz más bajas su actividad disminuye y prácticamente se detiene con intensidades luminosas de 10 lux. Además, el oscurecimiento repentino del cielo, presagio de lluvia, provoca la entrada masiva de las abejas a la colmena (KEVAN y BAKER, 1983).

En días brillantes y cálidos puede asegurarse el máximo de polinización debido a la gran actividad de las abejas (NEIRA, 1993).

2.5.4 Humedad. La humedad relativa afecta indirectamente las visitas de los polinizadores ya que la mayor o menor humedad ambiental influye en la concentración de néctar (KEVAN y BAKER, 1983).

Al aumentar la humedad relativa el volumen de néctar aumenta y la concentración disminuye, haciendo al néctar más atractivo para las abejas (Corbet et al., 1979, citado por LOVERA, 1999).

2.6 Mecanismos de atracción floral.

Los frutales que requieren de insectos para ser polinizados presentan flores con características particulares entre las que se encuentran periantos conspicuos, pétalos a menudo coloridos y con marcadas guías hacia la zona de néctar, nectarios florales, esencias y aromas a menudo presentes, granos de

polen relativamente grandes (75 - 150 micrones), pegajosos, aceitosos, presentación en tétradas con superficie ornamentada y que no pueden ser llevados con facilidad por las corrientes de aire (FRANKEL y GALUN, 1977).

Las diversas estructuras florales y los mecanismos de polinización en las angiospermas están relacionados con los diferentes vectores del polen y las conductas que éstos han desarrollado. Los acercamientos están principalmente estimulados por la provisión de alimentos, polen y néctar y la identificación y discriminación entre flores está basada en el olor o aroma y atracción visual, la cual es debida al color, forma, textura, ubicación y movimiento de las flores por acción de corrientes de aire (HERRERA, 1995).

Debido a las diferencias en atributos de las flores como morfología floral, cantidad de néctar y esencias florales, las plantas difieren en el régimen de polinización ya que las características de la flor influyen en el comportamiento, cantidad de visitas y especies de insectos polinizadores (HERRERA, 1995).

Las abejas son atraídas por las flores reconociéndolas por su color, forma y olor (FREE, 1993). Estas se dirigen hacia las flores al verlas o al sentir su aroma. Luego de la localización visual de las flores y acercamiento a ellas, las abejas responden al aroma, el cual incluye una señal olfatoria del néctar como también del polen (JAY, 1986).

Además de la producción de néctar, existen otros factores que afectan la cantidad de visitas de las abejas a las flores, como la facilidad de acceso a ellas, el largo del tubo de la corola, la distribución espacial de las flores, el tamaño del campo y la distribución entre flores y la colmena (KEVAN y BAKER, 1983).

FAEGRI y VAN DER PIJL (1976), señalan que se debe distinguir entre atrayentes primarios, que satisfacen demandas como las alimenticias (néctar y polen), y los atrayentes secundarios que son los que provocan un estímulo en el aparato sensitivo del visitante (aroma, color), ya sea por acción directa o indirecta. Los atrayentes primarios son inútiles por sí mismos a menos que estén acompañados por los secundarios, pues debe existir algún tipo de organización para advertir la presencia del primero. Así también SCHOONHOVEN et al. (1998), afirma que los aromas y colores son fácilmente recordados cuando se ofrecen en combinación con una recompensa alimenticia.

2.6.1 Producción de néctar. El factor más importante en cuanto a la atracción de las flores es el néctar que secretan. Existe una relación positiva entre la atracción para las abejas y la intensidad de secreción de néctar. Flores que producen néctar con una reducida concentración de azúcares son por lo general, mucho menos visitadas que otras fuentes más ricas (RALLO, 1986).

El néctar es la recompensa más común ofrecida por las flores que necesitan polinizadores. El néctar tiene la ventaja de ser muy simple de metabolizar, debido a que es una solución azucarada, siendo ésta una razón de porqué suele ser tan requerido por los visitantes de las flores (STRASBURGER et al., 1986).

La producción de néctar juega un rol de importancia vital en la polinización, ya que es el recurso más común presentado por las flores para atraer a los polinizadores. Esta secreción tiene implicancias ecológicas y evolutivas, ya que se relaciona con los hábitos alimenticios de los agentes polinizantes (CARDENAS, 1998).

Existe una relación positiva entre la atracción para las abejas y la intensidad de la secreción de néctar. En general, las abejas manifiestan preferencia por el néctar que contiene más de 20% de azúcares. Tanto la cantidad, como la concentración de néctar en la flor están sometidas a algunas fluctuaciones que se llegan a manifestar durante el mismo día y de un día para otro. La concentración de azúcar fluctúa considerablemente con la temperatura, el viento, la humedad relativa y la lluvia. La influencia de estos factores se hace más patente en las flores abiertas y poco profundas (RALLO, 1986).

Además, la secreción de néctar es influenciada por la maduración del estigma, de los estambres y a menudo por la edad de la flor (FREE, 1993).

2.6.2 Producción de polen. El polen, al igual que el néctar, es un elemento de importancia en la relación polinizador-flor, debido a que es esencial para la nutrición de la abeja, aportando proteínas, minerales, ésteres y vitaminas (KEVAN y BAKER, 1983).

El polen es la fuente más importante de proteínas y lípidos para muchos insectos adultos, especialmente aquellos de los órdenes Hymenoptera, Diptera y Coleoptera. Además el polen forma parte importante de la dieta del estado larval de abejas sociales como solitarias (FREE, 1993).

La mayoría de las plantas polinizadas por los insectos presentan polen pegajoso. Es así, como los aceites presentes en el exterior del grano de polen pueden actuar como atrayentes y causar la adhesión de unos con otros y también al cuerpo de los insectos polinizantes (KEVAN y BAKER, 1983).

Las abejas sociales y las abejas solitarias poseen una pilosidad corporal adaptada para la recolección de polen. Por otro lado, los abejorros y abejas melíferas poseen corbículas, que son modificaciones especializadas para acarrear polen (FREE, 1993).

2.6.3 Aroma floral. El aroma floral es un factor muy importante, aunque las distancias a las cuales las abejas pueden detectar los aromas naturales no son grandes, probablemente un par de metros. Los perfumes florales no son liberados de una forma difusa a través de toda la superficie de la flor, sino que por órganos que reciben el nombre de osmóforos, los cuales se localizan fundamentalmente en los pétalos (JAY, 1986).

La respuesta al aroma floral es posterior a la localización visual de la flor por parte de la abeja, ésta respuesta incluye también el perfume del néctar y el olor del polen. Las flores visitadas por las abejas poseen un aroma dulce. Los compuestos responsables del aroma de las flores están preferentemente contenidos en sus aceites esenciales (HOOPINGARNER y WALLER, 1993).

Las abejas tienen un sentido del olfato altamente desarrollado y pueden ser entrenadas para asociar una fuente de alimentación con un olor particular, o bien con una mezcla de olores (FREE, 1993). Estas muestran una capacidad de discriminar entre miles de mezclas de olores y pueden ser capaces de reconocer muchas flores por su aroma. Según evidencias experimentales las abejas pueden aprender y distinguir al menos 700 diferentes aromas (SHOONHOVEN *et al.*, 1998).

Las abejas no perciben el aroma floral a grandes distancias, por lo tanto, en primer lugar ocurre la localización visual de las flores por las abejas, luego la

aproximación de éstas a las flores y finalmente la percepción del aroma que emiten a través del néctar y el polen (JAY, 1986).

2.6.4 Color de las flores. El color es otro de los componentes de aviso floral y una de las más importantes señales para los polinizadores con el propósito de ubicar, reconocer y discriminar entre flores a una gran distancia (SHOONHOVEN et al., 1998).

La abeja es capaz de distinguir el color amarillo, azul verdoso, azul y violeta (FREE, 1993). Los coloridos florales son muy distintivos y llamativos para los insectos ya que así ellos reconocen sus fuentes de alimento, pudiendo además, encontrarse en los pétalos de las flores, líneas de pigmentación que sirven de guía a los polinizadores. Sin embargo, el color de las flores puede cambiar con la edad de las flores y por la presencia de recompensas alimenticias (KEVAN y BAKER, 1983).

Cuando las abejas se encuentran trabajando en flores de un determinado color, se condicionan a él y no visitan flores de otras especies y de colores diferentes. Sin embargo, cuando una planta posee flores de distintos colores, las abejas la visitan indistintamente, ignorando este carácter como patrón de distinción. La forma general de una planta o de una flor, y especialmente el color de la flor pueden guiar a una abeja desde la distancia (FREE, 1993).

2.6.5 Otros atractivos. La abeja y otros insectos están también influenciados por la forma, silueta, longitud y tamaño de las flores. La distancia a la cual la flor atrae visualmente a los insectos es directamente proporcional a su diámetro. Flores grandes tienen más visitas de insectos que flores pequeñas (KEVAN y BAKER, 1983).

Flores de tamaño grande y de corolas profundas son muy atractivas para las abejas porque el conocimiento adquirido les enseñó que fuentes de néctar provenientes de corolas más profundas son más abundantes (FAEGRI y VAN DER PIJL, 1976).

2.7 Viabilidad polínica.

La viabilidad polínica es una medida de fertilidad masculina. Las pruebas de viabilidad son a menudo conducidas en experimentos de mejoramiento agrícola y para el monitoreo de las condiciones de almacenamiento del polen (KEARNS e INOUE, 1993).

2.7.1 Métodos directos e indirectos de viabilidad polínica. Existen medidas directas e indirectas de viabilidad polínica. Las pruebas directas consisten en la depositación del polen sobre estigmas receptivos y determinar las semillas producidas. Tal ensayo tiene la ventaja de ser una inequívoca medida para la población de granos de polen depositados sobre el estigma, pero estos ensayos tienen una serie de desventajas, como el tiempo consumido. La germinación del polen también puede ser contada *in vitro*. Los métodos indirectos son confiables sobre la correlación entre habilidad para fertilizar un óvulo y alguna característica física o fisiológica que puede ser determinada más rápidamente. Los métodos directos que correlacionan con la germinación de polen incluyen (1) el procedimiento fluorocromático (FCR), (2) pruebas de polen por actividad enzimática, y (3) pruebas de capacidad de tinción de células vegetativas. La correlación es alta para FCR y baja para tinción (KEARNS e INOUE, 1993).

2.8 Germinación polínica.

El éxito de las hibridaciones depende en gran medida de la capacidad del polen para germinar (HUAMAN, 1995), por lo que se hace necesario el desarrollo de métodos de evaluación de la calidad del polen confiables y de rápida ejecución, así como el ajuste de medios de cultivos óptimos para la germinación del polen (SINGH, 1993), pues los componentes que requiere el medio del polen varían entre las diferentes especies de plantas (DEMEKE y HUGHES, 1991).

Se han utilizado diferentes métodos de análisis de calidad del polen que se pueden agrupar en: tinciones morfológicas, pruebas de vitalidad del grano de polen, germinación *in vitro* y las basadas en el desarrollo del tubo polínico *in vivo* y *semi vivo* tras realizar polinizaciones controladas, entre los métodos más utilizados se encuentran las tinciones morfológicas y la germinación *in vitro* del polen. La primera consiste en la observación del polen al microscopio tiñéndolo con algún colorante, considerándose como granos vivos aquellos que se colorean y presentan una morfología normal (SINGH, 1993). El segundo método es el más usado y consiste en observar si el polen es capaz de iniciar la germinación y emitir el tubo polínico en un medio de cultivo artificial, considerándose no viables aquellos que no lo consiguen (PORTA y ROSELLI, 1991).

2.8.1 Medios de germinación. Los test de germinación en medios artificiales son frecuentemente usados para determinar la viabilidad de muestras de polen almacenado y fresco. Las variables como por ejemplo, factores quimiotrópicos, nivel de pH, contenido de boro-azúcar y efectos de la población de polen deben ser considerados, en parte, para las respuestas erráticas de la germinación *in vitro* de polen (HAUSER y MORRISON, 1964).

Normalmente los granos de polen no germinan satisfactoriamente en agua, pero las soluciones acuosas de sucrosa (ocasionalmente otros azúcares también), con o sin la adición de sustancias accesorias, producen buenos resultados (Johri y Vasil, 1961, citado por LYM, 1991).

Debido a que la cantidad y densidad, también afecta la germinación y el largo del tubo, aproximadamente una cantidad similar de granos de polen tienen que ser extendidos uniformemente en el medio para obtener resultados comparables (Johri y Vasil, 1961, citado por LYM, 1991).

JOHRI y VASIL (1961), mencionan que a veces existen marcadas diferencias en la germinación del polen de la misma especie si es cultivado en dos lugares, especialmente cuando uno de ellos se realiza en una zona tropical y la otra en una zona temperada.

La capacidad de germinación es influenciada además, por la edad y la madurez del polen y, por la temperatura antes y durante la antesis (Johri y Vasil, 1961, citado por LYM, 1991).

2.8.2 Efecto de los azúcares. Pigmann y Goepp (1954), citados por JOHRI y VASIL (1961), mencionan que la utilización de la lactosa para la germinación de los granos de polen es de considerable interés, debido a que su presencia en las plantas no ha sido demostrada en forma concluyente.

Se plantea que la adición externa de azúcares a los medios de germinación *in vitro*, tiene sólo un rol osmótico y no son utilizados por el tubo para ningún propósito nutricional (Johri y Vasil, 1961, citado por LYM, 1991).

Otros autores son partidarios de que la adición externa de azúcares en el medio de germinación, aparte del rol osmótico, sirve como material nutriente para el crecimiento de los tubos polínicos (Johri y Vasil, 1961, citado por LYM, 1991).

Johri y Vasil (1961), citado por LYM (1991), mencionan que al momento de la deshiscencia, los granos de polen usualmente contienen glucosa, sucrosa o fructosa como alimentos de reserva.

Según JOHRI y VASIL (1961), existe unanimidad en relación al rol de los azúcares, en el control de la concentración osmótica, durante la germinación del polen.

Más tarde LISKENS (1964), señala que la función del azúcar, como alimento o como agente osmótico, es aún necesario de aclarar. Además acota que al parecer las diferentes especies de polen tienen diferentes demandas.

Brewbaker y Kwack (1963), citados por LYM (1991), postulan que generalmente concentraciones de azúcar sobre el 40% no mejoran el crecimiento, mientras que aquellas bajo el 2% incrementan el reventamiento del polen y de los tubos polínicos.

2.8.3 Efecto del boro. En análisis cuantitativos se encontró que los granos de polen requieren a menudo, la misma concentración de ácido bórico presente en la secreción estigmática (JOHRI y VASIL, 1961). Más aún, los mismos autores concluyen que el boro juega un rol estratégico en la germinación del polen.

Johri y Vasil (1961), citado por LYM (1991), señalan que en un ensayo sobre cuarenta especies, diez mostraron marcada sensibilidad al boro, y que éste

no solo aumenta el porcentaje de germinación sino que también acelera la tasa de crecimiento del tubo.

A su vez, Johri y Vasil (1961), citados por LYM (1991), señalan que diez ppm de ácido bórico o concentraciones más altas son tóxicas para el crecimiento de la planta. A pesar de esto, los granos de polen pueden tolerar concentraciones más altas que 1200 ppm, obteniéndose óptimos resultados entre 10 y 150 ppm.

Según Johri y Vasil (1961), citado por LYM (1991), el rol del boro en la germinación y crecimiento del tubo polínico sería triple:

- a) Promueve la absorción y el metabolismo del azúcar formando complejos azúcar-boro.
- b) Incrementa la captación de oxígeno.
- c) Está envuelto en la síntesis de materiales pécticos de la pared del tubo polínico que está en activa elongación.

2.8.4 Calcio y otros iones. Con la investigación realizada por BREWBAKER y KWACK (1963), se determinó el importante rol del calcio, potasio, magnesio y sodio en la germinación del polen.

El calcio se encuentra en un amplio rango y en cantidad abundante en la mayoría de los tejidos de las plantas que florecen, pero en baja cantidad en los granos de polen, promediando alrededor de un 0,03% (BREWBAKER y KWACK, 1963).

Al calcio se le relaciona con las pectinas en el crecimiento de raíces, pelos radiculares y polen. Parece probable que el mejoramiento de la germinación y el

crecimiento del tubo polínico se deba primeramente al aferramiento del calcio en los grupos pectato-carboxílicos a lo largo de la pared del polen (BREWBAKER y KWACK, 1963).

BREWBAKER y KWACK (1963), señalan que en los estudios de polen, el calcio no podría ser reemplazado por estroncio o bario u otros iones tales como potasio, magnesio, sodio podrían ser usados en forma intercambiable para mejorar el efecto del calcio, si bien que los tubos no parecen requerir tales cationes para su crecimiento.

2.8.5 Agar. La adición de agar a los medios de germinación, no incrementa la germinación, sin embargo permite, en algunos tipos de polen, aumentar el largo del tubo (BREWBAKER y KWACK, 1963).

3 MATERIAL Y METODO

3.1 Material. A continuación se indican los principales materiales empleados en el estudio.

3.1.1 Ubicación del ensayo. La investigación se realizó en la Estación Experimental Santa Rosa, perteneciente a la Universidad Austral de Chile, ubicada entre los paralelos 39°45'30" y 39°47'30" latitud sur y los meridianos 73°14'55" y 73°13'15" longitud oeste, a 5 km de la ciudad de Valdivia.

3.1.2 Características del suelo. El suelo pertenece a los denominados trumaos (medial mesic typic dystrandept), serie Santa Rosa. Este suelo posee una humedad aprovechable del 20% base volúmen, 0.63 g/cc de densidad aparente y 65% de porosidad total . Su pH alcanza a 5.7 y su relación C/N es de 9.59. (NISSEN y BARRIA, 1976).

3.1.3 Características climáticas de la localidad. Presenta un clima templado húmedo, con características de marítimo. El área se encuentra entre las isotermas anuales 11° y 12°C. Para el mes de julio tienen una isoterma entre 7° y 8°C, y para enero es de 16° y 17°C. En cuanto a las precipitaciones tiene un promedio que fluctúa entre los 2200-2700 mm de agua caída, en un período de 184 días. En cuanto al período de sol, éste alcanza un promedio de 5.36 horas de luz/día, con un máximo de 9.2 horas de luz/ día en el mes de enero y un mínimo de 2.06 para el mes de junio. La localidad esta expuesta a un período de radiación solar máximo en el mes de enero (312 cal/cm^2), y un período mínimo en el mes de junio (67 cal/cm^2) (NISSEN y BARRIA, 1976).

3.1.4 Características de la plantación. Se utilizó una selección de once clones de avellano chileno de la serie denominada SAR, cuya edad alcanza los doce años. Los árboles están dispuestos en línea a una distancia de 4 metros aproximadamente.

3.1.5 Materiales e Instrumentos. Durante el periodo de experimentación se dispuso de los siguientes materiales: frascos de vidrio transparente, bolsas de papel, hielera, placas de frío, termómetro, etiquetas adhesivas, planillas de registro, aguja enmangada, pinzas de punta fina, pipetas, matraces, porta y cubreobjetos, placas Petri de 25 mm de diámetro, alcohol 70°, agua destilada, calentador de agua, papel aluminio, agar nutritivo (compuesto por sacarosa, ácido bórico, nitrato de calcio, sulfato de magnesio, nitrato de potasio), reactivo de Alexander (verde malaquita más fucsina), reactivo p-fenilendiamina, mechero.

Instrumentos: Refrigerador (TROTER, -3°C, min. Temp.), refrigerador (FENZA, -3°C, min. Temp.), congelador (GFL, D3600, -35° min. Temp.), lupa estereoscópica (Carl Zeiss, Stemi DRC, 2-4 X 10), lupa de cabeza portátil (Magni Focuser, 2.5 X), microscopio Carl Zeiss (40 aumento), estufa de secado (Memmert, convectiva, 200°C max.), estufa para germinación (LABLINE, imperial II incubator, 100°C max.), autoclave (TRILAB-120°).

3.2 Método. Para determinar la diversidad, viabilidad y germinación de los granos de polen transportado por las diferentes especies de insectos polinizantes de las flores del avellano chileno, se empleó la siguiente metodología.

3.2.1 Periodo de experimentación. Las actividades se dividieron en dos etapas, la primera fue la colecta de insectos que se realizó entre los meses de enero a abril del año 2000, coincidente con el período de plena floración del avellano y la segunda parte comprendió un periodo entre el mes de abril del año 2000 hasta el mes de abril del año 2001, donde se efectuaron los análisis de diversidad, germinación *in vitro* y viabilidad del polen de avellano.

3.2.2 Colecta de los insectos. Se procedió a coleccionar tres especies de insectos de las más representativas, que visitan flores de avellano chileno, lo cual fue seleccionado tomando en consideración los estudios realizados por (TAPIA, 2000).

La captura de los insectos se realizó en cada uno de los once árboles existentes en el sitio experimental. Este procedimiento se efectuó cuatro veces, durante fines de enero y principios de febrero se realizaron las dos primeras colectas y las dos últimas en el período, de fines de marzo hasta comienzos de abril.

Cada insecto se depositó en un frasco de vidrio, etiquetado con la hora, fecha y el árbol en que se efectuó dicha captura, depositando los frascos en una caja térmica, a baja temperatura, para evitar que el insecto continúe vivo y por agitación y movimiento se desprenda del polen adherido externamente a su cuerpo, luego todos los frascos fueron conservados en refrigeración a 4°C, hasta el momento en que fue necesario analizar el polen adherido al cuerpo de los insectos.

3.2.3 Determinación del porcentaje del polen de avellano y de otras especies, sobre el cuerpo de los insectos analizados. Para determinar diversidad polínica se procedió a teñir los granos de polen utilizando el reactivo de Alexander, con el fin de obtener una mejor visualización de los granos al microscopio.

a) Reactivo 1 (ALEXANDER, M, P. 1980)

Alcohol etílico 95%	20 mL
Verde de malaquita	20 mg
Agua destilada	50 mL
Glicerol	40 mL
Fucsina ácida	100 mg
Fenol	5 g
Acido láctico	1 mL

La mezcla se almacenó en botellas de vidrio oscuro. Para la determinación de diversidad, se extirparon previamente las corbículas de la abeja melífera. Luego se introdujo al insecto dentro de un frasco de vidrio agregándole alcohol al 70%, mediante pipeta, hasta cubrir el cuerpo del insecto, para poder desprender el polen adherido a su cuerpo mediante movimientos de agitación del frasco. Luego se extrajo el insecto y se dejó solamente la solución con alcohol y polen. Posteriormente se colocó el frasco dentro de una estufa a 40°C hasta que la evaporación del alcohol fue total, con lo cual se obtuvo solamente el polen dentro del frasco.

A continuación se agregó 2 mL de reactivo a los frascos para provocar la tinción. Luego, se sacó una gota, ocupando una pipeta Pasteur confeccionando una preparación, la cual se llevó posteriormente por unos segundos a la llama de

un mechero según protocolo de Alexander (1980). Se colocó un cubreobjetos y se dejó reaccionar por 5 minutos, para que la visualización fuese óptima, al realizar la observación.

La identificación del polen de avellano se realizó comparando las preparaciones antes descritas con preparaciones frescas de polen de avellano, para lo cual se colectaron flores de avellano y se realizaron preparaciones con el polen de estas flores utilizando la tinción de Alexander al igual que para las preparaciones de polen del cuerpo de los insectos.

La contabilización se realizó sobre un número de 44 muestras donde el cálculo del porcentaje de granos de avellano se efectuó sumando el total de granos de avellano en cada preparación, lo que se repitió para aquellos granos de otras especies. Para determinar el porcentaje de polen de avellano se utilizó la siguiente fórmula (3.1)

$$\% \text{ P. Avellano} = \frac{\text{N}^\circ \text{ polen de avellano}}{\text{N}^\circ \text{ total de polen por preparación}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.4 Determinación de la viabilidad polínica. Para determinar la viabilidad de los granos de polen se realizaron tinciones con dos distintos reactivos.

- a) reactivo 1 tinción de Alexander, se realizó el mismo manejo descrito en la página 37.

El polen no viable (solo presencia de paredes) toma coloración verde, el polen viable en cambio toma una coloración fucsia.

b) reactivo 2, p-fenilendiamina (RODRIGUEZ-RIANO y DAFNI, 2000).

Este reactivo se basa en la detección de la presencia de peroxidasa, la cual se produce al existir metabolismo celular en el grano de polen.

La solución del reactivo consiste en una ampolla del reactivo indicador peroxidasa (Sigma 390-1), y 200 μ L al 3% de hidrógeno-peroxidasa (1:9, 30% hidrógeno peróxido y una solución salina buffer de fosfato a pH 7,4) adicionada a una dilución buffer de 50 mL de trizmal 6.3 precalentada a 37°C, la cual fue preparada por una mezcla entre un concentrado buffer de trizmal (Sigma 90-3C) con agua destilada 1:9.

La mezcla se guardó en botellas de vidrio oscuro, ya que la luz daña al reactivo. Esta solución puede mantenerse refrigerada cerca de 15-20 días sin perder su actividad potencial.

Para la determinación de viabilidad con el reactivo p-fenilendiamina, se procedió a obtener los granos de polen del cuerpo de los insectos, utilizando el mismo manejo descrito en la página 37, para la determinación del porcentaje de polen de avellano.

A continuación se agregó 2 mL de reactivo, a los frascos para provocar la tinción, pero previamente precalentado a "baño maría" para elevar la temperatura a 37°C. Luego, se colocó una gota de reactivo con granos de polen en un portaobjetos, el cual se cubrió con un cubreobjeto. Por último se procedió a identificar y cuantificar granos de polen viables a través de la coloración café y granos no viables fueron reconocidos por la ausencia de coloración.

3.2.5 Preparación del medio de cultivo *in vitro*. Para esta preparación se empleó el método de germinación *in vitro* descrito por Brewbaker y Kwack (KEARNS e INOUYE.1993). Se ha detectado que el medio Brewbacker y Kwack, es el más apropiado, ya que se han obtenido óptimos resultados en una buena cantidad de especies. Los materiales necesarios para preparar dicho medio fueron las siguientes:

sacarosa	10%
ácido bórico	100 mg/L
nitrate de calcio	300 mg/L
sulfato de magnesio	200 mg/L
nitrate de potasio	100 mg/L

Con los componentes señalados anteriormente se preparó en un matraz de 100 mL el medio nutritivo y se llevo a autoclave para obtener un medio estéril, transcurrido el tiempo de esterilización, el medio fue vaciado en placas petri plásticas de 25 mm de diámetro. Posteriormente las placas se dejaron a temperatura ambiente hasta que el medio solidificó.

3.2.5.1 Extracción de polen de la superficie del cuerpo del insecto. En el caso de la abeja melífera se extrajeron las corbículas, ya que el polen corbicular ha perdido su capacidad de germinación, porque las abejas adicionan secreciones de las glándulas mandibulares, además de miel o néctar.

Para la obtención del polen se procedió a tomar a los insectos con pinzas bajo lupa, y se les quito el polen con aguja enmangada. Aprovechando la característica de adhesión del grano de polen a la superficie de la aguja.

3.2.5.2 Siembra de polen en el medio nutritivo. A continuación estos granos de polen fueron sembrados directamente sobre el agar nutritivo gelificado contenido en las placas Petri, previamente rotuladas, las cuales fueron tapadas para impedir la evaporación del medio y mantener así una humedad relativa alta y a continuación se llevaron a una estufa donde se les mantuvo durante dos a tres días a una temperatura entre 22°-23°C. Luego se realizaron observaciones bajo lupa estereoscópica (Carl Zeiss) día a día para detectar la emergencia del tubo polínico.

3.2.5.3 Determinación del porcentaje de germinación. Utilizando estas preparaciones se procedió a contabilizar los granos de polen germinados y no germinados de avellano chileno, considerando como germinado todo polen cuya longitud de tubo polínico fue mayor que el diámetro del polen (SHYVANNA y RANGASWAMY, 1992). El cálculo de porcentaje se realizó sumando el total de granos germinados en cada placa, lo que se repitió para aquellos granos que no germinaron. Para determinar el porcentaje se utilizó la siguiente fórmula (3.2)

$$\% \text{Germinación} = \frac{\text{N}^\circ \text{ polen germinado por placa}}{\text{N}^\circ \text{ total de polen por placa}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.6 Análisis Estadístico. Los datos obtenidos, a excepción de los de porcentaje de polen de avellano y de otras especies, fueron sometidos a pruebas de normalidad, utilizando para ello el test estadístico de Kolgomorov (STEEL y TORRIE, 1985), que permitió verificar si los diferentes datos presentaban una distribución normal.

Una vez realizadas las pruebas de normalidad de los datos, fueron sometidos a la prueba de homogeneidad de la varianza, mediante el test estadístico de Bartlett's con un nivel de significancia del 5% (STEEL y TORRIE, 1985).

Para determinar diferencias entre los porcentajes de germinación y entre porcentajes de viabilidad polínica se empleo un diseño completamente al azar. A los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza, y si existían diferencias significativas se efectuaron pruebas específicas, utilizando el test de Tukey con un nivel de significancia al 5% (STEEL y TORRIE, 1985).

4 PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

A continuación se presentan y analizan los resultados según los objetivos propuestos, en relación al polen del avellano chileno (*Gevuina avellana* Mol.), presente en el cuerpo de los insectos que visitan con mayor frecuencia sus flores.

4.1 Determinación del porcentaje de polen de avellano chileno (*Gevuina avellana* Mol.) y de otras especies presente sobre el cuerpo de los insectos analizados.

A continuación se presentan los porcentajes de granos de polen presentes en el cuerpo de cada especie de insecto analizado.

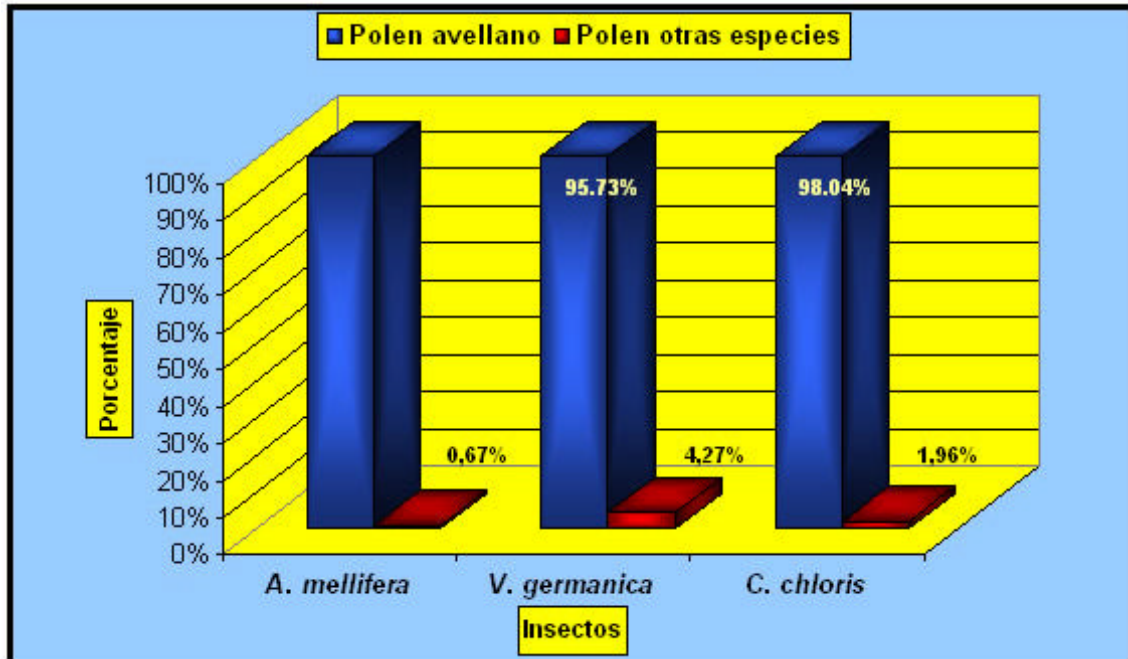


FIGURA1. Granos de polen de avellano y otras especies, presente sobre el cuerpo de los insectos analizados, en porcentaje.

A partir de la Figura 1, se puede observar que prácticamente la totalidad del polen colectado del cuerpo de las tres especies de insectos pertenece a *Gevuina avellana* Mol.

Los avellanos, sobre los cuales se colectaron los insectos, ubicados en el centro experimental Santa Rosa perteneciente a la Universidad Austral de Chile, se encuentran rodeados de una vegetación formada por castaño (*Castanea sativa* Mill.), manzano (*Malus pumila* Mill.), frambueso (*Rubus idaeus* L.). Alrededor del sector se encuentran restos de una comunidad nativa de parque tipo roble-laurel (*Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst.) y (*Laurelia sempervirens* (R. et P.) Tul.), como también matorral antropogénico formado por maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol). Stuntz.), zarzamora (*Rubus constrictus* Muell. et Lef.), espino alemán (*Ulex europaeus* L.). Entre las herbáceas predominan chépica (*Agrostis tenuis* L.) y en lugares más húmedos pasto miel (*Holcus lanatus* L.). Teniendo en cuenta lo anterior, el avellano chileno posee una floración, que se presenta en los meses en que los demás vegetales que lo rodean no la presentan, por lo tanto al ser la oferta de polen de esta especie más abundante del sector, los insectos identificados mantendrían una fidelidad en visitar y colectar esta abundante fuente nutricional de polen, lo que reflejaría una baja transferencia de polen interespecífico. Al respecto, esta constancia floral beneficiaría al avellano, de acuerdo a lo descrito por Silvester (1997), citado por TAPIA (2000), donde señala que los insectos polinizadores al visitar flores de distintas plantas en un vuelo de pecoreo, aumentan la transferencia interespecífica de polen produciendo la disminución en la formación de semillas de las frutas, e inclusive inhibir la fructificación en distintas especies, situación que no ocurre en este caso.

4.2 Viabilidad de los granos de polen de avellano (*Gevuina avellana* Mol.).

Los resultados de viabilidad polínica, tanto en su totalidad, como en la carga particular de polen, por cada especie de insecto estudiado y el análisis en la respuesta del polen de avellano, respecto a los procedimientos de tinción empleados, se presentan a continuación:

4.2.1 Determinación de la viabilidad del polen de avellano chileno. A continuación se presentan los porcentajes obtenidos de viabilidad de granos de polen de avellano.

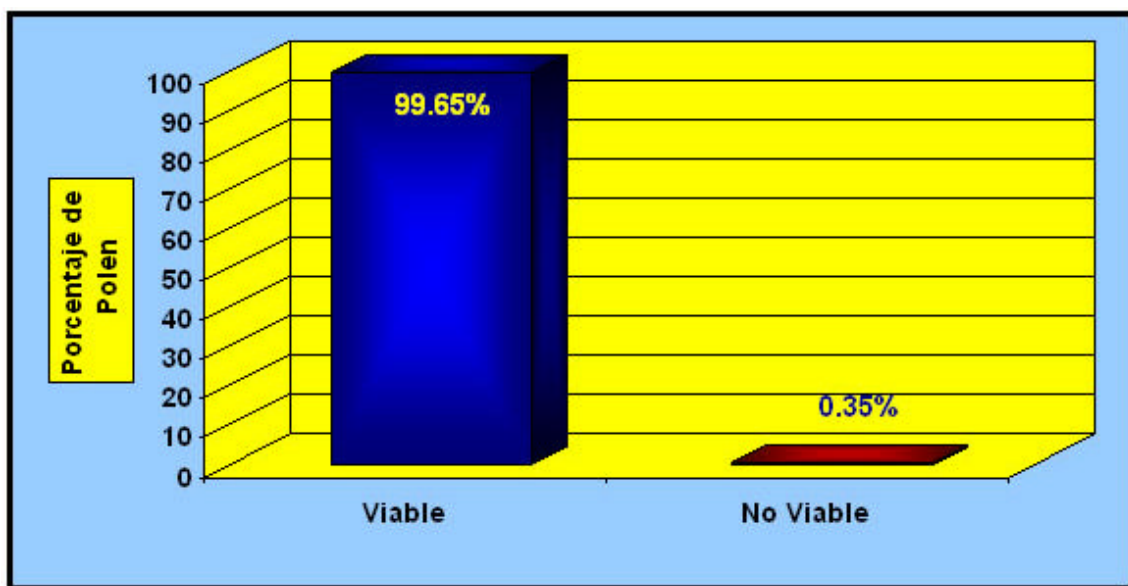


FIGURA 2. Viabilidad total de los granos de polen de avellano presente en el cuerpo de los insectos analizados, en porcentaje.

A partir de la Figura 2, se puede observar que el porcentaje de viabilidad de los granos de polen presentes en el cuerpo de los insectos analizados fue de un 99,65% y a su vez un 0,35% no fue viable. Según estos datos se podría indicar

que gran parte de estos granos de polen están vivos y podrían potencialmente germinar y formar tubo polínico.

4.2.2 Análisis de los métodos de tinción ocupados para determinar el porcentaje de viabilidad de los granos de polen. La determinación de la viabilidad polínica, se efectuó a través de dos tipos de tinciones, con el objetivo de establecer si existen diferencias entre ambos métodos. En la Figura 3, se observa el efecto sobre los granos de polen del método diferencial de Alexander (a), que torna los granos de polen viables de color fucsia, y del método de p-fenilendiamina, mediante el cual los granos de polen viables adquieren una coloración café (b).

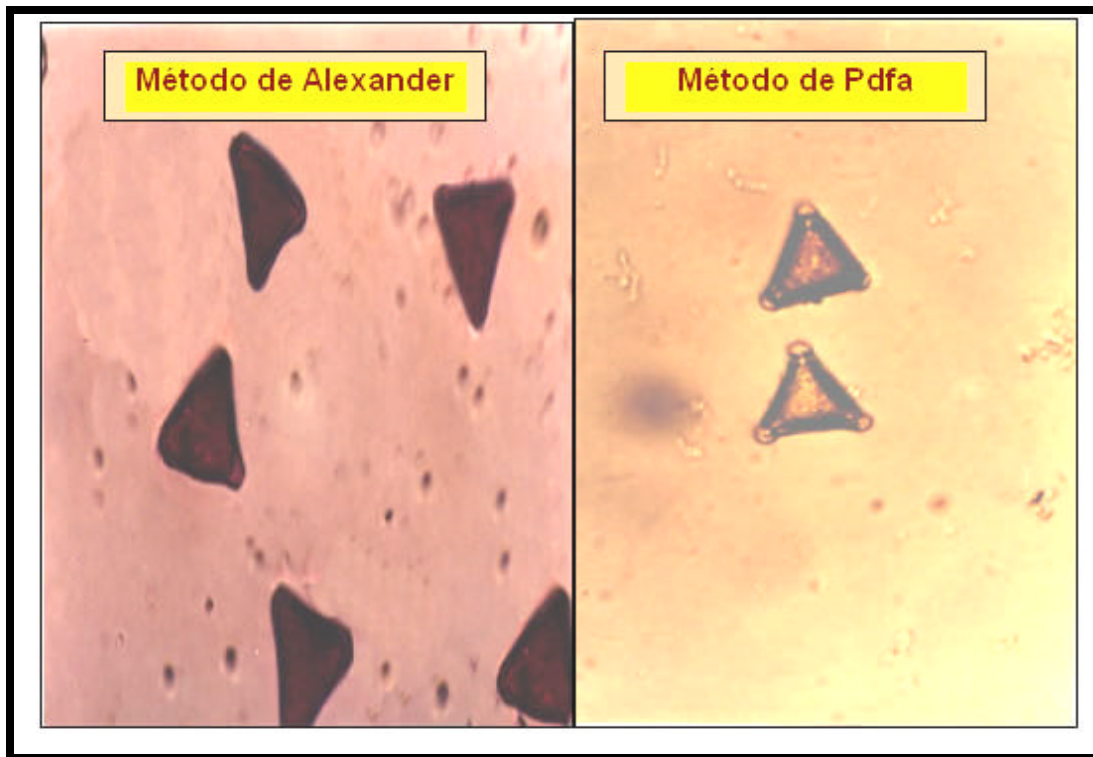


FIGURA 3. Granos de polen viables según el método de Alexander y el método de Pdfa.(40X).

CUADRO 3. Viabilidad del polen de avellano, según método utilizado, en porcentaje.

Tipo de Método	N° de Insectos	Viabilidad Promedio (%)
Alexander	132	99,35 a*
Pdfa	132	99,95 a

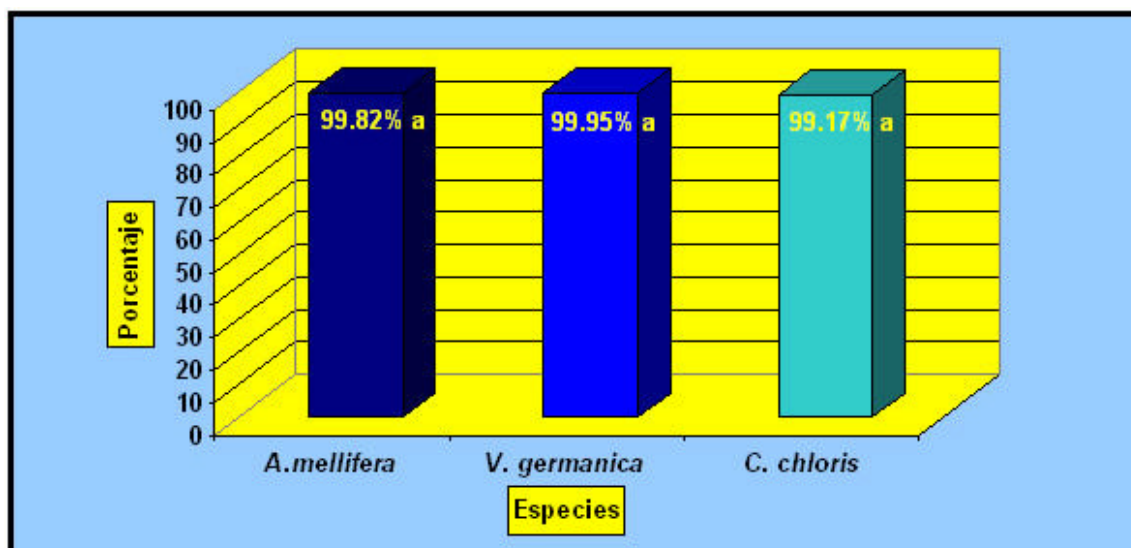
* Letras iguales indican que no existen diferencias significativas al 5% (Prueba de TUKEY).

Como se aprecia en el Cuadro 3, no existen diferencias entre ambos métodos para evaluar la viabilidad del polen de avellano, a pesar que el procedimiento de Alexander nos señala la viabilidad polínica por la capacidad de tinción de las células vegetativas (KEARNS e INOUYE, 1993), y a su vez el procedimiento de p-fenilendiamina se basa en la detección de la presencia de peroxidasa, la cual se produce al existir metabolismo celular en el grano de polen (RODRIGUEZ-RIANO y DAFNI, 2000).

Si bien es cierto, no existen investigaciones actuales que informen acerca de la viabilidad del polen presente en las flores, como sobre el cuerpo de los insectos que visitan al avellano chileno, sí se puede extrapolar, a modo de ejemplo, una investigación de viabilidad para el polen de las flores de la especie nativa *Ugni molinae* Turcz, cuyo porcentajes fueron $87.37 \pm 6.52\%$ granos de polen viables y $12.63 \pm 6.52\%$ granos de polen no viables, utilizando la tinción diferencial de Alexander (SOTOMAYOR, 2000). Además de otro trabajo realizado sobre el polen de cuatro especies del género *Nothofagus*, los cuales normalmente se presentan asociados al área de distribución del avellano chileno, presentaron una viabilidad polínica para árboles adultos de 97.08% *N. antártica*, 99.08% *N. obliqua*, 100% *N. dombeyi* y 90.96% *N. betuloides* (BAEZ, 1998)

No existen investigaciones para la viabilidad polínica del avellano, con la tinción de p-fenilendiamina, sólo como ejemplo se presenta una investigación utilizando la tinción de p-fenilendiamina sobre polen fresco proveniente de flores de distintas especies, la cual arrojó los siguientes porcentajes de viabilidad polínica por especie, *Calycotome villosa* $97.13 \pm 1.93\%$, *Ciclamen persicum* $94.36 \pm 4.11\%$, *Romuela phoenicialis* $92.68 \pm 4.69\%$ (RODRIGUEZ-RIANO y DAFNI, 2000).

4.2.3 Determinación de la viabilidad de los granos de polen de avellano presente en el cuerpo de cada insecto. A continuación, se presentan los porcentajes de viabilidad obtenidos, en las especies de insectos analizados, FIGURA 4.



* Letras iguales indican que no existen diferencias significativas al 5%, según la prueba específica de TUKEY ($p < 0,05$).

FIGURA 4. Viabilidad de los granos de polen de avellano, presente en el cuerpo de cada especie de insecto, en porcentaje.

En relación a la Figura 4, se observa que la viabilidad de los granos de polen de avellano presente en la zona externa del cuerpo de los insectos fue alto en las tres especies. Si bien existen diferencias, estas no son estadísticamente significativas. Ahora en relación a la adaptabilidad del exoesqueleto de las tres especies de insectos para transportar polen viable de avellano, se eliminaron las corbículas en *Apis mellifera*, ya que estas al ser mojadas por la abeja producen una pérdida de la viabilidad del polen acumulado en ellas, debido a la presencia de enzimas en la saliva. Según VIZCARRA (1999), la abeja melífera transporta mayor cantidad de granos de polen que *Corynura chloris* Spin. por el mayor tamaño corporal, por los abundantes pelos bifurcados que favorecen la retención del polen, pero, la característica más importante que justifica la mayor cantidad de polen en su cuerpo es su conducta social que la obliga a alimentar a la colonia. Free (1993), citado por VIZCARRA (1999), señala que la abeja solitaria, también posee pilosidad adaptada a la recolección de polen y también debe mantener a su descendencia, pero esta actividad no es continua, la abeja solitaria, abandona esta actividad luego de reunir el alimento necesario para las larvas. VIZCARRA (1999), indica que el tórax, uno de los tagmas más pequeños en los insectos, acumula la mayor cantidad de polen. Descartando la corbícula, la parte posterior del tórax y las patas son las que llevan mayor cantidad de polen. Hodges (1984), citado por VIZCARRA (1999), describe cómo la abeja melífera limpia la parte anterior del tórax, pero tiene dificultad en extraer el polen acumulado en la parte posterior del tórax. Apoyados por las características mencionadas y los resultados obtenidos se puede inferir que no estarían actuando factores intrínsecos de los insectos en detrimento de la viabilidad del polen situado en la parte externa del cuerpo de estas tres especies de insectos.

El valor de estos porcentajes de viabilidad obtenidos adquiere aún más importancia, al considerar que el avellano chileno ha desarrollado mecanismos que favorecen la polinización cruzada. Al respecto, TAPIA (2000), al efectuar cruzamientos de autopolinización y polinización cruzada menciona que los bajos porcentajes exhibidos por los tratamientos de autopolinización, indican que el avellano al parecer ha desarrollado características morfológicas y estratégicas promotoras de la polinización cruzada, para asegurar una mayor formación de frutos, por lo que existiría una probable maduración gradual de flores y de los primordios seminales, lo que hace posible la fecundación de los óvulos con polen transferido al estigma, por las sucesivas visitas de la entomofauna asociada a esta especie.

4.3 Germinación del polen de avellano chileno, en porcentaje.

En la Figura 5, se aprecia el desarrollo del tubo polínico de un grano de polen, utilizando el medio de cultivo estandarizado (BREWBAKER y KWACK,1963).

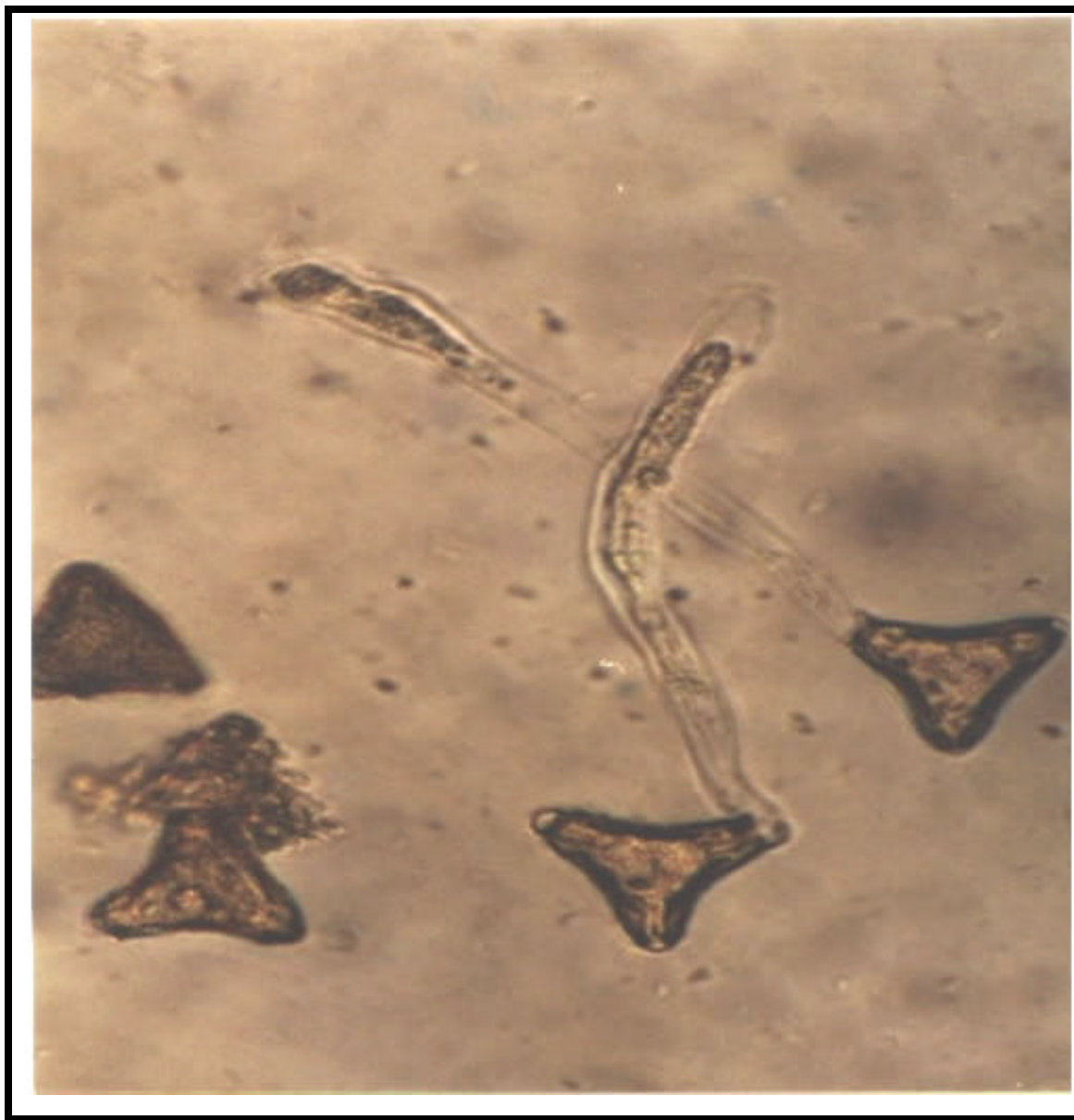


FIGURA 5. Granos de polen de avellano, mostrando desarrollo de tubo polínico (40X).

4.3.1 Germinación total de los granos de polen de avellano, presente en el cuerpo de los insectos analizados, en porcentaje.

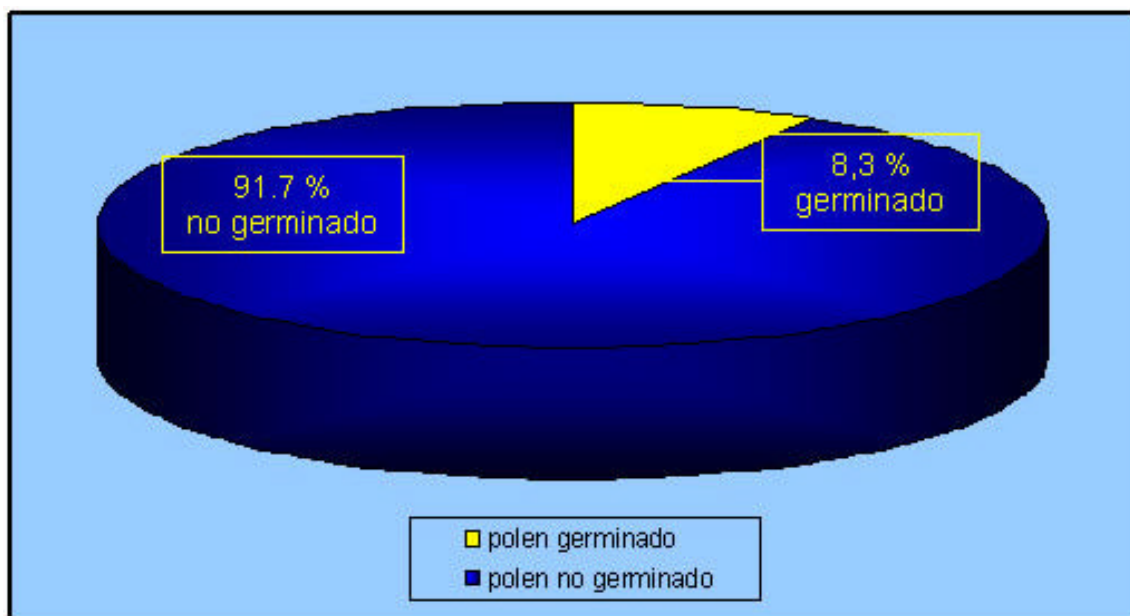


FIGURA 6. Germinación total de los granos de polen de avellano, presente en el cuerpo de los insectos analizados, en porcentaje.

En relación a la Figura 6, se observa que sólo un 8.3% del polen analizado de avellano germinó. Estudios realizados para polen proveniente de flores con este medio de cultivo y similar metodología en otras especies han logrado resultados similares. VASQUEZ *et al.*, (1996), analizando la germinación polínica en *Quercus rotundifolia* Lamb. obtuvo un porcentaje de germinación de 11.49%; y para *Quercus suber* L. 0.43%, lo que evidencia lo dispar de los resultados utilizando especies del mismo género. Sin embargo, existen resultados donde no se ha encontrado respuesta a la germinación utilizando este medio de cultivo, por ejemplo en la especie *Capsicum annum* L., se obtuvo 0 % de germinación (LYM, 1991), y a su vez otros resultados para cuatro especies adultas del género

Nothofagus fueron, 69.33% *N. antarctica*, 48.71% *N. obliqua*, 59.65% *N. dombeyi* y 84.78% *N. betuloides* (BAEZ, 1998).

Los bajos niveles de germinación obtenidos se deberían según Egea (1992), citado por CASTRO et al. (1999), a que el desarrollo del tubo polínico, en condiciones *in vitro*, se verá limitado por el medio de cultivo utilizado, ya que esas condiciones son distintas a las encontradas en el estigma de la flor, en forma natural.

Otro factor importante de señalar son las condiciones y el tiempo de almacenamiento del polen, los cuales pueden haber influido en los resultados de la germinación polínica. En primer lugar la forma de almacenamiento de los insectos con polen adherido a su cuerpo a bajas temperaturas, del orden de los 4°C, se debió esencialmente al hecho de coleccionar gran cantidad de insectos (528), en un lapso de tiempo, determinado por la floración del avellano, que ocurre durante los meses de verano y la cual no es uniforme, por lo tanto fue necesario primeramente coleccionar los insectos y posteriormente almacenarlos, para luego poder desarrollar además del análisis de germinación los otros tres análisis con 4 repeticiones cada uno, y así extraer y utilizar el polen del cuerpo de los insectos en periodos de tiempo determinados por la cantidad de insectos que se pudieron trabajar por día, entonces a medida que se avanzaba en los análisis fue imprescindible preservar estas muestras almacenadas a baja temperatura, para así poder mantener las características del polen de avellano situado en la superficie de los insectos con las menores alteraciones posibles antes de su utilización.

La humedad relativa del aire afecta decisivamente la longevidad del polen (STANLEY y LINSKENS, 1974). Muchas especies mantienen mejor su viabilidad

a humedades relativas bajas. Experimentos hechos con muestras homogéneas de polen almacenado a diferentes y controladas humedades relativas han sido reportadas por Kessler (1930) y Launer (1962), citado por STANLEY y LINSKENS, (1974). Estos resultados indican que la longevidad del polen está correlacionada en forma negativa con la humedad relativa durante el almacenamiento. La longevidad usualmente incrementa con la reducción de la humedad relativa hasta valores aproximados de 6% durante el almacenamiento.

La longevidad es mejor a humedades relativas entre 6 y 60%, y para muchas especies la condición óptima es bajo el 60% durante el almacenamiento (STANLEY y LINSKENS, 1974). Una excepción a lo anteriormente señalado lo constituyen los granos de polen de las gramíneas, estos granos pierden la viabilidad al cabo de un día bajo condiciones ambientales secas. Esta pérdida de viabilidad es ligeramente más lenta a bajas temperaturas (STANLEY y LINSKENS, 1974).

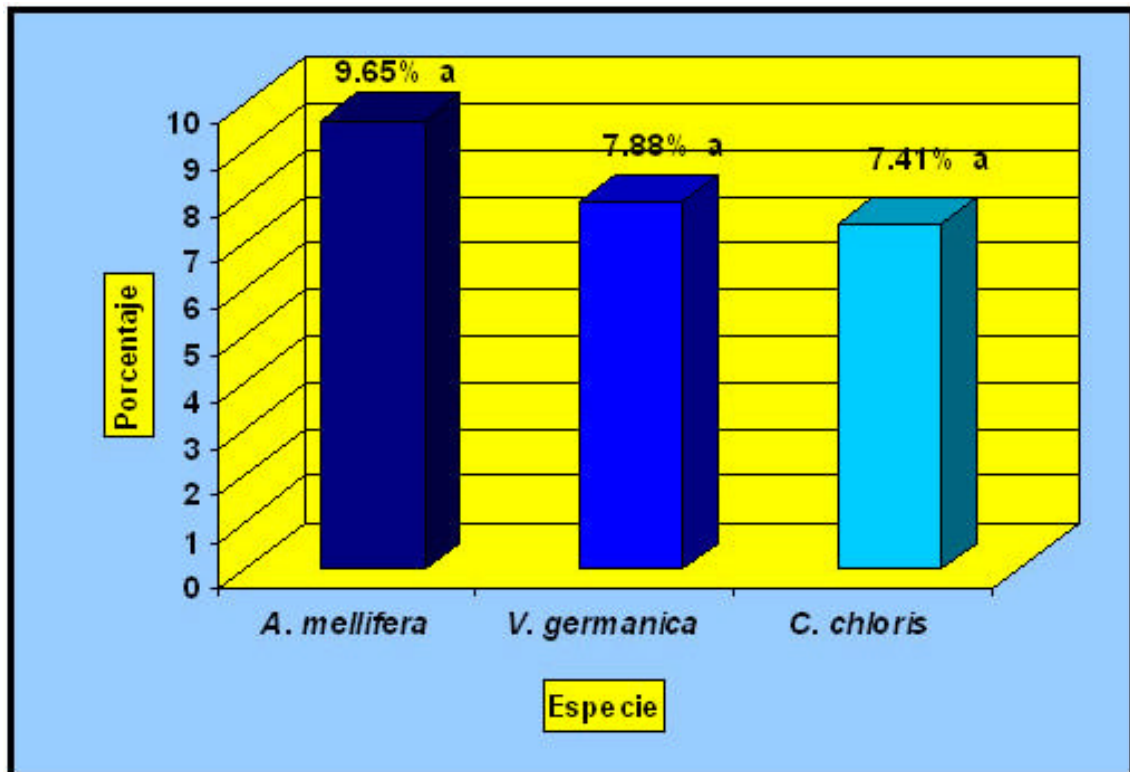
Daniel (1955), citado por STANLEY y LINSKENS (1974), almacenó polen de *Zea mays* por 10 días con un 60% de HR y 7°C, encontrando que la viabilidad disminuye rápidamente después del sexto día de almacenamiento. Estudios hechos por Pfahler y Linskens (1973), citados por STANLEY y LINSKENS (1974). En dos variedades de *Zea mays* mostraron, mediante un test *in vitro*, que se puede mejorar la capacidad de germinación después de 24 h a 2°C o después de 12 h a 20°C. Alternativamente, granos de polen de muchas especies, se almacenan óptimamente a humedades relativas extremadamente bajas Holman y Brubaker (1926), citados por STANLEY y LINSKENS (1974), encontraron en aproximadamente 22 especies que la media óptima para la germinación es de 0,005% de HR. Las especies de gramíneas y ranunculáceas, en particular, son incapaces de sobrevivir almacenadas con humedades relativas inferiores al 30%.

Frecuentemente la fluctuación de la HR durante el almacenamiento causa una rápida pérdida de la viabilidad. Aparentemente el polen no puede soportar variaciones extremas de humedad, lo cual induce a fases de alta actividad metabólica alternando con fases de baja actividad (STANLEY y LINSKENS, 1974).

El grado de humedad es otro factor importante que afecta la viabilidad durante el almacenamiento. La siguiente hipótesis ha sido ofrecida para explicar la resistencia o tolerancia al polen de daños por desecación. Los procesos metabólicos son severamente retardados y reducida la respiración a consecuencia del bajo contenido de agua en el polen maduro (STANLEY y LINSKENS, 1974). La deshidratación de proteínas podría reducir la actividad enzimática.

Otro factor del medio ambiente que afecta al polen durante el almacenamiento, es la temperatura. Los resultados de los estudios de 36 especies indican que la viabilidad se puede extender sustancialmente a temperaturas cercanas a los 0°C. Sin embargo, el contenido de agua juega también un importante papel. Olmo (1942), citado por STANLEY y LINSKENS (1974), observó que la capacidad de germinación del polen que se almacenó a -12°C fue más alta a 28% de HR que a 56% de HR.

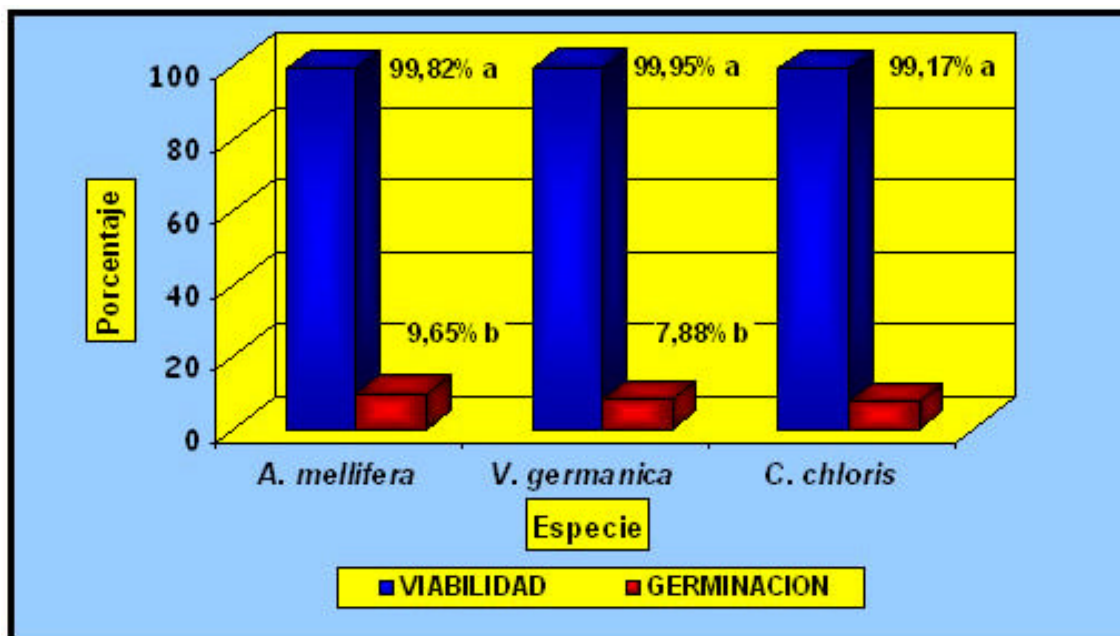
4.3.2 Germinación total de los granos de polen de avellano presente en el cuerpo de cada uno de los insectos analizados. Según se desprende de la Figura 7, la germinación de los granos de polen no superó el 10%, incluso la germinación del polen presente en *Vespula germánica* Fabr. y *Corynura chloris* Spin. alcanzó al 7,8% y 7,4% respectivamente lo que señala un bajo desarrollo del tubo polínico en condiciones *in vitro*, del polen colectado en estas especies de insectos que visitan flores de avellano chileno.



* Letras iguales indican que no existen diferencias significativas al 5%, según la prueba específica de TUKEY ($p < 0,05$).

FIGURA 7. Germinación de los granos de polen de avellano, presente en el cuerpo de cada especie de insecto, en porcentaje.

El polen colectado por *Apis mellifera* presenta un porcentaje de germinación ligeramente mayor, sin embargo el análisis estadístico no mostró diferencias significativas. Esto estaría señalando que no existe una influencia negativa hacia el polen de parte de los insectos, en cuanto al contacto que éste polen tendría sobre su exoesqueleto.



* Letras iguales indican que no existen diferencias significativas al 5%, según la prueba específica de TUKEY ($p < 0,05$).

FIGURA 8. Comparación entre viabilidad y germinación de los granos de polen de avellano, presente en el cuerpo de cada especie de insecto.

Ahora bien, según lo presentado en la Figura 8, se observa gran diferencia entre los porcentajes de viabilidad y germinación del polen extraído de la superficie del cuerpo de las tres especies de insectos utilizados para este estudio. Lo que señala la prácticamente nula relación entre estas dos pruebas de viabilidad polínica.

Lo anteriormente señalado no le resta validez a cada análisis por si sólo, ya que para el caso del análisis de germinación, este se traduce en la formación del tubo polínico, a diferencia del análisis de tinción diferencial de Alexander y el

de reacción enzimática p-fenilendiamina, los cuales tienen como objetivo señalar en forma rápida una potencial viabilidad polínica.

De todas maneras los altos porcentajes de viabilidad polínica se podrían tomar como resultados satisfactorios, ya que si bien no existen investigaciones actuales de comparación y teniendo en cuenta que se utilizó a parte de la tinción diferencial de Alexander, cuestionada como otras tinciones con objetivo similar últimamente por algunos investigadores por ser capaces de teñir polen muerto o abortado, la tinción de p-fenilendiamina que es capaz de identificar reacciones metabólicas dentro de la célula a diferencia de la tinción diferencial de Alexander y ambas mostraron prácticamente los mismos resultados como se puede observar en el Cuadro 3.

5 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, se puede llegar a las siguientes conclusiones:

Los porcentajes de polen de avellano chileno encontrados sobre la superficie corporal de los tres insectos analizados fueron siempre superiores al 90%.

La viabilidad total de los granos de polen de avellano chileno, provenientes de la superficie corporal de los insectos fue de 99.65%.

Los métodos de Alexander y Parafenilendiamina empleados, para determinar la viabilidad polínica, no mostraron diferencias significativas entre ellos.

La viabilidad de los granos de polen encontrados, en las tres especies de insectos analizados, fue similar.

La germinación *in vitro* de los granos de polen de avellano presentes en el cuerpo de los insectos fue muy bajo, inferior al 10%, sin mostrar diferencias estadísticas significativas entre las especies de insectos que lo transportaban.

6 RESUMEN

Se determinó la viabilidad y el porcentaje de polen de avellano chileno (*Gevuina avellana* Mol.), presente sobre el cuerpo de los insectos que visitan sus flores, mediante la observación de preparaciones de polen de avellano bajo microscopio y lupa previamente teñido y germinado respectivamente. Para tal efecto se colectó una cierta cantidad de las tres especies de insectos más representativas en visitar las flores del avellano chileno, estos fueron *Apis mellifera* L., *Vespula germanica* Fabr., y *Corynura chloris* Spin. Previa extracción del polen superficial de sus cuerpos se realizaron los análisis respectivos de determinación del porcentaje de polen de avellano y otras especies por medio del procedimiento de Alexander, determinación de la viabilidad polínica mediante los procedimientos de tinción de Alexander y Parafenilendiamina y por último la determinación de la capacidad germinativa del polen a través de un medio de cultivo *in vitro* descrito por Brewbaker y Kwack. El porcentaje de polen de avellano sobre el cuerpo de las especies de insectos analizados fue alto, para *A. mellifera* un 99.33%, *V. germanica* 95.73%, y *C. chloris* 98.04%. La viabilidad del polen fue alto para las tres especies, siendo los resultados promedios obtenidos con el procedimiento de Alexander y Parafenilendiamina de un 99.35% y 99.95% respectivamente, los resultados promedios de viabilidad por especie fueron, *A. mellifera* 99.82%, *V. germanica* 99.95%, y *C. chloris* 99.17%. Los dos métodos de tinción ocupados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, como también no se presentan diferencias estadísticamente significativas para la viabilidad en las tres especies de insectos. La capacidad germinativa promedio para las tres especies fue de un 8.3%, y por especie, *A. mellifera* 9.65%, *V. germanica* 7.88% y *C. chloris* 7.41%, no existiendo diferencias significativas entre ellas.

SUMMARY

This thesis studied the amount of pollen of Chilean hazelnut (*Gevuina avellana* Mol.) carried by pollinating insects and its viability. Pollen samples were obtained from the three main visiting insects; *Apis mellifera* L., *Vespula germanica* Fabr., and *Corynura chloris* Spin. Pollen-load was extracted from these insects and identified. Pollen viability was tested using Alexander's procedure and paraferilendiamine dye. Also, pollen germinability was assessed *in vitro* following Brewacker and Kwack. The amount of Chilean hazelnut pollen carried by these insects is high; *A. mellifera*, 99.33%, *V. germanica*, 99.73% and *C. chloris*, 98.04%. Also, the viability of this pollen is high, 99.35% to 99.95% using Alexander's and paraferilediamine procedure respectively. Pollen viability by insects species was 99.82% in *A. mellifera*, 99.95% in *V. gemanica* and 99.17% in *C. chloris*. Neither pollen viability nor viability were significantly different. Pollen germinability was 9.65% in *A. mellifera*, 7.88% in *V. germanica* and 7.41% in *C. chloris*, none of them significantly different. Overall, pollen germinability was 8.3%.

7 BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER, M. P. 1980. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. *Stain Technolgy (USA)*. 55(1): 13-18.
- AUSPURGER, C. 1980. Mass - flowering of a tropical shrub (*Hybanthus runifolius*) : influence on pollinator attraction and movement. *Evolution (USA)*. 34: 475-478.
- BAEZ, P. A . 1998. Análisis fisiológico y morfológico de los granos de polen en cuatro especies del género *Nothofagus*. Tesis Lic Ciencias Biológicas. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias. 79 p.
- BREWBAKER, J.L. y KWAK B. H. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany (USA)*. 50:859-865.
- CARDENAS, C. 1998. Aspectos de la morfología floral, producción de néctar y fructificación en *Berberis darwinii* Hook., *Aristotelia chilensis* (Mol) Stuntz y *Ugni molinae* Turcz. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 111p.
- CASTRO, J. BARRALES, L. y PEÑA, I. 1999. Efecto de la temperatura y tiempo de incubación en la germinación del polen *in vitro* de cinco cultivares de almendro (*Prunus dulcis* Mill.). *Ciencia e Investigación Agraria (Chile)*. 26:61-66.

- DAVIS, A. 1997. Pollination efficiency of insects. In: Shivana, K. y Sawhney, V. (eds.). Pollen Biotechnology for Crops Production and Improvement. Cambridge. University Press. pp:87-111.
- DEMEKE, H. y HUGHES, H. 1991. Germination and storage of pollen of *Phytolacca doceccandra* L. Botany (USA).68:13-15.
- DONOSO, C. 1978. Avance de investigación "Antecedentes sobre producción de avellanas". Bosque (Chile). 2 (2): 105-109.
- DONOSO, C. y ESCOBAR, R. 1986. Germinación de las proteáceas arbóreas chilenas. Bosque (Chile). 7(2): 85-94.
- DONOSO, C. ; CORTES, B. y ESCOBAR, R. 1992. Técnicas de vivero y plantación para avellano (*Gevuina avellana* Mol.). Chile Forestal. Documento técnico N° 63. Conaf. 7p.
- DONOSO, C. 1997. Guía de reconocimiento de Arboles Nativos de Chile. Marisa Cúneo. Valdivia, Chile. 116p.
- EHRENDORFER, E. 1986. Sinopsis del reino vegetal. Ed: Strasburger, E. Tratado de Botánica. 7ª ed. Marin. Barcelona. pp . 623-886.
- FAEGRI, K y VAN DER PIJL, L. 1976. The Principles of Pollination Ecology. 2ª ed. Oxford, England. 291 p.
- FRANKEL, R. y GALUN, E. 1977. Pollination Mechanisms, Reproduction and Plant Breeding. Springer - Verlag, Berlin Heidelberg. New York, USA. 281 p.

- FREE, J. y WILLIAMS, I. 1977. The pollination of crops by bees. Apimondia - International Bee Research Association. Bucharest, Rumania . 14 p.
- FREE, J. 1993. Insect pollination crops. 2^a ed. Academic Press, London, England. 652 p.
- GRINBERGS, J; VALENZUELA, E. y CONTRERAS, D. 1986. Raíces proteiformes en la flora chilena. Archivos de Biología y Medicina Experimental (Chile). 19 (2): 210- 219.
- HALLOY, S.; GRAU, A. y MCKENZIE, B. 1996. Gevuina nut (*Gevuina avellana*. Proteaceae), a cool climate alternative to Macadamia. Economy of Botany (USA). 50(2): 224 – 235.
- HALLOY, S. 1993. Gevuina nut – a cool climate macadamia. <[http://WWW.crop.cri. nz./broadshe/gevuina. html](http://WWW.crop.cri.nz./broadshe/gevuina.html)> (4 septiembre 1999).
- HARDER, L. y BARRET, F. 1983. Flower handling efficiency of bumblebees: morphological aspect of probing time. Oecologia (Alemania). 54: 274.
- HAUSER, E. y MORRISON, J. 1964. The citochemical and analize of pollen viability. American Journal of Botany (USA). 51(7): 748-752.
- HERRERA, C. 1995. Microclimate and individual variation in pollinators flowering plants are more than their flowers. Ecology (USA) 76 (5): 1516 - 1524.

- HOFFMANN, A. 1982. Flora silvestre de Chile. Arboles, arbustos y enredaderas leñosas. Fundación Claudio Gay. Santiago. 258 p.
- HOOPINGARNER, J. y WALLER, G. 1993. Crop pollination. In. Graham, J. (ed). The hive and the honey bee. Dadant e Hijos. Hamilton, Illinois, USA. pp. 1083-1087.
- HUAMAN, Z. 1995. Técnicas citológicas para determinar el número cromosómico y la fertilidad de las papas. Guía de investigación. CIP (Perú) Circular 10:30.
- HUMAÑA, A. y RIVEROS, M. 1994. Biología de la reproducción en la especie trepadora *Lapagerea rosea* R. et. P. (Philesiaceae). Gayana Botánica (Chile) 51 (2): 49 -55.
- INSTITUTO TECNOLOGICO DE CHILE. 1982. Recolección e industrialización de la avellana chilena. Santiago, Chile. 87 p.
- JAY, S. 1986. Spatial management of honeybees on crops. Annual Review of Entomology (USA) . 31: 49-65.
- JOHRI, B. y VASIL, I. 1961. Factor affecting viability of pollen in storage. In. Stanley y Linskens (eds.). Pollen Biology, Biochemistry Management. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. New York, USA. 307 p.
- KEARNS, C. e INOUYE, D. 1993. Techniques for Pollination Biologist. University Press of Colorado. USA. 583 p.

- KEVAN, P. y BAKER, H. 1983. Insect as flower visitors and pollinators. Annual Review Entomology (USA). 28: 407 – 453.
- LINSKENS, H. F. 1964. Pollen physiology. Anu. Rev. Physiology. 15: 255-270.
- LOBOS, A. 1987. Avellano chileno. Investigación y progreso agropecuario Carillanca. Temuco, Chile N°2: pp. 12-16.
- LOVERA, J. 1999. Aspectos de la biología reproductiva del cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) cv. Pilgrim y entomofauna asociada a sus flores. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 110p.
- LYM, D. F. 1991. Evaluación en la madurez del polen y receptividad estigmática en tres líneas hembras de pimentón (*Capsicum annuum*). Tesis Lic. Agr. Quillota. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía. 113 p.
- Mc GREGOR, S. 1976. Insect pollinators of cultivated crop plants. Department of Agriculture United States. Washington. 441p.
- MEDEL, F. 1987. Árboles frutales. Situación y potencial en el sur de Chile. Corporación de Fomento de la Producción. Santiago, Chile 59 p.

- NEIRA, C. M. 1993. Agentes polinizantes en cultivos no tradicionales. In: Barriga, P. y Neira, M. (eds). Avances en producción y sanidad vegetal. Cultivos no tradicionales. Facultad de Ciencias Agrarias. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. U. Austral de Chile. pp. 279-301.
- NISSEN, J. y BARRIA, J. 1976. Estudio Agrológico del predio "Vista Alegre". Instituto de Ingenieria Agraria y Suelos. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 34p.
- NUUESTRA TIERRA. 1993. El Avellano, un árbol desaprovechado. Nuestra Tierra (Chile).167:30-33.
- O' NEILL, S. 1997. Pollination regulation of flower development. Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology (USA). 48: 547-574.
- PORTA, N. y ROSELLI, G. 1991. Relationship between pollen germination *in vitro* and fluorochromatic reaction in cherry clone F(121)(*Prunus avium* L.) and some of its mutans. Journal of Horticultural Science (USA). 66(2):171-175.
- RALLO, G. 1986. Frutales y abejas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. 281p.
- RAMIREZ, C. 1988. Ordenación ecológica de las proteáceas nativas de los ñadis del centro – sur de Chile. Ed: V Reunión Botánica de Valparaíso, Chile. 63pp.

- RATHCKE, B. 1983. Competition and facilitation among plants for pollination. In: Real, L. (ed.). Pollination Biology. Academic Press. New York. pp. 305-329.
- RODRIGUEZ- RIANO, T. y DAFNI, A. 2000. A new procedure to asses pollen viability. Sex. Plant. Reprod. (Alemania). 12: 241-244.
- ROOT, L. 1976. ABC y XYZ de la apicultura. Enciclopedia científica y práctica de abejas. Librería Hachette. Buenos Aires, Argentina. 670p.
- SCHOONHOVEN, R.; JERMY, T. y VAN LOON, J. 1998. Insect - Plant Biology: from physiology to evolution. Chapman & Hall. London, England. 409 p.
- SHIVANNA, K. R. y RANSGASWAMY, N. S. 1992. Pollen Biology. A laboratory Manual. Springer – Verlag, Berlin Heidelberg. 119 p.
- SINGH, R. L. 1993 Plant cytogenetic. Boca Raton CRC. USA. 391 p.
- SOTOMAYOR, O. 2000. Evaluación de la entomofauna asociada a flores de murta (*Ugni molinae* Turcz.). Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 114 p.
- STANLEY, R. G. y LINKENS, H. F. 1974. Pollen Biology. Springer Verlag. Berlin. 119 p.
- STEEL, R. y TORRIE, J. 1985. Bioestadística: Principios y Procedimientos. 2ª ed. Mc Graw - Hill. Latinoamericana S.A. Bogotá, Colombia. 621p.

STRASBURGER, E.; NOLL, F.; SCHENCK, H. y SHIMPER, F. 1986. Tratado de Botánica. 7ª ed. Marin. Barcelona, España. 1098p.

_____, E.; NOLL, F.; SCHENCK, H. y SHIMPER, F. 1994. Tratado de Botánica. 8ª ed. Marin. Barcelona, España. 1068p.

TAPIA, C. 2000. Caracterización de la entomofauna asociada a flores de avellano chileno (*Gevuina avellana* Mol.), y algunos aspectos de su biología reproductiva. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 125 p.

VAZQUES, F. M. SUAREZ, M. A. y BASELGA, M. P. 1996. Nota sobre el efecto de la temperatura y humedad en la germinación *in vitro* del grano de polen en *Q. rotundifolia* Lam. y *Q. suber* L. Investigación Agraria, Sistemas y recursos forestales (España). 5(2): 351-359.

VIZCARRA, R. 1999. Comportamiento de insectos asociados a las flores de frambueso (*Rubus idaeus* L.), en relación a su actividad como agentes bióticos de polinización. Tesis Lic. Cs. Biol. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias. 92p.

WESTWOOD, M. 1982. Fruticultura en zonas templadas. Mundi-prensa. Madrid, España. 461p.

ANEXOS

ANEXO 1. Cantidad y porcentajes de polen de avellano chileno (*Gevuina avellana* Mol.) y otras especies colectadas sobre el cuerpo de los insectos analizados.

Insectos	Nº de polen avellano	Nº de polen de otras especies	Polen de avellano (%)	Polen de otras especies (%)
<i>A. mellifera</i>	13362	90	99,33	0,67
<i>V. germanica</i>	2841	121	95,73	4,27
<i>C. chloris</i>	662	13	98,04	1,96
TOTAL	16865	224	98,67	1,33

ANEXO 2. Porcentaje de germinación de los granos de polen de avellano presente en el cuerpo de cada insecto.

Especie	N° de polen germinado	N° de polen no germinado	% germinación
<i>A. mellifera</i>	4	20	16,7
<i>A. mellifera</i>	0	7	0
<i>A. mellifera</i>	2	5	28,6
<i>A. mellifera</i>	1	7	12,5
<i>A. mellifera</i>	1	9	10
<i>A. mellifera</i>	2	12	14,3
<i>A. mellifera</i>	0	5	0
<i>A. mellifera</i>	0	6	0
<i>A. mellifera</i>	4	23	14,8
<i>A. mellifera</i>	1	12	7,7
<i>A. mellifera</i>	1	7	12,5
<i>A. mellifera</i>	2	8	20
<i>A. mellifera</i>	8	50	13,8
<i>A. mellifera</i>	1	11	8,3
<i>A. mellifera</i>	3	43	6,5
<i>A. mellifera</i>	7	44	13,7
<i>A. mellifera</i>	0	15	0
<i>A. mellifera</i>	3	15	16,7
<i>A. mellifera</i>	1	13	7,1
<i>A. mellifera</i>	0	5	0
<i>A. mellifera</i>	0	11	0
<i>A. mellifera</i>	0	4	0
<i>A. mellifera</i>	3	11	21,4
<i>A. mellifera</i>	1	12	7,7
<i>A. mellifera</i>	0	10	0
<i>A. mellifera</i>	8	45	15,1
<i>A. mellifera</i>	9	60	13
<i>A. mellifera</i>	2	15	11,8
<i>A. mellifera</i>	3	32	8,6
<i>A. mellifera</i>	1	16	5,9
<i>A. mellifera</i>	2	15	11,8
<i>A. mellifera</i>	0	8	0

(Continua)

(Continuación Anexo 2)

<i>A. mellifera</i>	1	12	7,7
<i>A. mellifera</i>	3	20	13
<i>A. mellifera</i>	4	27	12,9
<i>A. mellifera</i>	3	18	14,3
<i>A. mellifera</i>	4	20	16,7
<i>A. mellifera</i>	1	5	16,7
<i>A. mellifera</i>	2	15	11,8
<i>A. mellifera</i>	2	11	15,4
<i>A. mellifera</i>	0	5	0
<i>A. mellifera</i>	2	46	4,2
<i>A. mellifera</i>	1	17	5,6
<i>A. mellifera</i>	2	23	8
<i>V. germanica</i>	1	4	20
<i>V. germanica</i>	1	7	12,5
<i>V. germanica</i>	2	20	9,1
<i>V. germanica</i>	0	4	0
<i>V. germanica</i>	0	5	0
<i>V. germanica</i>	1	6	14,3
<i>V. germanica</i>	7	55	11,3
<i>V. germanica</i>	0	2	0
<i>V. germanica</i>	0	3	0
<i>V. germanica</i>	9	61	12,9
<i>V. germanica</i>	0	16	0
<i>V. germanica</i>	3	35	7,9
<i>V. germanica</i>	1	10	9,1
<i>V. germanica</i>	2	15	11,8
<i>V. germanica</i>	0	8	0
<i>V. germanica</i>	3	13	18,8
<i>V. germanica</i>	0	5	0
<i>V. germanica</i>	1	6	14,3
<i>V. germanica</i>	1	13	7,1
<i>V. germanica</i>	1	6	14,3
<i>V. germanica</i>	2	10	16,7
<i>V. germanica</i>	3	27	10
<i>V. germanica</i>	0	3	0
<i>V. germanica</i>	0	23	0

(Continua)

(Continuación Anexo 2)

<i>V. germanica</i>	0	3	0
<i>V. germanica</i>	0	4	0
<i>V. germanica</i>	3	28	9,7
<i>V. germanica</i>	1	10	9,1
<i>V. germanica</i>	6	66	8,3
<i>V. germanica</i>	0	10	0
<i>V. germanica</i>	3	31	8,8
<i>V. germanica</i>	2	23	8
<i>V. germanica</i>	0	5	0
<i>V. germanica</i>	0	12	0
<i>V. germanica</i>	1	4	20
<i>V. germanica</i>	4	41	8,9
<i>V. germanica</i>	0	4	0
<i>V. germanica</i>	3	25	10,7
<i>V. germanica</i>	1	5	16,7
<i>V. germanica</i>	1	7	12,5
<i>V. germanica</i>	1	8	11,1
<i>V. germanica</i>	2	6	25
<i>V. germanica</i>	0	7	0
<i>V. germanica</i>	3	34	8,1
<i>C. chloris</i>	3	20	13
<i>C. chloris</i>	1	7	12,5
<i>C. chloris</i>	0	2	0
<i>C. chloris</i>	1	5	16,7
<i>C. chloris</i>	3	13	18,8
<i>C. chloris</i>	8	55	12,7
<i>C. chloris</i>	0	3	0
<i>C. chloris</i>	1	15	6,3
<i>C. chloris</i>	0	2	0
<i>C. chloris</i>	2	17	10,5
<i>C. chloris</i>	3	32	8,6
<i>C. chloris</i>	2	15	11,8
<i>C. chloris</i>	1	8	11,1
<i>C. chloris</i>	0	3	0
<i>C. chloris</i>	1	3	25
<i>C. chloris</i>	0	6	0

(Continua)

ANEXO 3. Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de los granos de polen de avellano presente en el cuerpo de cada insecto.

Fuente de variación	SC	GL	CM	F calculado
Insectos	122,423	2	61,2114	0,3607
Error	7682,38	129	59,5533	
Total (corregido)	7804,8	131		

* Indican diferencias significativas al 5%.

ANEXO 4. Prueba de Tukey para el porcentaje de germinación de los granos de polen de avellano presente en el cuerpo de cada insecto.

Método Tukey HSD 95%

Especie	N	Promedio	Grupos homogéneos
<i>A. mellifera</i>	44	9,64968	a
<i>C. chloris</i>	44	7,41293	a
<i>V. germanica</i>	44	7,8823	a

* Letras distintas indican diferencias significativas al 5%.

(Continuación Anexo 5)

<i>A. mellifera</i>	Alexander	100.000
<i>A. mellifera</i>	Alexander	100.000
<i>A. mellifera</i>	Alexander	100.000
<i>A. mellifera</i>	Alexander	100.000
<i>A. mellifera</i>	Alexander	100.000
<i>A. mellifera</i>	Alexander	100.000
<i>A. mellifera</i>	Alexander	100.000
<i>A. mellifera</i>	Alexander	100.000
<i>A. mellifera</i>	Alexander	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	97.727
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	95.652
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000
<i>A. mellifera</i>	PDFA	100.000

(Continua)

ANEXO 7. Prueba de Tukey para el porcentaje de viabilidad entre especies de insectos.

Método Tukey HSD 95%

Especie	N	Promedio	Grupos homogéneos
<i>A. mellifera</i>	88	99,8182	a*
<i>C. chloris</i>	88	99,1742	a
<i>V. germanica</i>	88	99,9513	a

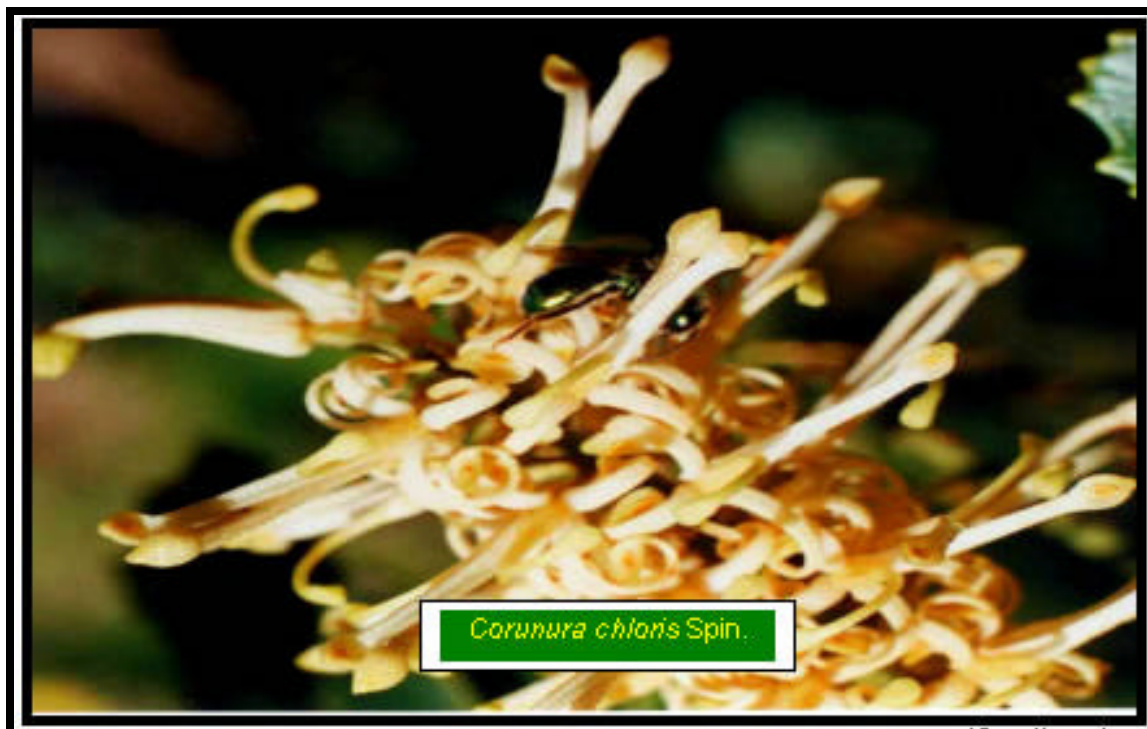
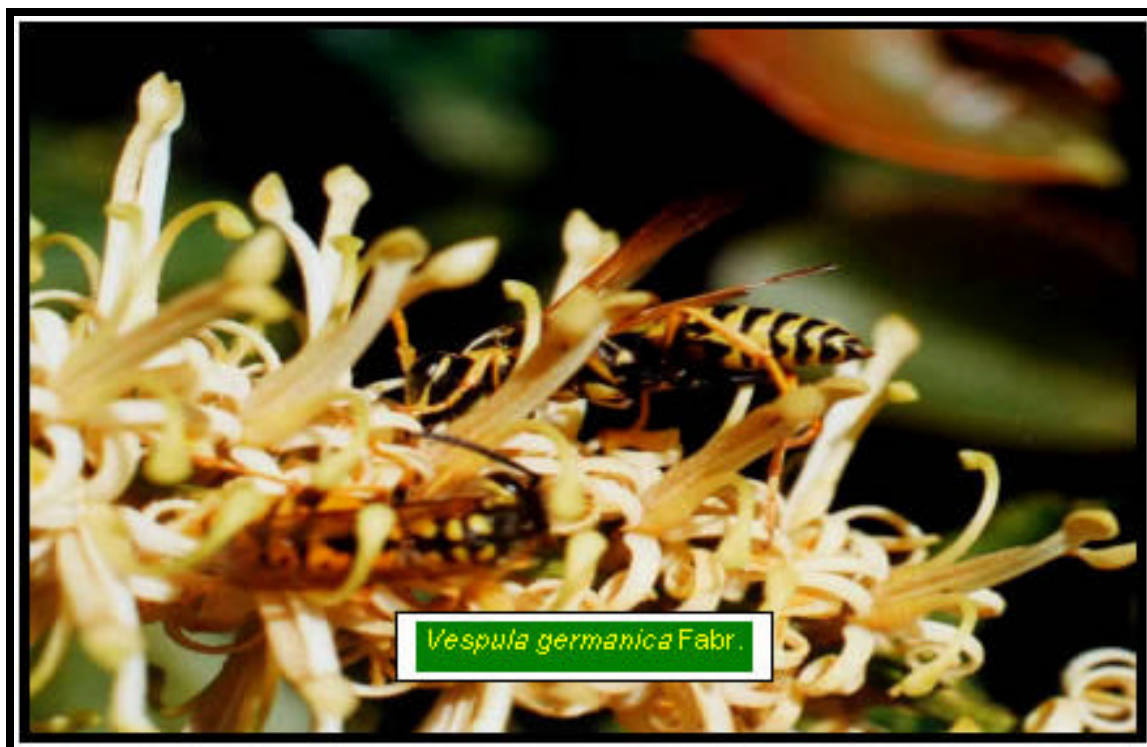
* Letras iguales indican que no existen diferencias significativas al 5%.

ANEXO 8. Prueba de Tukey para el porcentaje de viabilidad entre productos aplicados.

Método Tukey HSD 95%

Tinción	N	Promedio	Grupos homogéneos
Alexander	132	99,3458	a*
PDFA	132	99,9498	a

* Letras iguales indican que no existen diferencias significativas al 5%.

ANEXO 9. Insectos visitantes del avellano (*Gevuina avellana* Mol.)

(Continua)

(Continuación Anexo 9)

