

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMIA

**Evaluación de la viabilidad y germinabilidad del polen del
cultivar Du Chilly y de la selección clonal Santa Rosa de
Avellano europeo (*Corylus avellana* L.).**

Tesis presentada como parte
de los requisitos para optar al
grado de Ingeniero
Agrónomo.

CAROLINA ARAGÓN GUAJARDO

VALDIVIA-CHILE

2006

PROFESOR PATROCINANTE:

Magaly Riveros G.
Prof. Biología y Química, Dr. en Ciencias

PROFESORES INFORMANTES:

Andrea Báez M.
Dr. (c) Economía Aplicada

Miguel Neira C.
Ing. Agr.

AGRADECIMIENTOS.

Quisiera agradecer a la Dra Magaly Rivero, prof. patrocinante en este estudio, ya que sin su ayuda no hubiera sido posible consumir esta tesis. Prof. Griselda Iturra, Secretaria adm. Pamela Arancibia y Asist. de laboratorio Don Víctor Martínez.

Además, quisiera agradecer al Dr. Ricardo Riegel y Prof. Ricardo Fuentes, a quienes innumerables veces acudí en busca de ayuda.

Imposible olvidar a la Tante, María Luisa y “Vitoco”, por todos los consejos, largas conversaciones y todos los favores que me brindaron.

Por último aquellos que en un principio fueron compañeros y con el paso del tiempo se transformaron en los mejores amigos y “colegas” que cualquiera lejos de su hogar desearía haber tenido a su lado, Loreto Saldivia, Carolina Zambrano, Daniela Rosas, Elisa Garcés, Danitza Abarzúa, Claudia Bahamondes, Daniel Zamorano, Pablo Díaz, Gemelos Pérez Díaz, Christian Alvarado.

A las familias, Rosas Bórquez, Saldivia Saravia, quienes me recibieron como una hija, hermana y hasta “prima”.

A Felipe, “...con mis dos manos...” la felicidad se puede alcanzar.

A mi madre y hermanos Juan Pablo, Loreto y Dayám, mis sobrinos, Maximiliano y Victoria, mi abuela y a la Sra. Rosa Villanueva.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Antecedentes generales	3
2.1.1	Descripción	3
2.1.2	Clasificación botánica	4
2.1.3	Distribución geográfica	5
2.2	Importancia y usos	6
2.2.1	Producción mundial	7
2.2.2	Producción nacional	7
2.3	Condiciones edafoclimáticas para el cultivo de <i>Corylus avellana</i> L.	8
2.4	Malezas	9
2.5	Plagas y enfermedades	9
2.5.1	Plagas	10
2.5.2	Enfermedades	11
2.6	Cosecha y post cosecha de la avellana	13
2.7	Sistema reproductivo del <i>Corylus avellana</i> L.	15
2.7.1	Morfología de la flor	16
2.7.1.1	Flor femenina	17
2.7.1.2	Flor masculina	17
2.7.1.3	Floración	18

2.7.2	Polen	18
2.7.2.1	Descripción del grano de polen de <i>C. avellana</i> L.	19
2.7.2.2	Formación del grano de polen	19
2.7.2.3	Germinación del grano de polen y fecundación de la ovocélula	20
2.8	Terminología utilizada	21
2.8.1	Viabilidad polínica	22
2.8.2	Longevidad del grano de polen	23
2.8.3	Germinabilidad polínica	23
2.9	Factores que afectan la viabilidad y longevidad polínica	24
2.9.1	Almacenamiento de los granos de polen	26
2.9.2	Humedad relativa	27
2.9.3	Temperatura	27
2.9.4	Gas atmosférico	28
2.10	Métodos para determinar la viabilidad polínica	28
2.10.1	Germinación <i>in vivo</i>	30
2.10.2	Germinación <i>in vitro</i>	30
2.10.3	Tinción diferencial de “Alexander”	32
2.10.4	Indicador de peroxidasa (parafenilendiamina)	32
2.10.5	Reacción de diacetato de fluoresceína (FCR)	32
3	MATERIAL Y METODO	33
3.1	Material	33
3.1.1	Lugar de recolección	33
3.1.1.1	Caracterización climática	33
3.1.2	Material vegetal	34
3.1.3	Materiales e instrumentos utilizados en campo	34
3.1.4	Materiales de laboratorio	34
3.2	Periodo de análisis	35
3.3	Método	35

3.3.1	Determinación del porcentaje de viabilidad polínica	35
3.3.2	Determinación del porcentaje de viabilidad polínica través del tiempo de almacenaje	36
3.3.3	Determinación de la germinabilidad polínica a través del tiempo de almacenaje	37
3.3.4	Evaluación de la llegada de polen a la superficie del estigma	39
3.4	Análisis estadístico	40
4	PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	42
4.1	Viabilidad actual del polen recolectado del cultivar Du Chilly y de la selección clonal Santa Rosa de <i>Corylus avellana</i> L.	42
4.2	Determinación de la viabilidad polínica del cultivar Du Chilly y de la selección clonal Santa Rosa, <i>C. avellana</i> L., a través del tiempo de almacenaje	50
4.3	Determinación de la germinabilidad polínica del cultivar Du Chilly y de la selección clonal Santa Rosa, <i>C. avellana</i> L., a través del tiempo de almacenaje	55
4.4	Llegada de polen al estigma de la flor	63
5	CONCLUSIONES	69
6	RESUMEN	71
	SUMARY	73
7	BIBLIOGRAFÍA	75
	ANEXOS	83

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Terminología utilizada en viabilidad del polen.	24
2	Efecto de los potreros (1, 2 y 3), cultivares (Du Chilly y selección clonal Santa Rosa) e interacción potrero-cultivar en la viabilidad polínica de <i>C. avellana</i> L.	43
3	Análisis de suelos de los potreros 1, 2 y 3	44
4	Participación de los árboles muestreados en los potreros 1, 2 y 3 para selección clonal Santa Rosa y cultivar Du Chilly, por categoría	49
5	Efecto de los potreros (1, 2 y 3), los cultivares (Du Chilly y selección clonal Santa Rosa), categorías (I, II, III, y IV) y tiempo de almacenaje sobre el porcentaje de viabilidad de los granos de polen de <i>C. avellana</i> L.	51
6	Efecto de los potreros (1, 2 y 3), los cultivares (Du Chilly y selección clonal Santa Rosa), categorías (I, II, III, y IV) y del tiempo de almacenaje sobre el porcentaje de germinación de los granos de polen de <i>C. avellana</i> L.	56
7	Medias de granos de polen presentes en el estigma, estilo, libre y extraño (de otra especie), para el cultivar Du Chilly y la selección clonal Santa Rosa, <i>C. avellana</i> L.	64

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructuras reproductivas y frutos de <i>Corylus avellana</i> L.	4
2	Grano de polen de <i>C. avellana</i> L.	19
3	Factores que afectan la viabilidad del grano de polen	25
4	Efecto de los potreros (1, 2 y 3), sobre el porcentaje de viabilidad del polen de <i>C. avellana</i> L., (Tukey 95%)	46
5	Efecto de la interacción potrero-cultivar en el porcentaje de viabilidad del polen de <i>C. avellana</i> L., (Tukey 95%)	48
6	Efecto de las categorías (I, II, III y IV), sobre el porcentaje de viabilidad del polen, a través del tiempo de almacenaje, en polen de <i>C. avellana</i> L., (Tukey 95%)	52
7	Viabilidad del polen de la selección clonal Santa Rosa, <i>C. avellana</i> L., a través del tiempo de almacenaje	53
8	Viabilidad del polen del cultivar Du Chilly, <i>C. avellana</i> L., a través del tiempo de almacenaje	54
9	Efecto de las categorías (I, II, III y IV), sobre el porcentaje de germinación <i>in vitro</i> , a través del tiempo de almacenaje en polen de <i>C. avellana</i> L., (Tukey 95%)	57
10	Germinación del polen de la selección clonal Santa Rosa, a través del tiempo de almacenaje	59
11	Germinación del polen del cultivar Du Chilly, a través del tiempo de almacenaje	60
12	Disposición actual de los árboles de <i>C. avellana</i> L. y propuesta.	65
13	Distribución de los granos de polen de <i>C. avellana</i> L., en la	

superficie de la flor

68

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Valor nutricional de la avellana por 100 g de materia seca	84
2	Producción de avellanas año 2001 para los principales países productores	84
3	Estimadores climáticos para el avellano europeo	85
4	Estimadores edáficos para el avellano europeo	85
5	Resumen de plagas y enfermedades que afectan a <i>C. avellana</i> L.	86
6	Esquema del predio desde el cual se extrajeron las muestras de polen de la selección clonal Santa Rosa y del cultivar Du Chilly, <i>C. avellana</i> L.	89
7	Composición de los reactivos de tinción con p-fenilendiamina, lactofenol, medio de cultivo Brewbaker y Kwack y medio nutritivo Brewbaker y Kwack modificado	90
8	Pasos a seguir en la aplicación de la metodología de RODRIGUEZ-RIANO y DAFNI (2000), usada para la tinción con p-fenilendiamina	92
9	Pasos a seguir en la aplicación de la metodología KEARNS e INOUYE (1993), usada para la determinación de porcentaje de germinación	93
10	Árboles muestreados de la selección clonal Santa rosa y el cultivar Du Chilly de <i>C. avellana</i> L., para cada uno de los potreros (1, 2 y 3)	94
11	Tablas con los valores obtenidos de la medición inicial de	

	viabilidad del polen de <i>C. avellana</i> L., selección clonal Santa Rosa en los potreros 1, 2 y 3	94
12	Tablas con los valores obtenidos de la medición inicial de viabilidad del polen de <i>C. avellana</i> L., cultivar Du Chilly en los potreros 1, 2 y 3	100
13	Análisis de varianza para los porcentajes de viabilidad polínica de los árboles muestreados del cultivar Du Chilly y de la selección clonal Santa Rosa de <i>C. avellana</i> L.	105
14	Tests de Rangos Múltiples para el porcentaje de viabilidad por potrero (Tukey 95%)	105
15	Manejo de fertilización anual para los potreros 1, 2 y 3	106
16	Medias de granos de polen viables, no viables y abortados de la evaluación inicial de <i>C. avellana</i> L.	107
17	Tabla con las mediciones realizadas para el tiempo 1 (15 de agosto 2004) de la viabilidad del polen de <i>C. avellana</i> L., selección clonal Santa Rosa y cultivar Du Chilly	107
18	Tabla con las mediciones realizadas para el tiempo 2 (15 de septiembre 2004) de la viabilidad del polen de <i>C. avellana</i> L., selección clonal Santa Rosa y cultivar Du Chilly	108
19	Tabla con las mediciones realizadas para el tiempo 3 (13 de noviembre 2004) de la viabilidad del polen de <i>C. avellana</i> L., selección clonal Santa Rosa y cultivar Du Chilly	108
20	Tabla con las mediciones realizadas para el tiempo 4 (12 de enero 2005) de la viabilidad del polen de <i>C. avellana</i> L., selección clonal Santa Rosa y cultivar Du Chilly	109
21	Análisis de covarianza para los porcentajes de viabilidad polínica de las categorías del cultivar Du Chilly y de la selección clonal Santa Rosa de <i>C. avellana</i> L., a través del tiempo de almacenaje	109
22	Tests de Rangos Múltiples para el porcentaje de viabilidad por	

	categoría, a través del tiempo de almacenaje (Tukey 95%)	110
23	Viabilidad del polen de <i>C. avellana</i> L., selección clonal Santa Rosa y cultivar Du Chilly, a través del tiempo de almacenaje	110
24	Germinación del polen de <i>C. avellana</i> L., selección clonal Santa Rosa y cultivar Du Chilly, a través del tiempo de almacenaje	111
25	Análisis de covarianza para los porcentajes de germinación polínica de los categorías del cultivar Du Chilly y de la selección clonal Santa Rosa, <i>Corylus avellana</i> L., a través del tiempo de almacenaje	111
26	Tests de Rangos Múltiples para el porcentaje de germinación por categoría, a través del tiempo de almacenaje (Tukey 95%)	112
27	Participación de los granos de polen abortado de las categorías evaluadas en los análisis de viabilidad, por medio del test de tinción con p-fenilendiamina	112
28	Valores obtenidos de los granos de polen cuantificados en el estigma, estilo, libre y extraño (de otra especie), para el cultivar Du Chilly y la selección clonal Santa Rosa, <i>C. avellana</i> L.	113

1 INTRODUCCION

El origen del avellano europeo (*Corylus avellana* L.) es Asia Menor, lugar desde donde fue importado por los Griegos quienes lo cultivaban. En España, el cultivo del avellano europeo se expandió rápidamente, debido al ataque que sufrieron las viñas del país a mediados del siglo IX y a la importancia que hasta entonces habían adquirido algunas regiones en la comercialización de frutos secos.

A Chile se cree que la especie llegó con los españoles comenzando su cultivo en forma comercial hacia la década de los 90. En Chile, también existe la especie *Gevuina avellana* Mol, nativa y completamente distinta de la avellana europea.

Corylus avellana L., es una especie anemófila con un sistema reproductivo autoincompatible. Es una planta caducifolia cuya floración, previa a la emergencia foliar, comienza a mediados de invierno y pese a que las condiciones climáticas no son las óptimas para una especie de polinización anemófila, en la zona existen especies nativas con el mismo sistema de polinización como el *Nothofagus*.

El proceso de polinización en *C. avellana* L., se presenta con mucha antelación a la doble fecundación, característica poco frecuente en las Angiospermas (en las Gimnospermas es más común), ya que en ellas la polinización y la fecundación se suceden una tras otra abarcando 48-72 horas.

Dada estas características reproductivas, es indispensable conocer y evaluar la viabilidad del grano de polen y su duración para comprobar si el proceso reproductivo se efectúa exitosamente, ya que no es suficiente que el grano de polen esté viable o vivo, sino que es indispensable que presente vigor para finalmente producir la fecundación. Además, en los huertos frutales de esta especie es común la utilización de cultivares polinizantes. Se plantea como hipótesis que la llegada de polen a la superficie del estigma es abundante y que el polen es suficientemente vigoroso para germinar.

El objetivo general es:

Determinar la cantidad de granos de polen que llegan a la superficie del estigma y cuantificar su capacidad de germinación.

Los objetivos específicos son:

Determinar la viabilidad inicial del polen recolectado.

Evaluar la viabilidad del polen a través del tiempo (días) de almacenaje.

Evaluar la capacidad germinativa del polen recolectado a través del tiempo (días) de almacenaje.

Cuantificar los granos de polen en la superficie del estigma.

2 REVISION BIBILOGRAFICA

2.1 Antecedentes generales de la especie

El epíteto específico avellana, deriva según Andrés Laguna de la ciudad de Avellana en Campania, donde pareciera que estas plantas se cultivaban en abundancia (INFOAGRO, 2005).

El área de distribución del avellano europeo es eurosiberiana, encontrándose entre bosques caducifolios de Europa, principalmente en la zona norte de España en las localidades de Pirineos, Asturias, Santander, Sistema Ibérico, Maestrazgo, etc. Se ubica en laderas, fondo de valles fluviales, en sitios frescos y sombríos no más allá de los 1.500 m.s.n.m. (VIÑAS, 2004).

2.1.1 Descripción. Este arbusto puede llegar a medir entre 2 a 5 metros de altura (Figura 1), presentando una copa extendida e irregular. Presenta un desarrollo de brotes muy ramificados que nacen a nivel del cuello de la raíz, los cuales son curvados si son viejos y erectos si son jóvenes (GRAU, 2003).

El sistema radical de esta especie es poco profundo, las raíces se presentan largas, nudosas y normalmente emiten vástagos desde las nudosidades (INIA, 2004).

Las hojas se caracterizan por ser grandes, alternas, ovales, pecioladas, rugosas, pilosas por el haz, de color verde amarillento y doblemente aserradas. El peciolo es muy corto y sus estípulas son oblongas, obtusas, verdes y caducas (GRAU, 2003).



FIGURA 1: Estructuras reproductivas y frutos de *Corylus avellana* L.

FUENTE: NORWEGIAN BOTANICAL ASSOCIATION, (2006) y PLANTYFOLIA, (2006).

El fruto del avellano es un aquenio con forma de copa partida cuyo pericarpio (cáscara) es óseo, la testa es lisa de color canela. Generalmente, envuelve una sola semilla (INIA, 2004). Las avellanas se encuentran generalmente agrupadas en racimo de 1 a 12, cada uno encerrado en su cubierta (VALENZUELA, *et. al.*, 2002).

2.1.2 Clasificación botánica. Según STRASBURGER *et. al.*, (1994) la clasificación botánica del avellano europeo es la siguiente:

Clase: Dicotyledonae (=Magnoliopsida, Magnoliópsidas), angiospermas dicotiledóneas.

Nivel de desarrollo: Apetalae (=Monochlamydeae), Apétalas (=Monoclamídeas).

Subclase: Hamameliidae (Hamamelididas).

Superorden: Hammamelidanae.

Orden: Fagales.

Familia: Betulaceae.

Género: *Corylus*.

La familia Betulaceae agrupa a 6 géneros y 150 especies. Presenta árboles o arbustos caducifolios, monoicos con hojas simples, alternas, enteras, glabras o pubescentes, con estípulas caedizas. Las flores estaminadas se encuentran reunidas en amentos, dispuestos en cimas trifloras en la axila de cada bráctea tectriz. Carecen de perianto o bien sólo poseen dos bractéolas, con 2 a 12 estambres, los cuales a menudo son bífidos. Las flores pistiladas se encuentran reunidas en inflorescencias glomerulares, dispuestas en cimas bifloras o trifloras en la axila de cada bráctea. Para el caso de los géneros *Carpinus* y *Corylus*, su fruto se ubica en la axila de una hoja bracteiforme formada por la soldadura de las bractéolas. Las semillas poseen un embrión recto de gran tamaño y carecen de endosperma (UNNE, s/f).

El avellano europeo de acuerdo con lo mencionado por GRAU (2003); TORRES (1994); VALENZUELA *et. al.*, (2001) es la única especie cultivable por sus frutos del género *Corylus*, el cual presenta alrededor de 15 especies la mayoría nativas de Norteamérica, Europa o Asia.

2.1.3 Distribución geográfica. En Chile, el avellano europeo se encuentra distribuido entre la VI a X Región (VALENZUELA *et. al.*, 2002) con un total de 116 hectáreas de huertos en formación y producción. Sin embargo, existen alrededor de 1.500 hectáreas que no se encuentran registradas en las estadísticas del año 1997 realizadas por el Instituto Nacional de Estadística (INE). Además, existen plantaciones comerciales en la provincia de Melipilla y Región Metropolitana (GRAU, 2003) y provincias de Valdivia y Osorno de la X Región (VALENZUELA *et. al.*, 2003).

2.2 Importancia y usos.

El fruto del avellano europeo desde tiempos remotos ha sido utilizado principalmente para la alimentación del hombre. Su consumo puede ser en fresco, tostado, frito, salado o bien integrando productos elaborados como el chocolate, turrone, mazapanes, helados, pasteles, bebidas, etc. (GRAU, 2003).

La avellana puede ser consumida en estado maduro o bien inmadura, en este estado inmaduro algunos países la consumen en ensaladas o bien pueden ser conservadas en salmuera y amortizadas en vinagre y hojas de laurel. De las avellanas maduras se extrae el aceite blanco utilizado en la alimentación, también como combustible y para la producción de jabones y cosméticos (GRAU, 2003). Por lo que los mercados potenciales para este fruto seco son la industria alimentaria y la de transformación (INFOAGRO, 2005).

Según GRAU (2003), el consumo de la avellana se recomienda para niños mayores de 6 años, para un periodo de elevadas exigencias nutritivas. Además de lípidos, proteínas y carbohidratos, las avellanas contienen una buena cantidad de sustancias minerales (Anexo 1) como hierro, calcio y fósforo que contribuyen al buen funcionamiento del organismo. El hierro, por ejemplo, influye en la multiplicación de los glóbulos rojos, por lo que las avellanas son prescritas en los casos de anemia. Por el contenido de calcio las avellanas son recomendadas en la alimentación de niños y jóvenes.

Cabe destacar que la utilización del fruto también abarca la cáscara, utilizada para combustión. Así como la corteza y las hojas ricas en taninos y astringentes, son utilizadas en medicina para detener hemorragias y elevar la presión sanguínea (INFOAGRO, 2005).

Los amentos se utilizan como sudoríficos, también como infusión o cocimiento. Las hojas secas y frescas se utilizan en la alimentación de ganado (INFOAGRO, 2005).

La madera a pesar de que arde bien genera poco calor. Debido a su elevada flexibilidad se utiliza en la elaboración de aros, jaulas, cestas, etc. Además, da un carbón combustible y liviano, que se empleaba para la elaboración de pólvora y acero. Y por último la ceniza resulta un buen abono (GRAU, 2003).

2.2.1 Producción mundial. La producción del avellano europeo para el año 2002 fue de aproximadamente 670.000 toneladas (T) con cáscara. El futuro económico de las avellanas se encuentra condicionado por las estrategias comerciales de Turquía (Anexo 2), que controla el 75% de la cosecha mundial. Italia es el segundo productor con el 17% de la producción mundial (exporta el 9,5%). A este le siguen Estados Unidos con el 4,1% y finalmente 2,1% de la producción mundial le corresponde a España que exporta el 2% de su producción (GRAU, 2001). La demanda comercial de la avellana a escala mundial se ha mantenido bastante estabilizada, tanto para usos industriales como, de mesa (INFOAGRO, 2005).

2.2.2 Producción nacional. En Chile, las producciones aún se encuentran en bajos volúmenes. Sin embargo, este cultivo presenta grandes ventajas respecto a otros frutales debido a su rusticidad, presentando una gran adaptación a diferentes condiciones edafoclimáticas, además de requerir pocas labores culturales (GRAU, 2003).

2.3 Condiciones edafoclimáticas para el cultivo de *Corylus avellana* L.

El avellano europeo es una planta de climas templados, a pesar de que presenta un área de distribución de Asia Septentrional pasa a Rusia, Austria, Alemania, Francia, España e Italia, lo cual es notable (INFOAGRO, 2005; GRAU, 2003).

En cuanto a los requerimientos de temperatura, en áreas excesivamente calurosas durante el verano se registra una falta de producción y daño foliar. Este mismo efecto se ha registrado en la V región, con un alto contenido de sales de calcio del suelo y del agua de riego (INIA, 2004).

INFOAGRO (2005), menciona que el avellano europeo es una planta que prefiere localidades aireadas con temperaturas elevadas sumado a un cierto grado de humedad, debido a que dichas condiciones favorecen la fructificación y el desarrollo de las avellanas. Temperaturas medias anuales de 12 a 16° C, con un mínimo de 700 horas de frío por debajo de los 7° C y temperaturas mínimas de invierno no menores que -8° C, son las adecuadas para este frutal (Anexo 3) (INFOAGRO, 2005; GRAU, 2003). Condiciones de -12° C en los meses de julio a agosto congelan las flores femeninas que florecen en dicha época. Las masculinas en cambio se congelan a temperaturas bajo los -9° C (INIA, 2004; TORRES, 1994).

De acuerdo a lo mencionado por INIA (2004), el área de cultivo más adecuada para este frutal en Chile es entre las regiones VII y X. Para la IV y V Región se ha demostrado por experiencias realizadas en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), que no son las más adecuadas para su cultivo comercial.

Respecto a los requerimientos de suelo (Anexo 4), se adapta bastante bien a casi todos los tipos de suelos, a excepción de aquellos que no tienen capacidad de retención de agua y son excesivamente compactos (BARON *et. al.*, 1995; GRAU, 2003). Los terrenos profundos, blandos, franco o franco-arcillosos y con subsuelo permeable, pH de 6 a 8 (también 5,5 y 6,2), son los que presentan las mejores condiciones para su desarrollo (GRAU, 2003).

Según INFOAGRO (2005), el avellano europeo puede ser plantado en lugares donde las heladas impidan el desarrollo de otros frutales, sin embargo localidades libres de heladas son más seguras. A lo que BARON *et. al.*, (1995); INIA (2004), agregan que a pesar de que las bajas temperaturas parecieran no afectar la floración y su rendimiento, heladas tardías de octubre disminuyen el número de yemas en el racimo y brotes suculentos. Las exigencias climáticas van a variar de acuerdo a los diferentes cultivares, ya que existen cultivares con mayor grado de adaptación que otros.

2.4 Malezas

Durante los 3 primeros años el suelo debe encontrarse limpio mediante labores culturales o control químico. Durante los primeros años los mayores problemas los constituyen las malezas perennes, ya que compiten con el huerto. Antes de preparar el suelo se deben identificar las malezas presentes y si existen malezas perennes se deben controlar con herbicida (glifosato o sulfosato) antes de que entren en receso (GRAU, 2003).

2.5 Plagas y enfermedades.

Según GRAU (2003), la mayoría de las enfermedades que atacan al avellano europeo (Anexo 5) no se encuentran presentes en Chile, lo cual presenta una ventaja comparativa ante otros países productores.

La detección oportuna de una plaga o enfermedad permite desarrollar técnicas de control exitosas o bien frenar su diseminación.

2.5.1 Plagas. Dentro de las plagas presentes en el país se citan:

a. *Aegorhinus superciliosus*, conocido como cabrito de los frutales pertenece a la familia Curculionidae orden Coleóptera. Ataca las raíces al estado larval llegando a producir la muerte del árbol. Los ataques a la parte aérea de la planta son casi imperceptibles (GRAU, 2003). Según INIA (2004), el cabrito de los frutales al afectar los tejidos conductores de las raíces provoca el debilitamiento de la planta reduciendo la producción.

INIA Quilamapu por medio de estudios ha elaborado un control biológico que se basa en el uso de organismos entomopatógenos los que permiten prevenir y/o controlar la plaga según cuando se controle (GRAU, 2003).

b. *Tettigades chilensis*, la chicharra es un insecto de importancia menor, no obstante en altos niveles poblacionales este insecto puede llegar a ocasionar graves daños en ramillas debido a la ovipostura que realizan en ellas. Daños de importancia se observan frecuentemente en huertos recién establecidos entre la VII y X Región (GRAU, 2003).

c. *Callisphyrus sp.* La sierra es un coleóptero cuyo nombre está dado por el tipo de daño que ocasiona. La larva de este insecto penetra las ramas formando galerías de 8,0 a 9,0 mm de diámetro, de trayectoria tendiente al eje de la rama. Las galerías formadas por este insecto ocasionan la caída de las ramas afectadas.

d. *Nezara viridula*, denominado chinche, es un hemíptero que ataca no solo al avellano europeo, sino también al avellano chileno (*Gevuina avellana* Mol). El

daño de éstos insectos es cuando atacan a los frutos desde su formación. Al picar el chinche provoca que de esta picadura salga un líquido oscuro que provoca pequeñas manchas irregulares y negruzcas bastante visibles. Si este ataque ocurre cuando la avellana tiene entre 7 y 8 mm, el tejido alrededor de la zona afectada necrosa, el fruto toma un sabor amargo y al momento de partirlo presenta manchas blanquecinas, parduscas y porosas. Esto se traduciría en pérdidas de peso y de calidad de la avellana (GRAU, 2003).

e. *Myzocallis corylii*, este pulgón se encuentra en estado adulto por el envés de las hojas y en las yemas donde se alimenta chupando jugos de las vías conductoras. Este tipo de ataque produce un debilitamiento general lo que se traduce en una disminución de la cosecha. En Chile, se encuentra en toda el área de cultivo del avellano europeo. Sin embargo, existen enemigos naturales que lo controlan eficazmente (GRAU, 2003).

2.5.2 Enfermedades. Dentro de las enfermedades presentes en el país se citan:

a. *Agrobacterium tumefaciens*, provoca la formación de agallas de las raíces y a veces en partes enterradas de los tallos de plantas de vivero. Existen datos que esta enfermedad va asociada a suelos con altos niveles de humedad, existiendo relación con aquellas plantas estresadas por asfixia radicular (GRAU, 2003).

b. *Armillaria mellea* y *Rosellinia necatrix* provocan la podredumbre radical, enfermedad muy difícil de erradicar de los árboles afectados. Suele encontrarse en depósitos de maderas y en terrenos donde ya existió alguna vez la enfermedad. Las plantas afectadas por el hongo presentan un desarrollo débil, hojas amarillentas y mustias, los brotes se desecan y la corteza de la raíz

muerta presenta unas estructuras en forma de hilos negros que corresponden a las estructuras de resistencia del hongo (GRAU, 2003).

c. *Phytophthora infestans*, el ataque de este hongo provoca pudrición de las raíces causando daños radiculares y del cuello de la planta. El ataque de este hongo se basa en la penetración del sistema vascular del árbol perdiendo su función de transportar agua y solutos. Los factores que predisponen a la planta a un ataque del hongo son: exceso de profundidad de plantación, suelo que cubra el cuello del árbol, exceso de riego, suelos muy húmedos, suelos muy compactados o con exceso de arcilla, etc. Por lo tanto, para prevenir la enfermedad se debe evitar el exceso de humedad producto de los riegos, no dejar suelo en contacto con el cuello del árbol y tener especial cuidado con aquellos suelos con una alta capacidad de retención de agua (GRAU, 2003).

d. *Xantomonas campestris* pv. *corylina*, esta bacteria ataca a todo el árbol ocasionando amarillez de las hojas que con el tiempo se caen al igual que las ramillas y provoca la muerte de yemas y brotes nuevos. Se pueden observar canchales especialmente en la zona de las yemas afectadas. Los frutos atacados presentan manchas café oscuro a negro, rodeadas por mancha acuosa. Estas lesiones preferentemente ocurren en los lados de la nuez, las lesiones de la parte basal son más superficiales e irregulares (GUERRERO y LOBOS, 1987).

Enfermedades producidas por desórdenes fisiológicos:

a. Avellanas vacías o con grano arrugado. Esta alteración fisiológica es una de las más graves del avellano, se caracteriza por un aborto seminal, polinización insuficiente o una alteración de la fecundación que se traduce en la ausencia del embrión (GRAU, 2003).

b. Manchas pardas. Esta enfermedad se manifiesta en frutos que han alcanzado la mitad o las dos terceras partes de su desarrollo, con la aparición de un líquido pardusco en la parte terminal de la avellana. Si este ataque es precoz, todo el fruto termina por descomponerse. Se cree que la causa de dicho desorden fisiológico son condiciones ambientales adversas en periodos críticos del desarrollo de las avellanas (GRAU, 2003).

c. Amentos y glomérulos en grupos. Esta enfermedad consiste en la agrupación de los amentos masculinos y femenino desde inicios de su formación lo cual termina en un amento no elongado completamente y sin producción de polen, necrosándose completamente antes del periodo de antesis. Se cree que la causa de dicho desorden se debe a estrés provocados por altas temperaturas al momento de la inducción floral (GRAU, 2003).

d. Amentos deformes. Estos amentos se deforman debido a un crecimiento anormal, produciendo un amento de mayor tamaño, con brácteas abiertas, que no producen polen y que finalmente se necrosan y caen. Este desorden también se encuentra asociado a altas temperaturas en la inducción floral, observándose con mayor frecuencia en los cultivares Barcelona (GRAU, 2003).

2.6 Cosecha y post cosecha de la avellana

Según GRAU (2003), existen dos tipos de cosecha: la cosecha en verde y la cosecha en seco.

La cosecha en verde consiste en cosechar la avellana encerrada en su involucro, lo que obliga cosecharla a mano directamente del árbol (GRAU, 2003).

La cosecha en seco consiste en recoger las avellanas una vez que se han desprendido del árbol. La caída de las avellanas puede durar entre 4 a 6 semanas dependiendo del cultivar. Luego de este tiempo las avellanas son recogidas en forma mecánica o manual (GRAU, 2003). Si se recogen en forma mecánica, primero se barre y forma una hilera de hojas y nueces, luego en cada una de las hilera se separan las nueces del resto de los elementos que le acompañan (BARON *et. al.*, 1997; INIA, 2004). De acuerdo al cultivar, los frutos caen sin o con involucre. Los frutos que caen primero no corren riesgo de deterioro (GRAU, 2003).

En cuanto a la conservación esta puede ser de forma tradicional colocando las avellanas a la sombra en una bodega aireada, siendo removidas con frecuencia. Después de esto a las avellanas se les retira el involucre y se almacenan en bodegas a la sombra y secas. Otra forma de conservación es el de las avellanas frescas que tienen los mismos problemas que un fruto fresco, pueden ser conservadas por 2 a 3 semanas en cámara fría o en la sección de legumbres del refrigerador (GRAU, 2003).

Los frutos cosechados en seco, una vez limpios se secan en forma artificial en secadores para lograr un contenido de humedad de 6 a 8%. Este porcentaje de humedad permite una muy buena conservación inicial (GRAU, 2003).

La avellana se conserva mejor dentro de la cáscara que sin ella, debido a que disminuye la exposición al oxígeno y así el enranciamiento. Si las temperaturas no sobrepasan los 21° C las avellanas una vez secas y con cáscara, pueden durar todo el año. Se pueden almacenar en cámara fría a 2-4° C durante 2 a 3 años (GRAU, 2003).

2.7 Sistema reproductivo de *Corylus avellana* L.

La función reproductiva es dar origen a nuevos individuos y perpetuar así la especie, aumentar el número de plantas de la misma y distribuir las en un área mayor (HOLMAN y ROBBINS, 1961).

FRANKEL y GALUM (1977), mencionan que los órganos reproductivos de las espermatófitas, exhiben una cantidad incalculable de expresiones morfológicas y fisiológicas. Las adaptaciones de las flores se relacionan con la eficiencia de la polinización y la regulación del nivel de entrecruzamiento. Esto ha generado con el tiempo la separación espacial de los órganos sexuales y se ha convertido en un mecanismo para asegurar la variabilidad genética, existiendo plantas unisexuales, es decir órganos sexuales en flores distintas y bisexuales, en la misma flor.

Según lo mencionado por BASTIAS y GRAU, (2004); GRAU (2001); VALENZUELA *et. al.*, (2002), el avellano europeo es una planta monoica, presenta en un mismo pie, flores femeninas y masculinas. Además, es autoestéril, por lo que requiere de polinizantes para su reproducción.

La polinización de *C. avellana* (L.), posee serias limitaciones debido a la autoincompatibilidad de sus flores, sumado al marcado desfase en la maduración de estas durante el desarrollo fenológico (dicogamia) (BASTIAS y GRAU, 2004; BARON *et. al.*, 1995; VALENZUELA *et. al.*, 2002).

La polinización anemófila ocurre durante los meses de invierno, con bajas temperaturas y lluvias. El pistilo puede quedar receptivo durante varias semanas (FRANKEL y GALUM, 1977; VALENZUELA *et. al.*, 2002). DE BERASATEGUI (1997), agrega que el estigma de la flor se mantiene receptivo por 1 mes desde la aparición hasta que se deseca, siendo el momento de

mayor receptividad 15 días después de inicio de floración (estado de punta roja). Sin embargo, la especie presenta notables adaptaciones para enfrentar dichas dificultades: abundancia de polen, resistencia de los órganos florales al frío, gran superficie receptiva, amplia vía de acceso de los tubos polínicos, desfase entre polinización y fecundación (TORRES, 1994).

Una vez ocurrida la polinización el tubo polínico crece hasta la base del estigma entrando a un estado de receso durante unos 4 a 5 meses, para luego reiniciar su crecimiento y los óvulos sean fecundados (VALENZUELA *et. al.*, 2001).

2.7.1 Morfología de la flor. Una flor es un brote de entrenudos muy condensados, que tiene hojas especialmente adaptadas para la reproducción, las cuales son muy diferentes de las hojas del follaje. Comúnmente una flor se origina de una axila de una hoja, esta subtiende a la flor y puede ser igual a una hoja del follaje o bien puede ser muy diferente en cuyo caso se le denomina bráctea. Dentro de las características que hacen diferente a la flor de una simple rama es que el promeristemo no sigue creciendo, este cesa una vez que ha formado las hojas florales, las que a su vez están agrupadas y no distribuidas a lo largo del tallo. Las yemas comúnmente presentes en las axilas de las hojas del follaje no se encuentran en las hojas florales y por último las hojas florales pueden producir polen o bien óvulos (HOLMAN y ROBBINS, 1961).

Las partes de una flor típica son: sépalos, pétalos, estambres, pistilo (conformado por ovario, estilo, estigma) y receptáculo. La ausencia de algunas de estas partes da origen a diferentes tipos de flores. Cuando la flor carece de una las partes esenciales para la reproducción se les denomina *flores imperfectas*, es decir que las especies que poseen esta característica presentan flores incompletas estaminadas y flores incompletas pistiladas. Se cree que la

mayor parte de las especies con flores imperfectas han evolucionado por la reducción de una de sus partes de antecesores que presentaban flores perfectas. El avellano europeo es una de las especies que posee flores imperfectas (HOLMAN y ROBBINS, 1961). STRASBURGER *et. al.*, (1994) mencionan que la flor de las Betuláceas posee flores primitivas cuyos estambres se encuentran a menudo divididos.

C. avellana L. en realidad posee una inflorescencia, es decir, que las flores se agrupan unidas a través de un pedicelo a un pedúnculo en común. La inflorescencia es racimosa simple del tipo amento donde una espiga, que generalmente sólo tiene flores pistiladas o estaminadas, eventualmente se desprende entera de la planta (HOLMAN y ROBBINS, 1961).

2.7.1.1 Flor femenina. Se ubican en la terminación de las ramillas laterales (GRAU, 2003) y se reúnen en número de 1 a 5 formando glomérulos rodeados de brácteas florales soldadas entre si durante la maduración, dando lugar a una cubierta leñosa (VIÑAS, 2004; GRAU, 2003). Los glomérulos son fáciles de visualizar, ya que de ellos sobresalen los estigmas rojizos, dos por cada pistilo, cuyo ovario se encuentra envuelto por el cáliz piloso (cúpula) (INIA, 2004; GRAU, 2003).

2.7.1.2 Flor masculina. Según VIÑAS (2004), la flor masculina del avellano europeo carece de perianto (característica de las especies de polinización anemófila) y se encuentra dispuesta hacia la parte externa del ramo, en amentos cilíndricos de 4 a 6 cm de largo, colgantes y amarillentos (GRAU, 2003; INIA, 2004), que producen aproximadamente 30 millones de granos de polen por flor (DE BERASATEGUI, 1997). Cada una posee una escama trilobulada, algodonosa de color verde claro y de extremidad acuminada y en su cara interna se insertan 8 estambres sin restos de pistilos (INIA, 2004; GRAU, 2003).

2.7.1.3 Floración. De acuerdo a lo mencionado por MEDEL y ORUETA (1986); BARON *et. al.*, (1995; 1997) el desarrollo de los órganos florales femeninos y masculinos se produciría entre los meses de julio y agosto. INIA (2004), agrega que la flores femeninas florecen entre dichos meses dependiendo del cultivar y la zona de cultivo. El tipo de polinización anemófila del avellano europeo está influido por características varietales que hacen que sus resultados difieran mucho entre las localidades y plantas. Otra de las singulares características de la especie, es la fertilización de sus óvulos la que tiene lugar sólo 4 a 5 meses después de la polinización, a inicios de verano (MEDEL, y ORUETA, 1986).

2.7.2 Polen. La función del polen es actuar como microgametofito haploide en la reproducción de las plantas (GATEN, 2000). KEARNS e INOUYE (1993), agregan que el polen es el componente esencial de la reproducción sexual y el responsable de transmitir el material genético masculino, lo que genera un gran interés en el mejoramiento genético de las especies de cultivo. De este modo el polen es el encargado de heredar y transmitir la mayoría de los genes de resistencia a enfermedades, plagas y/o condiciones adversas que el medio presente (SEILER y OLSON, 1999). Por lo que el momento de la disponibilidad del grano de polen, su viabilidad, germinabilidad y el grado de autoesterilidad de ciertos cultivares, son factores importantes de considerar (MEDEL, y ORUETA, 1986).

El grano de polen se encuentra protegido por una capa resistente denominada esporodermis, la cual se encuentra conformada por dos capas, la exina y la intina (FONT QUER, 1970). La exina se encuentra constituida principalmente por lipoproteínas, además de esporopolenina, ésteres de carotenoides y polifenoles. La capa más interna (intina) esta formada por pectina (KEARNS e INOUYE, 1993).

2.7.2.1 Descripción del grano de polen de *C. avellana* L. DE BERASATEGUI (1997), respecto a las dimensiones del grano de polen menciona que pueden medir desde 25 a 30 micrones de diámetro. A lo que VIÑAS (2004), agrega que son triporados y de forma algo elíptica.

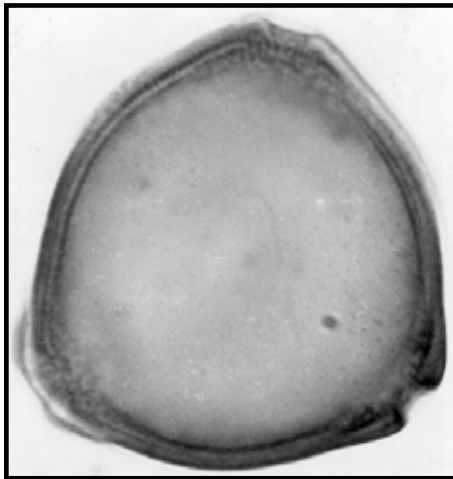


FIGURA 2: Grano de polen de *C. avellana* L.

FUENTE: UNIVERSIDAD DE BERN, (2006).

2.7.2.2 Formación del grano de polen. El desarrollo del grano de polen comienza en el crecimiento inicial de las anteras. En los sacos de polen se producen células jóvenes redondeadas llamadas *células madres del polen*, cada una de las cuales por medio de dos divisiones sucesivas forma cuatro granos de polen. Cuando el grano de polen se desprende de la antera, el núcleo de éstos se ha dividido por mitosis para dar origen a dos núcleos, el generativo y el vegetativo, los cuales no se encuentran separados por una membrana celular, sino que el citoplasma que rodea al núcleo generativo se encuentra fuertemente diferenciado del resto del citoplasma (HOLMAN y ROBBINS, 1961).

2.7.2.3 Germinación del grano de polen y fecundación de la ovocélula. Los granos de polen una vez que llegan a la superficie estigmática, que se encuentra cubierta por un líquido viscoso, se adhieren a ella. Al absorber este líquido, el grano de polen se hincha y luego a través de un poro o bien a través de una fisura de su exina emite el tubo polínico que es atraído por el estigma. Este tubo polínico perfora una de las papilas penetrando en el interior del tejido conductor y segrega por su extremo enzimas (diastatas) que digieren las células gelificadas de las que se nutre (JEAN-PROST, 1970; GATEN, 2000). Enseguida el citoplasma del grano de polen se introduce en el tubo polínico junto con las células vegetativa y generativa en el mismo orden. A medida que se va vaciando el citoplasma en el tubo polínico, este sigue avanzando por el tejido conductor del estilo luego el del ovario hasta llegar al óvulo, tras lo cual deja de crecer (JEAN-PROST, 1970).

Una vez formado el tubo polínico, responsabilidad de la célula vegetativa, libera las células espermáticas al interior de la ovocélula para que sea fecundada (GATEN, 2000). Para que esto ocurra el grano de polen debe encontrar un estigma compatible, con las condiciones adecuadas que le proporcionen los metabolitos y enzimas provenientes de la secreción de las células papilares del estigma (MASCARENHAS, 1975).

En el proceso de doble fertilización uno de los gametos se fusiona con la célula huevo y el otro gameto se une al endosperma primario del núcleo originando un endosperma usualmente triploide (KEARNS e INOUE, 1993; JEAN-PROST, 1970).

Para el caso del avellano europeo, después de una polinización compatible, las partes expuestas del estilo y el estigma se marchitan y se tornan negras. El tubo polínico crece hacia la base del estilo donde la punta del tubo, conteniendo el núcleo vegetativo y espermático, forma una estructura irregular

con paredes de calosa y permanece en este estado de reposo por alrededor de 5 meses. Durante dicho período, estimulado por la polinización, el tejido meristemático de la base del estilo comienza a desarrollarse, muy lentamente primero y luego más rápidamente hasta transformarse en un ovario maduro. Cuando la nuez está cerca de la mitad de su eventual diámetro, el saco embrionario está completamente desarrollado. Entonces, el tubo polínico reanuda su crecimiento dentro del ovario, a través de la pared del ovario, a lo largo de los folículos del integumento y penetra el óvulo para efectuar la fecundación del huevo (THOMPSON *et. al.*, 1997).

En el caso de que la polinización haya fallado, el estigma puede permanecer receptivo por 2 a 3 meses. Si la parte del estigma fuese dañado por el frío o por abrasión, la parte inferior, protegida por el brote escamoso, subsecuentemente emerge como tejido funcional (THOMPSON *et. al.*, 1997).

En tamaño relativamente grande de la superficie papilar del estigma, el largo periodo de receptividad y la habilidad para recobrase del daño, así como el abundante polen esparcido, son adaptaciones para asegurar el éxito de la polinización anemófila durante periodos de clima invernal (THOMPSON *et. al.*, 1997).

2.8 Terminología utilizada

Debido a la gran importancia del grano de polen para los polinizadores como fuente nutritiva y para las plantas al ser esencial en la reproducción sexual, se ha hecho necesario desarrollar técnicas y pruebas para su análisis, dentro de los cuales se pueden nombrar: de cuantificación, medición de tamaño, identificación y viabilidad del polen (KEARNS e INOUE, 1993).

Exámenes descriptivos, ensayo de viabilidad y pruebas fisiológicas son mencionadas por STANLEY y LINSKENS (1974), como las tres formas básicas de análisis del grano de polen y agregan que en la fruticultura las pruebas de identificación y viabilidad son importantes.

2.8.1 Viabilidad polínica. KEARNS e INOUE (1993), describen la viabilidad del grano de polen como una medida de la fertilidad masculina, lo que DAFNI y FIRMAGE (2000), describirían *como* la capacidad para vivir, crecer, germinar o desarrollarse del grano de polen. Los mismos autores mencionan la viabilidad como la capacidad del polen para germinar sobre la superficie del estigma o bien en estado *in vitro*, como la respuesta del polen a ciertas tinciones y a la efectividad de producción de semillas después de la polinización.

En la agricultura el concepto de viabilidad como la capacidad de germinar, crecer y fertilizar, es muy útil para medir la reproducción de una especie y las condiciones de almacenaje de su polen para evitar que se pierda su viabilidad a través del tiempo (STANLEY y LINSKENS, 1974).

Tincionalidad, madurez del polen, calidad del polen, viabilidad potencial, vigor, germinabilidad, fertilidad, fertilidad relativa, habilidad para fertilizar, etc. son señalados por DAFNI y FIRMAGE (2000), como los términos utilizados por algunos investigadores para describir la viabilidad polínica. Lo que les permitiría identificar de una mejor manera la condición que se desee fijar.

DAFNI y FIRMAGE (2000), señalan que el concepto de duración de viabilidad polínica es el mejor para expresar los resultados experimentales, lo que se traduce en “el periodo de tiempo en el cual el grano de polen posee una viabilidad polínica superior al 50%”. Además, es importante conocer la calidad del polen por medio de su poder germinativo (viabilidad), debido a que es un factor que asegura la fecundación y con ello la calidad de los frutos, producto

final del proceso y de importancia económica ANDRES *et. al.*, (1999). STONE *et. al.*, (1995) agregan que la disminución o pérdida total de la viabilidad polínica es conocida e inevitable, llegando en ocasiones a ser un proceso muy rápido, lo cual puede deberse, tanto a la edad del polen como, a la exposición a condiciones ambientales de estrés.

STANLEY y LINSKENS (1974), sugieren que el polen recolectado en campo o retirado del almacenamiento debe ser objeto de un análisis de germinación para evaluar su capacidad germinativa.

2.8.2 Longevidad del grano de polen. El término de longevidad polínica define el periodo en el cual el polen mantiene la capacidad de germinar sobre un estigma apropiado (receptivo y compatible) (DAFNI y FIRMAGE, 2000).

La duración de la viabilidad del polen después de la deshidratación de las anteras es crucial para la polinización (STONE *et. al.*, 1995), particularmente para el cruzamiento. Esto determina la posibilidad de cruzamientos entre especies (SONG *et. al.*, 2001).

La duración del grano de polen después de la deshidratación de la antera varía según el contenido de carbohidratos presentes en él, ya que éstos protegen a la membrana de la desecación dando mayor longevidad al polen (DAFNI y FIRMAGE, 2000).

2.8.3 Germinabilidad polínica. El término *germinabilidad*, al igual que *fertilidad* y *habilidad de fertilización*, son más restrictivos que el término de *viabilidad*. Un grano de polen puede tener la capacidad de germinar, pero no tener las condiciones adecuadas para hacerlo. O bien tener la habilidad de germinar, pero no tener la capacidad de fertilizar un óvulo por incompatibilidad. Estos términos reflejan mejor una medida de germinación o porcentaje de

fertilización que el término de viabilidad (Cuadro 1) (DAFNI y FIRMAGE, 2000).

CUADRO 1 Terminología utilizada en viabilidad del polen

Etapa de desarrollo	Criterio	Terminología recomendada
Formación de polen	Polen fértil o infértil	Esterilidad polínica
Granos de polen intacto	Presencia de citoplasma	Tincionalidad
	Plasmalema intacto	Tincionalidad
Germinación	Presencia de actividad enzimática	Tincionalidad
	Germinación sobre el estigma, longitud del tubo	Germinabilidad estigmática
<i>In vivo</i>	El tubo polínico es igual o mayor al diámetro del grano	Germinabilidad
<i>In Vitro</i>	Producción de semilla	Habilidad de fertilización
Fertilización y establecimiento de óvulo fecundado		

FUENTE: DAFNI y FIRMAGE, (2000).

2.9 Factores que afecta la viabilidad y longevidad polínica

Existen diversos factores que afectan la viabilidad polínica, tanto en almacenaje como, al momento de la colecta. Entre ellos se pueden nombrar la temperatura y humedad relativa del medio, hora del día, estado floral, etc. (KEARNS e INOUYE, 1993).

Otro de los factores que afectan la viabilidad polínica son el tiempo y la metodología usada en la colecta del polen (anteras y/o flores) (KEARNS e INOUYE, 1993), la hora del día en que se colecta el polen y el estado de desarrollo floral de donde este proviene. Las exposiciones a la luz ultravioleta y al ozono también pueden afectar su viabilidad reduciéndola en algunas especies (STANLEY y LINSKENS, 1974).

La pérdida de viabilidad del grano de polen es algo inevitable, pudiendo llegar a ser demasiado rápida debido a la edad del polen y a la exposición de estrés de tipo medioambiental (STONE *et. al.*, 1995).

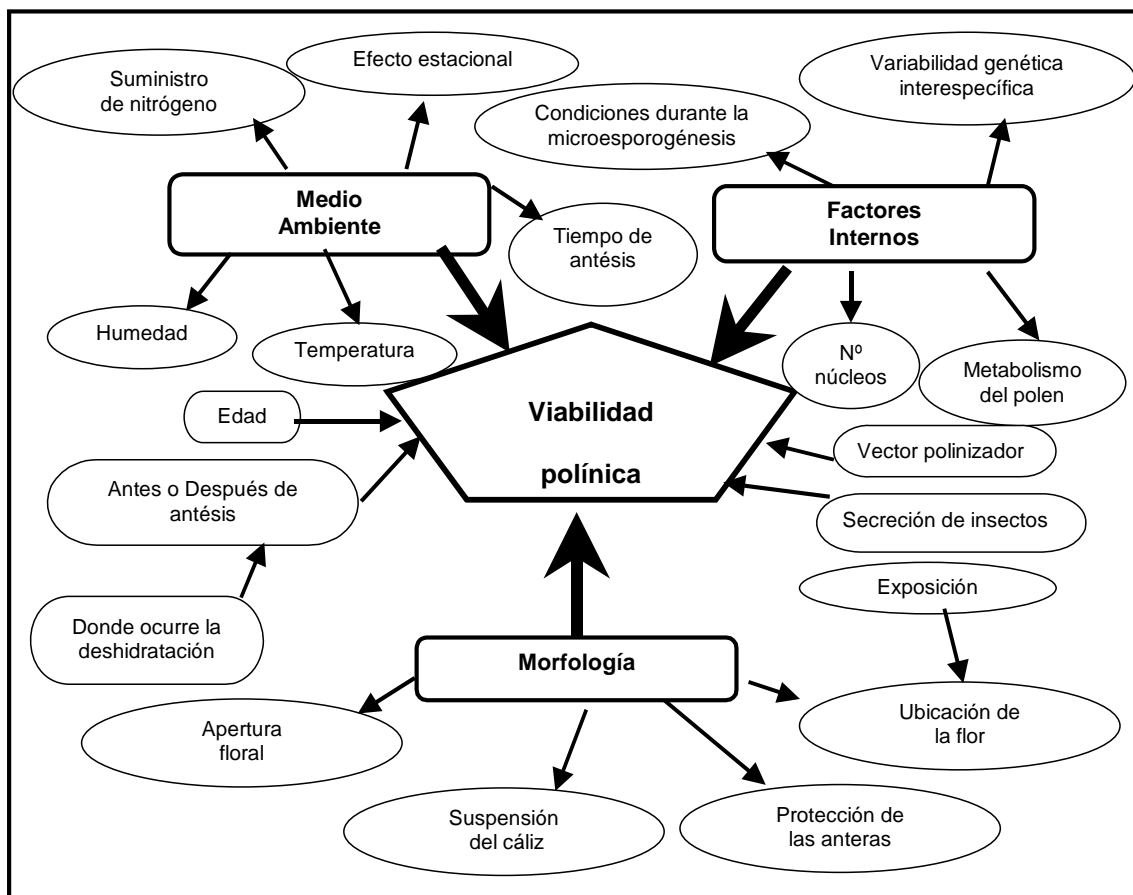


FIGURA 3: Factores que afectan la viabilidad del grano de polen.

FUENTE: DAFNI y FIRMAGE, (2000).

La viabilidad polínica es máxima en la deshincencia de la antera, disminuyendo rápidamente a través del tiempo, aún más si es expuesto al ambiente (KEARNS e INOUYE, 1993).

La edad de la planta también afecta la viabilidad del polen, este es el caso de *Austrocedrus chilensis* (D. Don), donde a medida que avanza la edad de la planta la cantidad de polen inviable aumenta (AIZEN y ROVERE, 1995).

Otros de los factores que afectan la viabilidad del polen es la utilización de algunos compuestos químicos, que afectan la calidad del polen. Algunos fungicidas inhiben, por ejemplo, la germinación del polen al mismo tiempo que reducen el crecimiento del tubo polínico, tanto en forma *in vivo* como, *in vitro* (CABELLO, 2003).

El factor genético es otro de los que afectan la viabilidad polínica (DAFNI y FIRMAGE, 2000; GIL-ALBERT, 1980) el cual es irreversible y el hecho de que algunos cultivares desarrollen polen estéril o no, es una respuesta directa a fenómenos tales como, hibridismos, poliploidías y/o mutaciones, debido a la excesiva reproducción vegetativa de los frutales (CABELLO, 2003).

2.9.1 Almacenamiento de los granos de polen. DAFNI y FIRMAGE (2000), señalan que la forma de agruparse del polen hace variar su longevidad, ya que cuando el polen se presenta agrupado se protege de la desecación y de los efectos de la luz ultravioleta. A lo que se suma la presencia de sustancias viscosas que contienen algunos granos de polen, condición que aumenta su grado de protección a diferencia del polen seco y polvoriento.

Los mismos autores agregan que el contenido y calidad de los carbohidratos presentes en los granos de polen, también hacen variar la duración de la viabilidad (longevidad del grano de polen), ya que protegen a la membrana otorgándole mayor longevidad polínica.

La importancia del almacenamiento adecuado para cada tipo de polen se debe a que facilitaría el cruzamiento de especies que poseen diferentes

periodos de floración y para aquellas especies que se encuentran en diferentes localidades (CABELLO, 2003). Además de contribuir a la preservación del germoplasma. El almacenaje debe ser a temperaturas cercanas a los 5° C, hasta temperaturas de criopreservación de -180° C hasta -271° C, lo que debe ir acompañado por un ambiente de baja humedad relativa (STANLEY y LINSKENS, 1974).

Según CABELLO (2003), los factores de mayor relevancia en el almacenamiento de polen son la temperatura y la humedad relativa. STANLEY y LINSKENS (1974), se suman a dichos factores el gas atmosférico y la presión parcial del oxígeno, entre otros.

2.9.2 Humedad relativa. STANLEY y LINSKENS (1974), señalan que la humedad relativa es el factor más decisivo en la viabilidad de polen sometido a almacenaje (longevidad) y que se podría afirmar la existencia de una relación negativa entre la humedad relativa y la viabilidad del polen almacenado. Sin embargo, existen especies que se ven afectadas por humedades relativas de almacenaje muy bajas o muy altas.

Según CABELLO (2003), la reducción de la humedad relativa aumenta la longevidad del polen si se combina con temperaturas de almacenamiento por debajo de los 0° C. Lo cual, concuerda con lo señalado por STANLEY y LINSKENS (1974), quienes agregan que existen especies que requieren de un pre-secado antes del almacenamiento a 0° C y que el almacenamiento a bajas temperaturas es mejor que a altas temperaturas.

2.9.3 Temperatura. Temperaturas cercanas a los 0° C prolongan la viabilidad del polen, sin embargo, el contenido de humedad también ha de ser considerado, ya que existen algunos tipos de pólenes que almacenados a -12° C presentan mayor longevidad a humedades de 28% que aquellos

almacenados con un 56% de humedad. Cabe destacar que de estudios realizados en diferentes especies almacenadas a bajas temperaturas, demostraron preservar la viabilidad de sus pólenes mejor que aquellos almacenados a altas temperaturas (STANLEY y LINSKENS, 1974).

2.9.4 Gas atmosférico. Granos de polen almacenados en condiciones de oxígeno puro redujeron su longevidad a diferencia de otros que se almacenaron en cámaras selladas con un mayor porcentaje de dióxido de carbono. Sin embargo, el almacenamiento como ya se dijo varía según la especie, ejemplo de ello son el género *Pinus* cuyo polen almacenado a temperatura ambiente con nitrógeno gaseoso mantiene su viabilidad por más de 100 días (SATNLEY y LINSKENS, 1974).

2.10 Métodos para determinar la viabilidad polínica

Existe una variedad de factores que afectan la metodología usada para evaluar la viabilidad polínica, entre éstos se nombran: contenido de sacarosa, actividad enzimática, contenido citoplasmático, condición física en integridad del plasmalema ante la temperatura y la exposición al aire, etc. (DAFNI y FIRMAGE, 2000).

Para determinar la viabilidad polínica de una especie existen diferentes métodos y pruebas, donde la elección de una de ellas dependerá de la especie en estudio y de la relación existente entre la viabilidad y la fertilidad (DAFNI y FIRMAGE, 2000).

De todos los métodos existentes ninguno es mejor que otro, ya que todos presentan ventajas y desventajas para determinar la viabilidad del polen. Es debido a esto que ninguno es capaz de confirmar si una muestra de polen es inviable y por lo tanto imposibilitada para fertilizar. De este modo, todos los

métodos existentes sólo nos entregan una estimación de la variable medida (DAFNI y FIRMAGE, 2000).

RODRIGUEZ-RIANO y DAFNI (2000), recomiendan utilizar varias pruebas simultáneamente para obtener resultados que reflejen de forma más cabal el real desempeño que puedan tener los granos de polen analizados.

Los métodos directos son definidos por STANLEY y LINSKENS (1974), como aquellos que requieren de la germinación para estimar la capacidad de germinación y la viabilidad polínica. Por lo tanto, este método consiste en depositar el polen sobre el estigma y determinar si produce semilla o no. La ventaja de este método es que entrega una medida inequívoca (a menos que la especie sea apomíctica o agamospérmica) y la desventaja de que requiere de mucho tiempo (KEARNS e INOUYE, 1993).

Los métodos indirectos son mucho más rápidos que los directos y se basan en la relación existente entre la capacidad de fertilizar los óvulos con determinadas características fisiológicas y/o físicas del grano de polen. Dentro de estos métodos se encuentran el examen fluorocromático, test de la actividad enzimática y el test de tinción de células polínicas, etc. (KEARNS e INOUYE, 1993).

Existen pruebas que junto con determinar la viabilidad polínica determinan su carga, es decir, la cantidad de granos de polen en la antera. Este es el caso de la tinción con anilina azul, lo cual demanda mucho trabajo por el conteo manual (KELLY *et. al.*, 2002). Sin embargo, existe una metodología propuesta por el mismo autor que combina la viabilidad polínica con el tamaño del grano de polen. Este método utiliza un contador electrónico facilitando el trabajo de contar los granos de polen viables y no viables, el problema de este

es que hay que calibrar los tamaños del polen de la especie y se debe comparar los resultados con otras pruebas de viabilidad.

2.10.1 Germinación *in vivo*. Este método mide la geminación del polen sobre el mismo estigma. La ventaja de este método es que simula la polinización natural generando resultados de mayor validez que los resultados *in Vitro* (DAFNI y FIRMAGE, 2000). La desventaja de este método es que debe ir acompañado de otro análisis, como pruebas de receptividad o madurez del estigma. Además, el polen puede ser que no germine sobre el estigma por problemas de incompatibilidad, o bien que germine en el estilo y al igual que en el caso anterior falle posteriormente por incompatibilidad. Otra de las desventajas es que si se toma como medida la producción de semillas la obtención de los resultados demorará (STONE *et. al.*, 1995). El problema de incompatibilidad está asociado a la autoesterilidad, característica que se presenta en muchos frutales, por lo tanto, es recomendable realizar ensayos previos comprobando si esta situación se presenta en la especie en estudio (GIL-ALBERT, 1980).

2.10.2 Germinación *in vitro*. Este método al igual que el anterior también mide la germinabilidad, sin embargo, bajo condiciones específicas del medio y de temperatura. Es bastante simple, rápido y completamente cuantitativo y simula las condiciones que se presentan en el estigma y que muchas veces es más seguro que las pruebas de “tinción” (CABELLO, 2003).

La germinación del polen en forma *in vitro* puede ser en agua (algunas Gimnospermas), en solución de sacarosa o en solución de sacarosa sobre agar o gelatina como medio. Los rangos apropiados de sacarosa en solución van desde un 2% a un 40% dependiendo del óptimo para cada especie, los cuales pueden ser establecidos empíricamente. Concentraciones muy bajas o muy

altas podrían provocar que el polen se reviente o se deshidrate (KEARNS e INOUYE, 1993).

En la naturaleza el agua, el azúcar y los amino ácidos son suministrados por el estilo para nutrir el crecimiento del tubo polínico. Para muchas especies el boro y el calcio son requeridos para el crecimiento del tubo polínico. El boro es suministrado por el estigma y el estilo de algunas especies, facilitando el transporte del azúcar y posee un rol en la producción de pectina en el tubo polínico al igual que el calcio, el cual se encuentra en la superficie de algunos granos de polen y es requerido frecuentemente en la germinación para controlar las condiciones osmóticas, y su gradiente puede regular el crecimiento del tubo polínico en el estilo. Medios que contengan sacarosa, ácido bórico y calcio son requeridos por al menos 79 géneros para la germinación *in vitro* (KEARNS e INOUYE, 1993).

Los resultados obtenidos por este método pueden variar dependiendo de la especie o del cultivar, composición del medio, temperatura y duración de la prueba (STANLEY y LINSKENS, 1974). DAFNI y FIRMAGE (2000), agregan que el tiempo de colección, las condiciones de almacenaje y la densidad del polen sobre el medio de cultivo, también afectan los resultados.

Un serio problema de este tipo de germinación es el gran número de granos de polen requeridos para incrementar el porcentaje de germinación y el largo del tubo polínico. Este problema puede ser rectificado adicionando calcio y boro para estimular la germinación. Brewbaker y Kwack (1963), desarrollaron un medio para corregir dichas deficiencias (KEARNS e INOUYE, 1993).

La desventaja de este método es que existe la enorme posibilidad de errores por efectos del medio de cultivo (SONG *et. al.*, 2001) y por los factores medioambientales (ANDRES *et. al.*, 1999). Además, la germinación del polen

es controlada por el núcleo vegetativo y puede ocurrir a pesar de que el núcleo generativo viable esté ausente (DAFNI y FIRMAGE, 2000).

2.10.3 Tinción diferencial de “Alexander”. Este método al teñir el polen permite diferenciar el polen abortado del no abortado (ALEXANDER, 1980). Sin embargo, también tiende a teñir los granos de polen viejo o muerto (no viable) y no tiene correlación con el método de germinación *in vitro* (DAFNI y FIRMAGE, 2000).

2.10.4 Indicador de peroxidasa (parafenilendiamina). Este método utiliza como reactivo el parafenilendiamina (p-fenilendiamina), el cual según DAFNI y FIRMAGE (2000), es muy sensible a cambios de luz en células vegetales, por lo que debe ser transportado y manipulado en oscuridad dificultando aún más su uso.

2.10.5 Reacción de diacetato de fluoresceína (FCR). Este método verifica dos aspectos de la viabilidad: la actividad enzimática y el estado de la membrana. La desventaja de este método es la baja disponibilidad de tiempo para el conteo, debido a que la muestra dura alrededor de 15 minutos. Además, los datos obtenidos no se correlacionan con la producción y con la prueba de germinación *in vitro* y se debe realizar un adecuado pre-hidratado del polen (DAFNI y FIRMAGE, 2000).

3 MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Material

A continuación se describirán los materiales utilizados para la realización de este estudio.

3.1.1 Lugar de recolección. El ensayo se realizó con polen extraído de un predio ubicado en la localidad de Antilhue, a 30 Km de Valdivia.

3.1.1.1 Caracterización climática. El clima de la X Región es templado lluvioso con influencia mediterránea. En cuanto a las temperaturas estas son equilibradas y solo ocasionalmente se registran temperaturas bajo los 0° C, la media de los meses de verano (diciembre, enero y febrero) alcanza los 17° C, mientras que en la época invernal bajan hasta los 9° C en promedio (METEOCHILE, 2006).

El clima de Valdivia se caracteriza por las altas precipitaciones con un promedio anual de 2400 mm. Estas precipitaciones se encuentran distribuidas en forma marcada, recayendo la época más lluviosa en los meses de invierno y ocasionalmente en los meses de otoño. El verano se presenta más seco, aunque se registran algunas precipitaciones (METEOCHILE, 2006).

En la región existen numerosos lagos, los que ayudan a mantener la homogeneidad térmica y son fuentes de humedad, característica de este clima cuyas medias de humedad son superiores al 80% y no hay meses con humedad media inferior a 75% (METEOCHILE, 2006).

3.1.2 Material vegetal. El material vegetal utilizado para los análisis de viabilidad y germinabilidad del polen correspondió a amentos de avellano europeo (*Corylus avellana* L.), del cultivar Du Chilly y de la selección clonal Santa Rosa (árboles de 6 años de edad, aproximadamente), elegidos al azar de cada uno de los tres potreros (Anexo 6). Los amentos presentaban las características de madurez óptima (mayor apertura y separación entre las flores, hojas están más abiertas, las anteras muy turgentes y de un color amarillo intenso) para la liberación del polen en estudio.

Para la evaluación de la llegada de polen a la superficie del estigma se recolectaron flores femeninas maduras, del potrero 3, ya que en dicha instancia el número de flores era extremadamente bajo por árbol y sólo se autorizó la extracción de flores desde dicho potrero, alcanzando un total de 22 flores para el cultivar Du Chilly y de 31 flores para la selección clonal Santa Rosa.

3.1.3 Materiales e instrumentos utilizados en campo. En el campo para la recolección de los amentos se utilizaron: bolsas de papel, tijeras, lápices, cinta adhesiva y bolsas plásticas. Para la extracción de las inflorescencias femeninas: pinzas, placa con medio nutritivo Brewbaker y Kwack (BK) con agar y lactofenol, pinza, cinta adhesiva y lápices.

3.1.4 Material de laboratorio. En laboratorio se usaron los siguientes materiales: placas Petri, porta y cubre objetos, pinzas, aguja enmangada, pipeta Pasteur, tubos Eppendorff, termómetro, mecheros, alcohol de 95°, nova, cloro, jabón, refrigerador, calentador a Baño María (Ika-Heizbad HB-250), microscopio (Carl Zeiss, 10x), lupa (Carl Zeiss, 40x), contador manual de células (Hand Taly Counter N° 1), reactivo fijador y de contraste (lactofenol), medio de germinación Brewbaker y Kwack (BK), reactivo parafenilendiamina (RODRIGUEZ-RIANO y DAFNI, 2000) y agua destilada (Ver la composición de los reactivos y medio de cultivo en Anexo 7).

3.2 Periodo de análisis

La recolección de los amentos se llevó a cabo el día 15 de julio 2004. Iniciándose el trabajo de laboratorio el 17 de julio 2004 y finalizó el 21 de enero 2005. Para el caso de los análisis de cuantificación de polen sobre el estigma, la recolección de estas se realizó el día 24 de septiembre 2004. La contabilización de los granos de polen sobre el estigma se inició el 01 de octubre 2004 y terminó el día 21 de noviembre 2004. Todos los análisis se realizaron en dependencias del Instituto de Botánica de la Universidad Austral de Chile.

3.3 Método

Para evaluar los objetivos propuestos de esta investigación se realizaron las siguientes metodologías.

3.3.1 Determinación del porcentaje de viabilidad polínica. Una vez recolectadas las muestras al azar de cada árbol (3-5 amentos, aproximadamente), también escogidos al azar por cada potrero (1, 2 y 3), tanto del cultivar Du Chilly como de la selección clonal Santa Rosa; las muestras de polen fueron trasvasijadas a tubos Eppendorff, para facilitar su manejo.

Para el caso del cultivar Du Chilly las muestras de polen se colectaron de un total de 12 árboles del potrero 1, 15 árboles del potrero 2 y 16 árboles del potrero 3. En cuanto a la selección clonal Santa Rosa de un total de 42 árboles 12 pertenecían al potrero 1, 15 al potrero 2 y 14 al potrero 3.

Para determinar la viabilidad del polen de *C. avellana* (L.), selección clonal Santa Rosa y cultivar Du Chilly, se tiñeron los granos de polen con el reactivo de p-fenilendiamina, descrito por RODRIGUEZ-RIANO y DAFNI (2000).

Para teñir los granos de polen primero se debió calentar a Baño María el reactivo hasta alcanzar los 35° C. Sobre un portaobjeto se colocaron 2-3 gotas del reactivo, sobre el cual se dejó caer el polen y se cubrió con un cubreobjeto para luego de 10 minutos mantenidos en oscuridad, contabilizar los granos de polen viables, no viables y abortados con un contador manual y bajo microscopio (10X). Según el método de RODRIGUEZ-RIANO y DAFNI (2000), los granos de polen teñidos de café oscuro son considerados viables, los de color café claro son no viables y los granos de polen no teñidos o transparentes son considerados abortados (Anexo 8).

Todo el proceso se realizó bajo la máxima oscuridad que pudiera lograrse en el laboratorio, debido a la fotosensibilidad del reactivo. Los recuentos para cada árbol se hicieron con cuatro portaobjetos y cinco áreas de conteo en cada uno, alcanzando un total de 20 conteos por cada muestra recolectada por árbol, con un promedio de 2000 granos de polen contabilizados. El área de conteo correspondía a toda el área cubierta por el ocular.

Para la obtención del porcentaje de viabilidad de los recuentos realizados se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de granos de polen de color café oscuro}}{\text{N}^{\circ} \text{ de total de granos de polen presentes}} \times 100 \quad (3,1)$$

3.3.2 Determinación del porcentaje de viabilidad polínica a través el tiempo de almacenaje. Se realizaron mediciones a los 30, 60, 120 y 180 días desde recolectado el polen. Cada árbol muestreado se debió categorizar de acuerdo a los porcentajes de viabilidad obtenidos de la primera medición y en base a ello se mezclaron las muestras. La categorización y mezcla del polen de los árboles muestreados (Anexo 8), se realizó sobre la base de que en la naturaleza y en las especies anemófilas en general, la dispersión del polen es al

azar y de esta misma manera es que llega al estigma. En base a esto y a que la cantidad de polen producido y recolectado de los árboles sería insuficiente para realizar las mediciones en el tiempo, es que se mezclaron las muestras de polen.

Las categorías se hicieron basándose en lo mencionado por DAFNI y FIRMAGE (2000), quienes definen la duración de la viabilidad polínica como “el periodo de tiempo en el cual, los granos de polen poseen más del 50% de viabilidad”. De esta manera, las categorías I, II, III y IV representan los siguientes rangos de viabilidad: 100-80%, 79,9-50%, 49,9-20% y 19,9-0%, respectivamente.

El almacenaje se realizó en tubos Eppendorff individualizados para cada categoría, por potrero y cultivar o selección clonal. Bajo condiciones de temperaturas de 4° C y humedades relativas de 40% aproximadamente, en el refrigerador propiedad del Laboratorio Central del Instituto de Botánica de la Universidad Austral de Chile.

El procedimiento de laboratorio correspondió al mismo citado en el punto 3.3.1 del presente texto.

3.3.3 Determinación de la germinabilidad polínica a través el tiempo de almacenaje. Previo a la medición se realizaron pruebas de germinación sobre el medio BK con diferentes concentraciones de sacarosa y de micronutrientes, para evaluar y elegir el medio que mejor representara las necesidades del polen estudiado. Luego de las pruebas pertinentes con 3 diferentes medios BK (1, A y B), se llegó a la conclusión de que el medio nutritivo que se debía utilizar era el medio BK tipo A con un 10% de sacarosa. El medio fue preparado de acuerdo al protocolo de Brewbaker-Kwack, almacenándose en un matraz y se esterilizó

en autoclave. Los medios permanecieron en refrigeración a 4° C, aproximadamente.

Para determinar la germinación del polen de *C. avellana* L., selección clonal Santa Rosa y cultivar Du Chilly, se cultivaron los granos de polen en el medio BK tipo A durante 4 días a 21° C en la estufa.

La siembra del polen, se realizó sobre portaobjetos excavados en los cuales se depositaba el medio BK tipo A, previamente calentado a Baño María hasta alcanzar un estado líquido, procurando dejar el fondo de la cavidad cubierta con el medio. Después de unos segundos de colocado el medio se sembraba el polen tomado al azar y esparcido de forma uniforme sobre el agar nutritivo. Luego se agregaba sobre el medio y el polen, una gota de agua estéril y se cubría cada portaobjeto excavado con otro invertido, para mantener la humedad relativa y evitar con ello la deshidratación y la contaminación con microorganismos (Anexo 9). Previo a la siembra los granos de polen fueron prehidratados por 25-30 minutos en cámaras húmedas utilizando placas Petri.

Las pruebas de germinación se realizaron en forma paralela a las pruebas de viabilidad a los 30, 60, 120 y 180 días, aproximadamente.

Los granos de polen germinados fueron considerados aquellos cuyo tubo polínico (longitud), fuese igual o mayor al diámetro del grano de polen (STANLEY y LINSKENS, 1974). Para calcular el porcentaje de granos de polen germinados se utilizó la fórmula (3,2).

$$\% \text{ de Germinación} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de granos de polen germinado}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de granos de polen}} \times 100 \quad (3,2)$$

Las mediciones fueron realizadas en dos portaobjetos excavados para cada categoría de cada potrero y cultivar (con dos excavaciones cada uno) y con 5 áreas de conteo (repetición por excavación), alcanzando un total de 20 conteos para cada una de las muestras.

El conteo del polen germinado y total de cada una de las áreas se realizó con la ayuda del contador manual y el reactivo lactofenol como medio de contraste y fijador. Las observaciones se realizaron con la ayuda de un microscopio Carl Zeiss (10x).

3.3.4 Evaluación de la llegada de polen a la superficie del estigma. Para la cuantificación de la llegada de polen a la superficie del estigma de las flores de la selección clonal Santa Rosa y del cultivar Du Chilly, se recolectaron flores femeninas maduras. Inmediatamente después de colectadas, las flores eran colocadas en un medio nutritivo BK con agar y lactofenol, este último para su fijación y tinción, además de evitar el desarrollo de agentes patógenos que dificultasen las observaciones a realizar. La placa con las muestras era mantenida en el refrigerador a temperatura de 4° C.

Cada flor era desmenuzada bajo lupa (Carl Zeiss, 40x), dejando sólo los 8 pistilos, desde los cuales se contabilizaban los granos de polen en el estigma, estilo, libres y granos de polen extraños (de otras especie). Los granos de polen libres son considerados aquellos que se encontraban sobre otros granos de polen adheridos al estigma y que se liberaron al medio por movimientos provocados durante la extracción de los pistilos y por efecto del lactofenol.

La superficie del estigma es marcadamente diferente a la superficie del estilo por la presencia de abundantes papilas que atrapan a los granos de polen. Esta condición permitía la diferenciación de los granos de polen que se encontraban sobre el estigma y sobre el estilo. En cuanto a los granos de polen

extraños se consideraron aquellos que pertenecían a otras especies ajenas a *C. avellana* L., dentro de las cuales destacaban, *Nothofagus dombeyi*, *Nothofagus obliqua*, *Gevuina avellana* Mol, *Salix caprea*, entre otras.

Para el cálculo de la llegada de polen al estigma de la flor se consideró como un 100% la totalidad de los granos de polen antes mencionados y se utilizó la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de llegada de polen} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de granos de polen estigma}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de granos de polen}} \times 100 \quad (3,3)$$

3.4 Análisis estadístico

Para determinar si existen diferencias significativas en la viabilidad del polen recolectado, se consideraron como factores los cultivares y los potreros, con los cuales se realizaron análisis de varianza con un nivel de confianza de 95%, atendiendo la existencia de una diferencia estadísticamente significativa si P-valor $\leq 0,05$.

Para la evaluación de la viabilidad del polen a través del tiempo de almacenaje, primero se clasificaron los árboles evaluados anteriormente en categorías I, II, III y IV. Para determinar la viabilidad del polen a través del tiempo de almacenaje (días) se consideraron como factores fijos los cultivares, potreros y categorías y como covariable el tiempo de almacenaje. A estos factores se les aplicó un análisis de covarianza con un nivel de confianza de 95%, considerándose la existencia de diferencias estadísticamente significativas si el P-valor $\leq 0,05$.

Para la evaluación de la germinabilidad del polen a través del tiempo de almacenaje (días), se evaluó para las categorías I, II, III y IV, considerándose en

los análisis estadísticos los mismos factores del análisis de viabilidad a través del tiempo del almacenaje.

Para aquellas variables que presentaron diferencias estadísticamente significativas se aplicó un análisis de comparaciones múltiples de Tukey (MONTGOMERY, 2005).

En la cuantificación de los granos de polen sobre la superficie del estigma se evaluaron las medias de granos de polen sobre la superficie del estigma, estilo, libres y extraños.

Para todos los análisis estadísticos se utilizaron los programas STATGRAPHIC PLUS 5.0 y SPSS 10.0.

4 PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

A continuación se presentarán los resultados obtenidos de los ensayos y análisis realizados para lograr el objetivo de determinar la viabilidad polínica.

4.1 Viabilidad actual del polen recolectado del cultivar Du Chilly y de la selección clonal Santa Rosa de *Corylus avellana* L.

De los resultados obtenidos de este ensayo (Cuadro 2), se desprende que el porcentaje de viabilidad polínica para el cultivar Du Chilly y la selección clonal Santa Rosa, presenta diferencias estadísticamente significativas entre los potreros (1, 2 y 3) (P -valor $\leq 0,05$). En cuanto a los cultivares y a la interacción potrero-cultivar no presentaron diferencias estadísticamente significativas (P -valor $\leq 0,05$).

Las medias de viabilidad obtenidas para la selección clonal Santa Rosa y el cultivar Du Chilly fueron de 53,7% y 52,4%, respectivamente.

Las diferencias entre los potreros (1, 2 y 3), (Anexo 14) pueden interpretarse como una respuesta directa de los árboles a las condiciones edáficas (Cuadro 3) y climáticas del lugar. Lo cual se respalda en lo mencionado por GRAU (2003), autor que señala que la fertilización y el riego son una de las labores más importantes para cualquier frutal, ya que estos se establecerán por muchos años y deberá cubrir las necesidades básicas durante toda la vida del árbol. El mismo autor señala que son dos las principales labores de fertilización que deben ser realizadas en un huerto frutal, la fertilización base y la fertilización anual.

CUADRO 2 Efecto de los potreros (1, 2 y 3), cultivares (Du Chilly y selección clonal Santa Rosa) e interacción potrero-cultivar en la viabilidad polínica de *C. avellana* L.

Factor	Viabilidad (%)
Cultivares	
1	53,7
2	52,4
DHS	n.s
Potreros	
1	73,0 a
2	66,3 a
3	30,8 b
DHS	0,0000
Interacción potrero-cultivar	
1-1	70,9
1-2	63,6
2-1	34,3
2-2	75,1
3-1	69,2
3-2	27,6
DHS	n.s

Cultivar 1: selección clonal santa Rosa; cultivar 2: cultivar Du Chilly.

Letras distintas en el análisis de cada factor representa diferencias estadísticas significativas (Tukey P-valor $\leq 0,05$).

En el predio, antes de la plantación, realizaron análisis de suelos para los tres potreros (Cuadro 3). De estos análisis se estimó conveniente elevar el pH. Para lo cual se realizaron enmiendas calcáreas utilizando Magnecal¹. Lo cual se ve respaldado por GRAU (2003), quien recomienda aplicar enmiendas calcáreas para suelos que presenten un pH inferior a 5,6, ya que esta enmienda mejorará el crecimiento y rendimiento del huerto.

¹ REIZE, F. 2005. Propietario. Comunicación personal.

Continuando con la fertilización base GRAU (2003), menciona que está comprendida por un abono orgánico y un abono mineral, cuyos objetivos son elevar la fertilidad del suelo y aportar esencialmente fósforo y potasio, respectivamente.

Cuadro 3 Análisis de suelos de los potreros 1, 2 y 3.

Medición	Potrero		
	1	2	3
pH (1:2,5) agua	6,0	6,2	6,2
pH (1:2,5) CaCl ₂ 0,01 M	5,4	5,3	5,4
Materia orgánica (%)	4,0	2,0	4,2
Fósforo aprovechable (ppm)	12,8	7,6	13,9
*Potasio intercambiable (ppm)	102	55	70
*Sodio intercambiable (meq/100 g.s.s.)	0,03	0,02	0,05
*Calcio intercambiable (meq/100 g.s.s.)	4,00	3,49	6,20
*Magnesio intercambiable (meq/100 g.s.s.)	0,75	0,65	1,29
Suma de bases intercambiable (meq/100 g.s.s.)	5,04	4,30	7,72
Aluminio intercambiable (meq/100 g.s.s.)	0,04	0,05	0,05
Saturación de aluminio (%)	0,8	1,2	0,6
Azufre disponible (ppm)	2,1	2,0	2,3
Boro disponible (ppm)	0,3	0,3	0,3
Zinc disponible (ppm)	0,8	0,6	1,0

Los análisis se realizaron de muestras de suelos de los diferentes potreros a 20 cm de profundidad para cada uno.

*Constituyen la suma de bases.

CORFO (1983), presenta estándares para los niveles de materia orgánica sobre 1,5% para el caso de suelos de tipo seco y sobre el 2,0% para el caso de suelos de regadío. Por lo tanto, de los análisis de suelos del predio, se desprende que sus porcentajes de materia orgánica se encuentran dentro de los niveles requeridos por el avellano europeo. Condición por la cual el propietario no consideró necesaria la fertilización con abonos orgánicos.

En lo que concierne a los aportes de abono mineral en el predio no se llevó a cabo una fertilización previa a la plantación. Lo que ha originado, como se ha observado en terreno, un desarrollo inadecuado de las plantas. Esto se respalda en el hecho de que macronutrientes primarios como nitrógeno, fósforo y potasio se encuentran relacionados con las principales actividades de la planta, como lo son la utilización de los carbohidratos, almacenaje y transferencia de energía en todos los procesos de la planta, componentes estructurales de un sinnúmero de compuestos (ácidos nucleicos, fosfolípidos, fosfoproteínas, etc.), activación enzimática, regulación hídrica, entre otros (RUSSELL y RUSSELL, 1959).

Otro de los minerales de suma importancia para este frutal es el boro disponible. De los análisis de suelos del predio se desprende que, los niveles de boro disponible son demasiados bajos en cuanto a los requerimientos de la planta, ya que el boro es de vital importancia en la maduración de las estructuras reproductivas². Lo cual, se ve reflejado en la viabilidad y cantidad de polen producido por los árboles muestreados. Por lo tanto, no es posible esperar un desarrollo de los granos de polen con una viabilidad adecuada para resistir los 3 a 4 meses previos a la fecundación del óvulo.

En lo que respecta a la suma de bases, esta es baja para los tres potreros siendo el óptimo para el frutal aproximadamente 10 meq/100 g.s.s.³ la cual no fue corregida antes de la plantación.

La fertilización anual en el predio se ha manejado con fertilizaciones mensuales de 150 g/planta de una mezcla de fertilizantes dispuestos alrededor del frutal acorde a su sistema radical (Anexo 15), a excepción de los meses de

² PARRA, C. 2005. Ing. Agr. Comunicación personal.

³ PARRA, C. 2005. Ing. Agr. Comunicación personal.

junio y julio en que las fertilizaciones se suspende debido a que las condiciones climáticas ocasionan la lixiviación de los nutrientes.

La Figura 4, presenta la media de viabilidad polínica de los tres potreros, destacándose la del potrero 3 con un 30,8%. En cambio los potreros 1 y 2 presentan medias de viabilidad polínica de 73,0% y 66,3%, respectivamente.

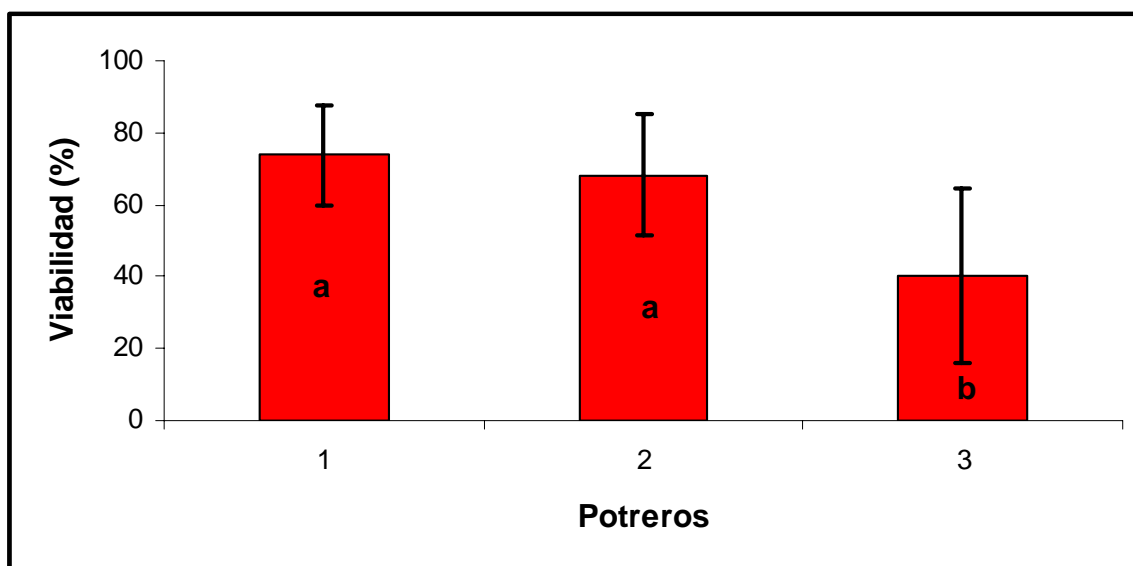


FIGURA 4 Efecto de los potreros (1, 2 y 3), sobre el porcentaje de viabilidad del polen de *C. avellana* L., (Tukey 95%).

Del párrafo anterior se desprendería que a pesar de que los potreros disponen de las mismas fertilizaciones mensuales, los árboles del potrero 3 producirían granos de polen de menor viabilidad polínica.

En terreno se pudo observar que el potrero 3 se encontraba bajo condiciones del medio que perjudicarían la producción de granos de polen que mantengan una viabilidad alta. Dentro de las condiciones observadas se encuentran: suelo pedregoso y de niveles freáticos mayores a los otros dos

potreros, debido a la cercanía al lecho del río y a la mayor pendiente del terreno, lo que ocasionaría suelos inundados por períodos de tiempo prolongados. Lo cual, se respalda en lo mencionado por GRAU (2003) y DE BERASATEGUI (1997), autores que hacen referencia a la sensibilidad de *C. avellana* L., a condiciones de suelos anegados, condición que provocaría la asfixia radical de la planta.

Además, DE BERASATEGUI, (1997) menciona que la calidad y cantidad de luz que llegan a las plantas de *C. avellana* L., afectarían la producción y calidad del polen. Condición que se vio reflejada en el potrero 3, donde la presencia de una cortina de árboles y arbustos de aproximadamente 4 m de altura, de especies tales como *Nothofagus obliqua*, *Nothofagus dombeyi*, *Pinus radiata*, *Gevuina avellana*, entre otras, estaría interfiriendo el paso de la luz adecuada para la producción de granos de polen en cantidad y calidad.

Como antes fue señalado, los niveles de boro disponible eran bajos para los tres potreros. Al observar los valores de boro en los análisis de suelo no se debiera esperar diferencias entre los tres potreros para las medias de viabilidad polínica, ya que los tres disponen de 0,3 ppm de boro. Sin embargo, las condiciones del medio y edáficas del potrero 3 (antes descritas), se sumarían a la baja disponibilidad de boro, produciendo en conjunto un efecto negativo en la media de viabilidad polínica de este potrero.

Al analizar el comportamiento de los dos cultivares por potrero (Figura 5), se observa que ambos cultivares presentan una media de viabilidad polínica menor en el potrero 3 respecto a los otros dos.

En cuanto al cultivar Du Chilly, este presenta medias de viabilidad polínica mayores a las de la selección clonal Santa Rosa en los potrero 1 y 2. Lo que indicaría una posible mayor sensibilidad del cultivar Du Chilly a las

condiciones propias del portero 3 que la selección clonal Santa Rosa. Y que esta selección clonal Santa Rosa es más sensible a las deficiencias nutricionales de la planta producto de la ausencia de una fertilización base.

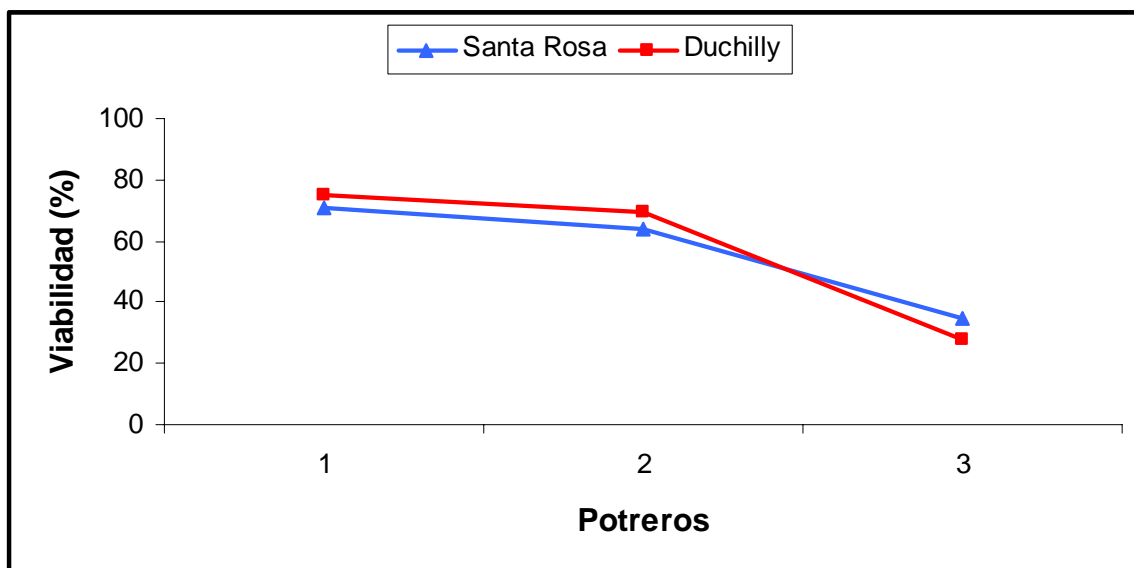


FIGURA 5 Efecto de la interacción potrero-cultivar en el porcentaje de viabilidad del polen de *C. avellana* L., (Tukey, 95%).

Los árboles muestreados en base a sus porcentajes de viabilidad polínica fueron clasificados en categorías I, II, III y IV, cuyos porcentajes de viabilidad polínica van de 100-80%, 79,9-50%, 49,9-20% y 19,9-0%, respectivamente.

En el Cuadro 4 puede observarse el comportamiento de los árboles muestreados en cuanto a sus porcentajes de viabilidad, a través de la participación porcentual de las categorías. El comportamiento general de los árboles es como categoría II, lo cual no es de menor importancia ya que, para OVIEDO y DURAN (2000), en el estudio de la viabilidad del polen de las principales variedades comerciales de caña de azúcar, individuos con

porcentajes de viabilidad del polen mayores a 50% son considerados como individuos perfectamente aptos para obrar de progenitor masculino (polinizantes).

CUADRO 4 Participación de los árboles muestreados en los potreros 1, 2 y 3 para selección clonal Santa Rosa y cultivar Du Chilly, por categoría.

Categoría	Selección clonal Santa Rosa			Cultivar Du Chilly		
	Potrero 1 n=16	Potrero 2 n=14	Potrero 3 n=12	Potrero 1 n=9	Potrero 2 n=14	Potrero 3 n=13
I	0,0	7,1	8,3	44,4	42,9	0,0
II	100	85,7	58,3	44,4	42,9	15,4
III	0,0	7,1	8,3	11,1	7,1	69,2
IV	0,0	0,0	25,0	0,0	7,1	15,3
Total	100	100	100	100	100	100

Categoría I: 100-80%; II: 79,9-50%; III: 49,9-20% y IV: 19,9-0%.

Además, se observa el marcado efecto que ocasionan las particulares condiciones del potrero 3 en la calidad del polen producido por sus árboles muestreados. Ya que, tanto para la selección clonal Santa Rosa como, para el cultivar Du Chilly las categorías de menor rango de viabilidad polínica, adquieren mayores porcentajes de participación.

Del total de árboles muestreados en el potrero 3 para la selección clonal Santa Rosa, sólo un 8,3% son categorías III y un 25% son categoría IV. En cambio para el caso del cultivar Du Chilly un 69,2% son categoría III y un 15,3% son categoría IV.

Lo anterior corroboraría el efecto negativo que tienen las condiciones del potrero 3 sobre la viabilidad polínica alcanzada por los árboles muestreados del

potrero. Ya que las categorías de menores rangos de viabilidad se encuentran en altos porcentajes en el potrero 3.

4.2 Determinación de la viabilidad polínica del cultivar Du Chilly y de la selección clonal Santa Rosa, *C. avellana* L., a través del tiempo de almacenaje

Las mediciones de viabilidad polínica se efectuaron a través del tiempo de almacenaje para determinar la capacidad de mantener la viabilidad del polen expuestos a condiciones de baja temperatura (4° C). Así los tiempos 1, 2, 3 y 4 corresponden a los 30, 60, 120 y 180 días después de cosechado el polen y almacenado.

Si bien, de acuerdo a lo mencionado por DAFNI y FIRMAGE (2000), las categorías de relevancia serían la I y II, se agregaron las otras dos categorías en los análisis para ver el comportamiento del polen de esta especie en su totalidad, sin dejar de lado la posibilidad de que aquellos árboles que presentaron un porcentaje de viabilidad inferior al 50%, tengan aún el vigor para germinar y fecundar la ovocélula.

Los análisis estadísticos (Cuadro 5), arrojan que la viabilidad polínica no presenta diferencias estadísticamente significativas ($P\text{-valor} \leq 0,05$) entre los tiempos de almacenaje, los cultivares y los potreros. Para el caso de las categorías, estas presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P\text{-valor} \leq 0,05$) (Anexo 21).

De acuerdo a la definición de duración de la viabilidad polínica de DAFNI y FIRMAGE (2000), se esperaban diferencias para las categorías I y II de la III y IV. No obstante, las diferencias se manifiestan en que las categorías II, III y IV difieren de la categoría I (Anexo 22).

CUADRO 5 Efecto de los potreros (1, 2 y 3), los cultivares (Du Chilly y selección clonal Santa Rosa), categorías (I, II, III y IV) y tiempo de almacenaje sobre el porcentaje de viabilidad de los granos de polen de *C. avellana* L.

Factor	Viabilidad (%)
Tiempo	
DHS	0,9496
Categorías	
I	99,487 b
II	60,550 a
III	60,475 a
IV	44,575 a
DHS	0,0045
Cultivares	
1	70,296
2	62,246
DHS	n.s
Potreros	
1	68,409
2	66,084
3	64,321
DHS	n.s

Cultivar 1: selección clonal Santa Rosa; cultivar 2: cultivar Du Chilly.

Letras distintas en el análisis de cada factor representa diferencias estadísticas significativas (Tukey P-valor $\leq 0,05$).

En la Figura 6, se observa que la viabilidad polínica de la categoría I es de un 99,4%, mientras que las categorías II, III y IV presentan medias de viabilidad polínica de 60,5%, 60,4% y 44,5%, respectivamente.

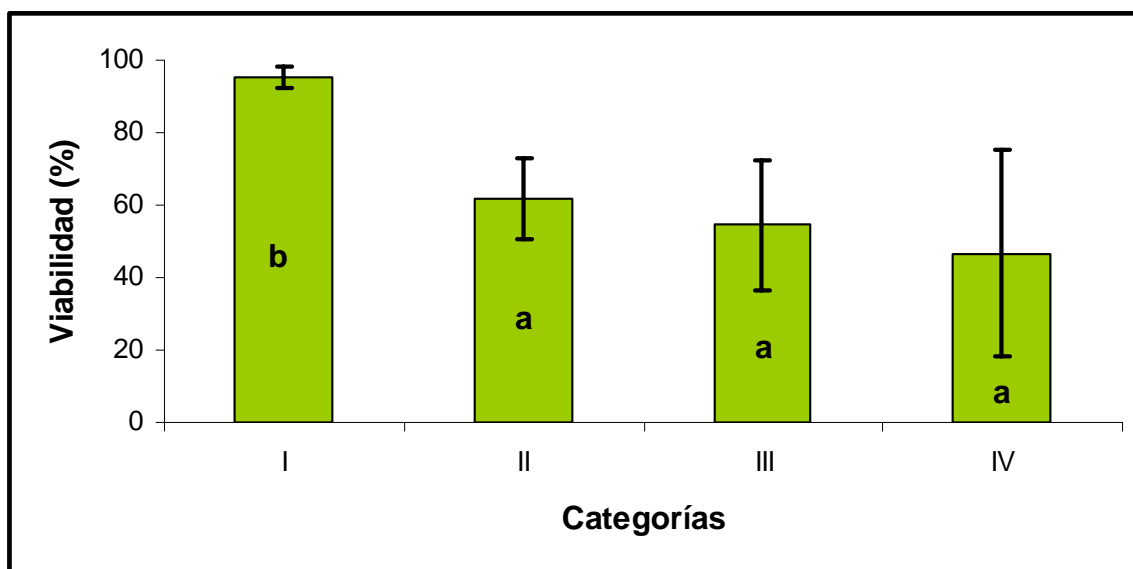


FIGURA 6 Efecto de las categorías (I, II, III y IV), sobre el porcentaje de viabilidad del polen, a través del tiempo de almacenaje, en polen de *C. avellana* L., (Tukey 95%).

Se esperaría que al hacer las evaluaciones de viabilidad del polen a través del tiempo de almacenaje se mantuvieran los valores en el rango de las categorías establecidas (100-80%, 79,9-50%, 49,9-20% y 19,9-0%). Sin embargo, para el caso de la categoría III y IV se obtuvieron valores mayores de viabilidad polínica (60,4% y 44,5%, respectivamente). Esto se explicaría de acuerdo a lo mencionado por BARNABAS y KOVACS (1997), autores que señalan que los tests de viabilidad basados en la actividad enzimática frecuentemente conducen a falsas estimaciones, ya que la presencia de una enzima funcional en la célula no garantiza que el polen esté viable y funcional. No obstante, dentro de los tests de viabilidad basados en la tinción el de p-fenilendiamina es el más preciso (RODRÍGUEZ-RIANO y DAFNI, 2000).

Al observar los valores obtenidos de las mediciones de viabilidades polínica a través del tiempo de almacenaje (Anexo 23), veremos que para el

caso de la selección clonal Santa Rosa la tendencia es mantener una viabilidad del polen desde los 30 hasta los 120 días para la categoría II de los potreros 1, 2 y 3 y desde los 120 a los 180 de almacenaje esta viabilidad disminuye (Figura 7). Destaca la categoría IV del potrero 3 quien experimenta un aumento desde los 30 días hasta los 120 días de almacenado y luego disminuye hasta los 180 días de almacenaje.

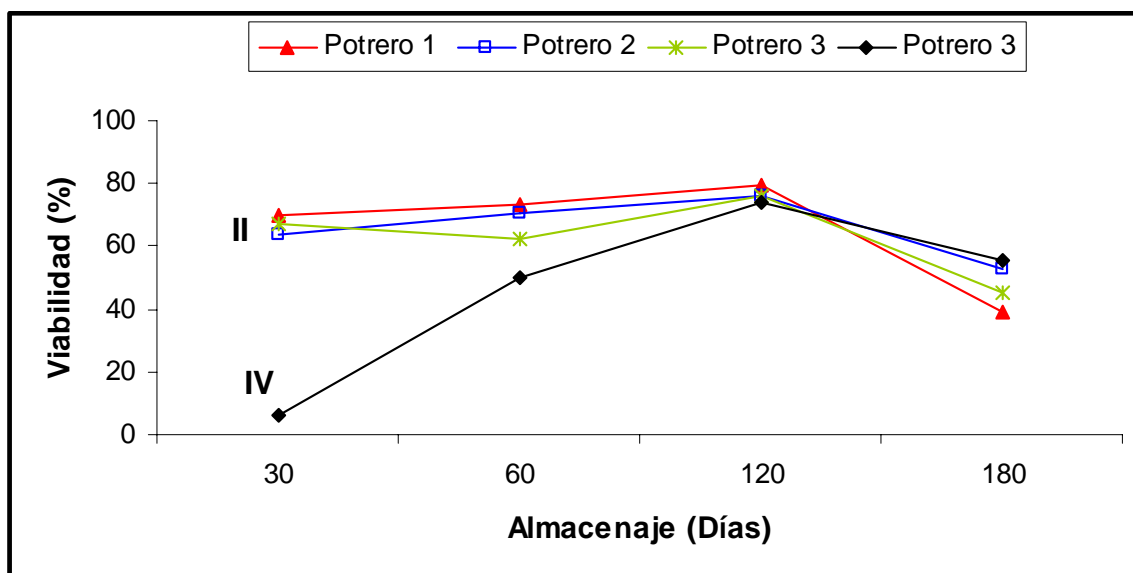


FIGURA 7 Viabilidad del polen de la selección clonal Santa Rosa, *C. avellana* L., a través del tiempo de almacenaje.

Para el caso del cultivar Du Chilly (Figura 8), las categorías I del potrero 2 y la categoría II del potrero 2 tienden a mantener sus viabilidades a través del tiempo de almacenaje, experimentando una leve disminución hacia los 120 y 180 días. En cambio la categoría II del potrero 1 mantiene su viabilidad hasta los 60 días, luego disminuye fuertemente hasta los 120 días y enseguida se mantiene hasta los 180 días. Y por último, la categoría III del potrero 3 aumenta su viabilidad desde los 30 hasta los 60 días, luego la mantiene hasta los 180 días.

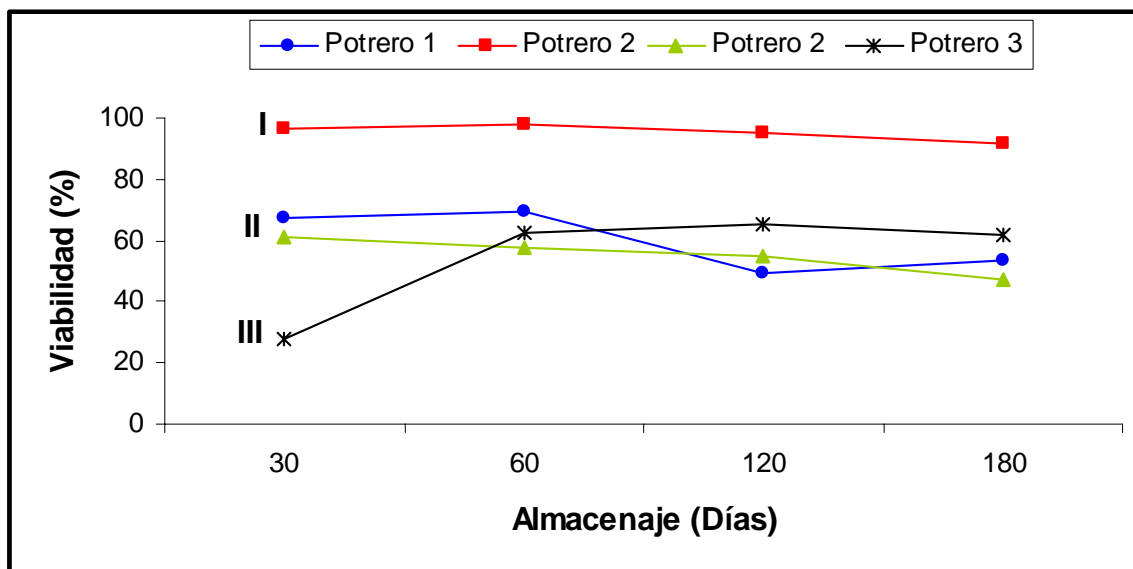


FIGURA 8 Viabilidad del polen del cultivar Du Chilly, *C. avellana* L., a través del tiempo de almacenaje.

De lo anterior se puede inferir que la viabilidad polínica con la cual llegan realmente los granos de polen almacenados de *C. avellana* L., al estigma de la flor, ocurre a los 120 días aproximadamente de cosechado y almacenado (4° C) el polen.

Además, se debe recordar que en la especie *C. avellana* L., entre la polinización y la fecundación del óvulo transcurren alrededor de 4 a 5 meses, periodo en el cual el grano de polen permanece en estado de reposo, en espera de la maduración del ovario. Destaca que *C. avellana* L., presente una viabilidad y longevidad semejante a grupos taxonómicamente más primitivos, como es el caso del género *Pinus* (Gimnospermas), las cuales presentan polinización y germinación del grano de polen 3-4 meses antes de la maduración de la ovocélula, culminando la fecundación a los 4-6 meses después de la liberación del polen (STRASBURGER, *et. al.*, 1994).

Por lo tanto, en estado de reposo la actividad metabólica del grano de polen es menor, con lo cual los análisis de viabilidad polínica basados en la detección de actividad enzimática arrojarían sólo estimaciones de la viabilidad del grano de polen. Lo cual, concuerda con lo mencionado por DAFNI y FIRMAGE (2000), autores que señalan que si bien el test de p-fenilendiamina es considerado como el más sensible y confiable en los análisis de viabilidad polínica, debe ser acompañado por otras pruebas de viabilidad como los de germinación *in vitro*.

4.3 Determinación de la germinabilidad polínica del cultivar Du Chilly y de la selección clonal Santa Rosa, *C. avellana* L., a través del tiempo de almacenaje

Los análisis estadísticos (Cuadro 6), arrojan que la germinabilidad del polen no presenta diferencias estadísticamente significativas (P-valor $\leq 0,05$) entre los potreros y los cultivares. Para el caso de las categorías y el tiempo de almacenaje, se presentan diferencias estadísticamente significativas (P-valor $\leq 0,05$).

Las diferencias encontradas entre las categorías (Anexo 25), se manifiestan en que las categorías I, II y IV no presentan diferencias en cuanto a los porcentajes de germinación (0,9%, 1,4% y 0,6%), no así la categoría III que presenta un valor de germinación de 6,1%, aproximadamente.

Además si bien el porcentaje de germinación de la categoría III es bajo (Figura 9), destaca que a pesar de ser una de las categorías de menor rango de viabilidad polínica (49,9-20%), presente la media de germinación más alta entre las otras tres categorías evaluadas.

CUADRO 6 Efecto de los potreros (1, 2 y 3), los cultivares (Du Chilly y selección clonal Santa Rosa), categorías (I, II, III y IV) y del tiempo de almacenaje sobre el porcentaje de germinación de los granos de polen de *C. avellana* L.

Factor	Viabilidad (%)
Tiempo	
DHS	0,0008
Categorías	
I	0,929 a
II	1,416 a
III	6,116b
IV	0,666 a
DHS	0,027
Cultivares	
1	2,632
2	1,932
DHS	n.s
Potreros	
1	1,978
2	2,603
3	2,265
DHS	n.s

Cultivar 1: selección clonal Santa Rosa; cultivar 2: cultivar Du Chilly.

Letras distintas en el análisis de cada factor representa diferencias estadísticas significativas (Tukey P-valor $\leq 0,05$).

Los bajos porcentajes de germinación alcanzados en los análisis de germinación de *C. avellana* L., parecen responder a una característica de las especies de polinización anemófilas, ya que BAEZ (2000), en el análisis fisiológico y morfológico de los granos de polen de 4 especies del género *Nothofagus*, obtuvo resultados de germinación similares.

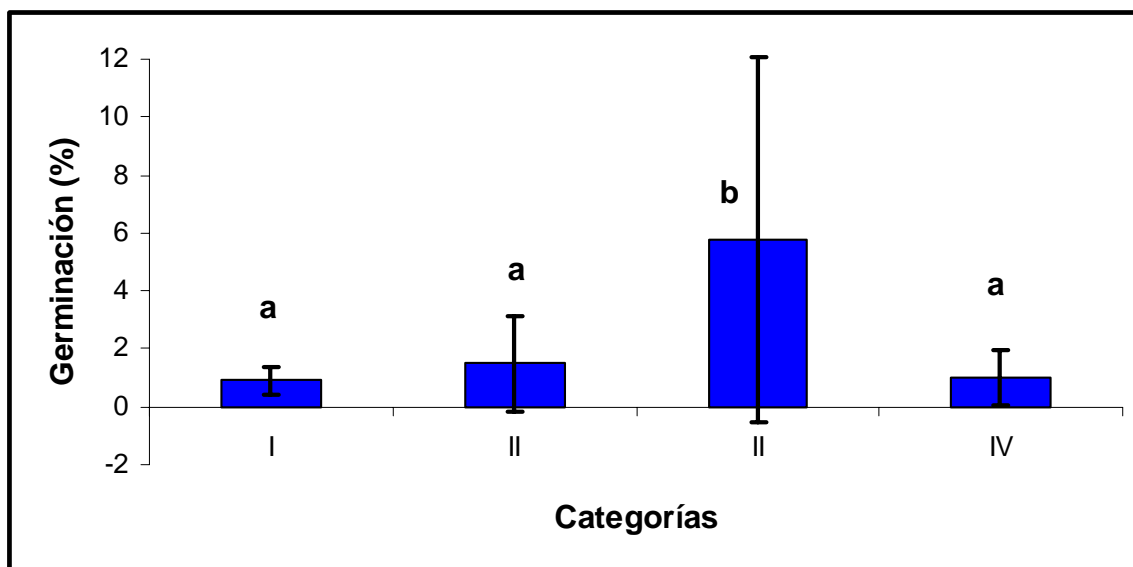


FIGURA 9 Efecto de las categorías (I, II, III y IV), sobre el porcentaje de germinación *in vitro*, a través del tiempo de almacenaje en polen de *C. avellana* L., (Tukey 95%).

ANDRES *et. al.*, (1999) opinan que si bien la teoría de la germinación *in vitro* puede dar una estimación de la realidad al evaluar los porcentajes de germinación y el crecimiento del tubo polínico, en la práctica, este test da resultados de viabilidad inferiores debido a lo difícil que es encontrar el medio de cultivo adecuado para cada individuo.

No obstante, los tests de laboratorio pueden ser muy útiles para comparar variedades y para dar una primera aproximación del estado de una muestra de polen de una especie y las condiciones de nutrición y temperatura que precisa para germinar (ANDRES, *et. al.*, 1999).

El medio utilizado para germinación *in vitro* de los granos de polen almacenados de *C. avellana* L., fue el medio BK, ya que como mencionan ANDRES *et. al.*, (1999) generalmente se utilizan medios de germinación

basados en agar y sacarosa. Sin embargo, las concentraciones de sacarosa óptimas varían de acuerdo a la especie.

De acuerdo a lo mencionado por TAYLOR y HEPLER (1997), altas concentraciones de sacarosa no son adecuadas para la germinación *in vitro* debido a que las altas concentraciones pueden alterar la permeabilidad de la membrana del grano de polen, impidiendo el crecimiento adecuado del tubo germinativo.

TAYLOR y HEPLER (1997), mencionan que en medios altamente optimizados, el polen germinado *in vitro* sólo alcanzó el 30-40% del largo del tubo polínico alcanzado *in vivo*. Lo que concuerda con BAEZ (2000), quien determinó para el medio de germinación de granos de polen del género *Nothofagus*, porcentajes de sacarosa del 10% y menciona que la adición de estimulantes de la germinación como boro y calcio inhibirían la germinación de granos de polen de *Nothofagus*.

Los resultados de germinación de *C. avellana* L., fueron medidos al 4° día de incubación para uniformar el tiempo de medición de las muestras y por el desarrollo de hongos en los portaobjetos excavados, que dificultaban el conteo de los granos de polen germinado. Es probable que los bajos porcentajes de germinación de los granos de polen en estudio y el pequeño tamaño alcanzado por el tubo polínico, se deba a que requieren de más días de incubación.

STANLEY y LINSKENS (1974), mencionan que las concentraciones óptimas de sacarosa para la germinación *in vitro* de granos de polen de *C. avellana* L., serían de alrededor del 18% y no requerirían de la adición de otros componentes como boro. A lo que THOMPSON *et. al.*, (1997) agregan que el medio de germinación más efectivo es el de Van Tieghan usando 15% de sacarosa, lo que concuerda con los resultados obtenidos por JUNTAWONG y

DEEPRALAD (2001), autores que señalan que medios de germinación con un 15% de sacarosa arrojan los mejores porcentajes de germinación en granos de polen de *Capsicum frutescens* (L.), cv. Kheenuu.

Si observamos los porcentajes de germinación de cada una de las categorías en sus respectivos potreros por cultivar, veremos que para la selección clonal Santa Rosa (Figura 10) y para el cultivar Du Chilly (Figura 11), en general la tendencia es a disminuir a través del tiempo de almacenaje.

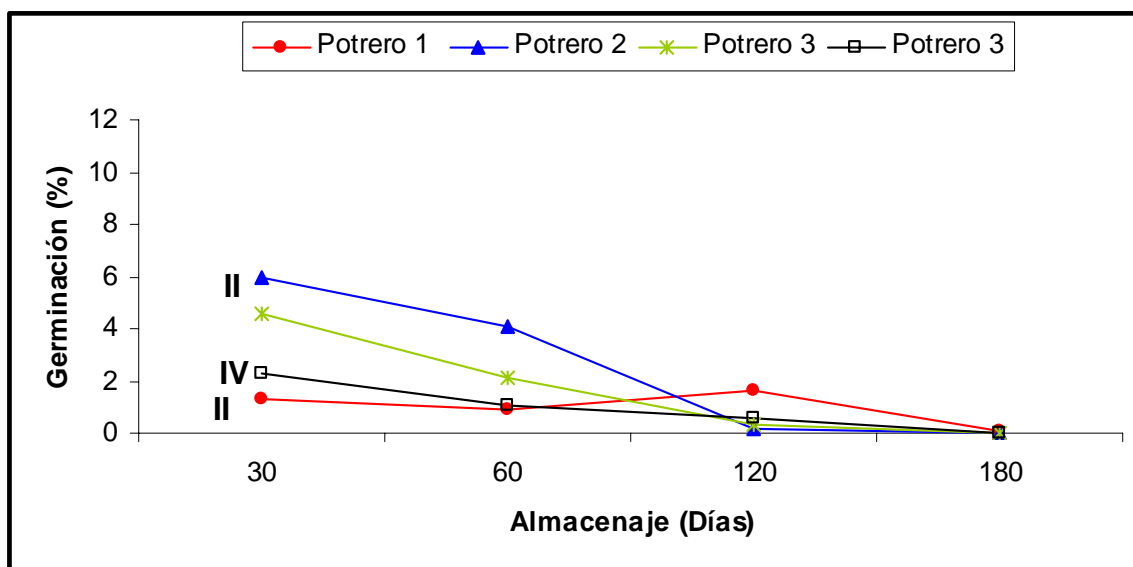


FIGURA 10 Germinación del polen de la selección clonal Santa Rosa, a través del tiempo de almacenaje.

STANLEY y LINSKENS, (1974) mencionan que existe una “estimulación mutua de crecimiento” entre la cantidad de granos de polen que podría afectar la capacidad para germinar. En los análisis de germinación de granos de polen de *C. avellana* L., la cantidad de ellos fue tomada la azar con aguja enmangada estéril, por lo cual, la cantidad de granos de polen expuesto al medio de germinación pudo no ser suficiente para alcanzar la estimulación mutua. Dicha

actividad fue observada en los conteos de polen germinados, ya que aquellos que lograban germinar se observaban en áreas donde el número de granos de polen era mayor.

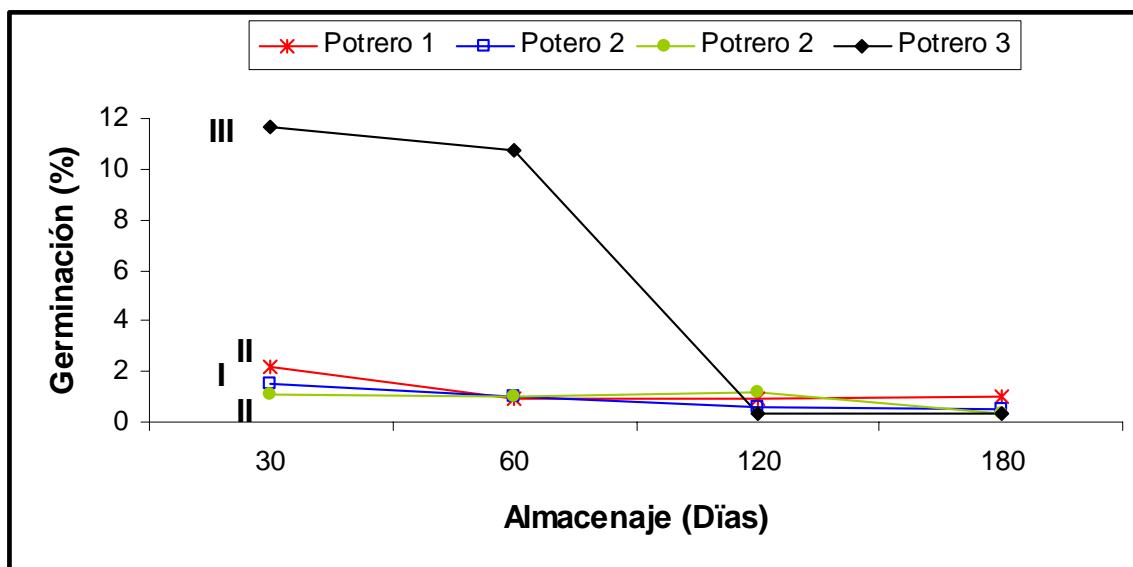


FIGURA 11 Germinación del polen del cultivar Du Chilly, a través del tiempo de almacenaje.

Se debe recordar que las plantas de *C. avellana* L. evaluadas carecieron de una fertilización base al momento de la plantación, lo cual pudo afectar su desarrollo (véase 4.1). Además, en general, el calcio y el boro juegan un rol importante en la germinación y crecimiento del tubo polínico (BREWBAKER y KWAK, 1963) y la falta de ellos afectarían considerablemente la germinación del polen de muchas especies.

Los granos de polen antes de la anthesis experimentan una deshidratación (TAYLOR y HEPLER, 1997). Por lo tanto, la temperatura y la humedad a las cuales los amentos son expuestos antes de la dispersión desde la planta, durante la extracción del polen en laboratorio, así como durante la germinación, afectarían el porcentaje de germinación (THOMPSON *et. al.*,

1997). BARNABAS y KOVACS (1997), agregan que la temperatura y la humedad relativa tendrían un rol clave en la mantención de la viabilidad después de la dispersión y que para la mayoría de las especies, humedades relativas bajas del aire (0-30%), favorecen la mantención de la viabilidad del polen.

La temperatura a la cual fueron incubadas las muestras de polen de *C. avellana* L., fue de 21° C y se mantuvo de forma constante durante los 4 días del proceso. Debido a que en la naturaleza las temperaturas fluctúan entre el día y la noche, es probable que los bajos porcentajes de germinación logrados en el ensayo de *C. avellana* L., se deban a que la temperatura de incubación no era la adecuada y que el grano de polen para germinar requiera de temperaturas fluctuantes y no constantes.

El grado de hidratación del polen después de la deshidratación producido por la liberación desde la antera, es específico para cada especie. Sin embargo, los rangos de contenido de humedad van desde 6-60%. El hecho de que el polen sea deshidratado no implica la pérdida de la viabilidad a menos que los cambios estructurales que ocurren durante dicho proceso, sean irreversibles a la rehidratación. Por lo tanto, las condiciones bajo las cuales ocurre la pérdida de agua, podrían afectar significativamente la subsiguiente adhesión y germinación del polen (TAYLOR y HEPLER, 1997).

BARNABAS y KOVACS (1997), mencionan que la mayoría de las familias registra valores de contenido de agua en los granos de pólenes vivos, después de la dispersión, entre 15% y 35%. Y que los granos de polen binucleado resisten más, por la presencia de una estructura protectora, el bajo contenido de agua en el plasma de la membrana y a la reducida actividad metabólica.

Los granos de polen que permanecen viables después de la deshidratación son tolerantes a la deshidratación que ocurre durante el almacenamiento, en cambio aquellos que pierden su viabilidad en forma paralela a la deshidratación, no son tolerantes a la desecación (BARNABAS y KOVACS, 1997). Sin embargo, por medio del test de diacetato de fluoresceína se determinó que la mayoría de las tasas de polen que son expuestas a condiciones de desecación (almacenamiento), sufre pérdidas de la integridad de sus membranas e invariablemente falla en la germinación

Por lo tanto, el agua juega un rol muy importante en la mantención de la integridad estructural y estabilidad de la membrana del grano de polen por medio de interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas. Existe una correlación positiva entre la disminución de la viabilidad del grano de polen y la disminución de los fosfolípidos de su membrana, de acuerdo a las condiciones de almacenaje. El tiempo después de la desecación en el cual se pueda aún recuperar la estructura de la membrana varía según la especie (BARNABAS y KOVACS, 1997).

Existen variadas formas de rehidratar un grano de polen. Sin embargo, la rehidratación gradual en aire húmedo es la más favorable (BARNABAS Y KOVACS, 1997). En base a ello y a estudios realizados por JUNTAWONG y DEEPRALAD (2001), sobre la prehidratación de granos de polen de *Capsicum frutescens* (L.), cv. Keheenuu, revelaron que la prehidratación del polen en cámara húmeda por 30 minutos incrementaba significativamente el porcentaje de germinación desde un 7,6 a 48,0. Los granos de polen almacenados de *C. avellana* L., en el presente estudio fueron rehidratados por medio de dicha técnica.

Del estudio se desprende que los bajos porcentajes de germinación de los granos de polen almacenados, tanto para el cultivar Du Chilly como para la

selección clonal Santa Rosa, no escapan de la lógica debido a que la humedad relativa de almacenaje fue de alrededor del 40%. Además, la recolección de los amentos analizados se realizó bajo condiciones de alta humedad relativa, ya que las muestras llegaron bastante húmedas y se debió exponer a medio ambiente cálido y seco para que los amentos liberaran el polen y así poder colectarlo.

No obstante, pareciera ser que aún en vista de todas las condiciones adversas algunos granos de polen como la categoría III, que presentó los porcentajes más altos de germinación, mantuvieron la integridad de sus membranas y favorecidos por la rehidratación aplicada en forma gradual, lograron germinar.

4.4 Llegada de polen al estigma de la flor

El recuento directo del polen en la superficie del estigma proporciona la información de la cantidad de granos de polen captado por la flor femenina. Esta evaluación se realizó en el potrero 3 para la selección clonal Santa Rosa y el cultivar Du Chilly (Anexo 28).

De los análisis estadísticos se obtuvo una media de granos de polen en la superficie del estigma de 18,7% para el cultivar Du Chilly y de un 11,2% para la selección clonal Santa Rosa (Cuadro 7).

DE BERASATEGUI, (1997) menciona que la cantidad de polen en la superficie del estigma está relacionada con el número de flores producidas, la disposición de las plantas y la dirección predominante del viento de la zona. Además, las condiciones climáticas preponderantes durante la dispersión del polen son un factor importante por su condición anemófila.

CUADRO 7 Medias de granos de polen presentes en el estigma, estilo, libre y extraño (de otra especie), para el cultivar Du Chilly y la selección clonal Santa Rosa, *C. avellana* L.

Variable	Cultivar	n (árboles)	Media (%)	Desviación tip. (%)	Error tip. de la media
Polen estigma	Santa Rosa	27	11,2852	13,2437	2,5488
Polen estilo	Santa Rosa	27	3,6222	6,6264	1,2752
Polen extraño	Santa Rosa	27	51,8852	32,9547	6,3421
Polen libre	Santa Rosa	27	33,8481	33,2909	6,4068
Polen total	Santa Rosa	27	100	100	100
Polen estigma	Du Chilly	18	18,7	21,1120	4,9761
Polen estilo	Du Chilly	18	4,3944	9,4651	2,2309
Polen extraño	Du Chilly	18	43,1611	30,9144	7,2866
Polen libre	Du Chilly	18	34,1389	30,5736	7,2063
Polen total	Du Chilly	18	100	100	100

Polen extraño: grano de polen de una especie diferente a *Corylus avellana* L., para el presente caso estos granos de polen pertenecían a *Nothofagus obliqua*, *Gevuina avellana* Mol, *Taraxacum officinalis*, *Pinus radiata* D. Don y *Salix caprea*.

A su vez el número de flores femeninas esta determinada por el nivel de luz que reciben las ramas de 1 año, el vigor de la rama del año y el origen de la rama del año.

Continuando con la cantidad de flores femeninas producidas, estas dependerán del número de yemas florales por rama, las cuales independiente de la edad de la planta o la variedad, incrementan con la longitud de la misma. Crecimientos anuales entre 20-35 cm son los más adecuados, ya que en las ramas de menos de 15 cm o más de 40 cm no hay prácticamente flores femeninas (DE BERASATEGUI, 1997).

En lo que concierne al número de flores producidas. tanto la selección clonal Santa Rosa como, el cultivar Du Chilly presentaban un número considerablemente bajo de flores femeninas por árbol muestreado, lo que

explicaría las bajas producciones de avellana alcanzada hasta ahora por las plantas. Dicha condición puede explicarse principalmente por la carencia de una fertilización base que supliera las necesidades básicas de una planta durante toda su vida y por la baja cantidad y calidad de luz que reciben las plantas de *C. avellana* L. del potrero 3, debido a la cortina de árboles y arbustos que rodean el potrero.

La disposición dada a las plantas de *C. avellana* L. entre sí y respecto a la dirección del viento predominante durante la polinización, es errónea (Figura 12) y es considerada una de las principales causas de la baja llegada de polen observada en los estigmas de las flores recolectadas. La disposición de las plantas respecto a los vientos predominantes durante la dispersión del polen debe ser ubicando los polinizantes en contra del viento predominante y frente a los cultivares productores, para lograr la llegada de polen al estigma de la flor.

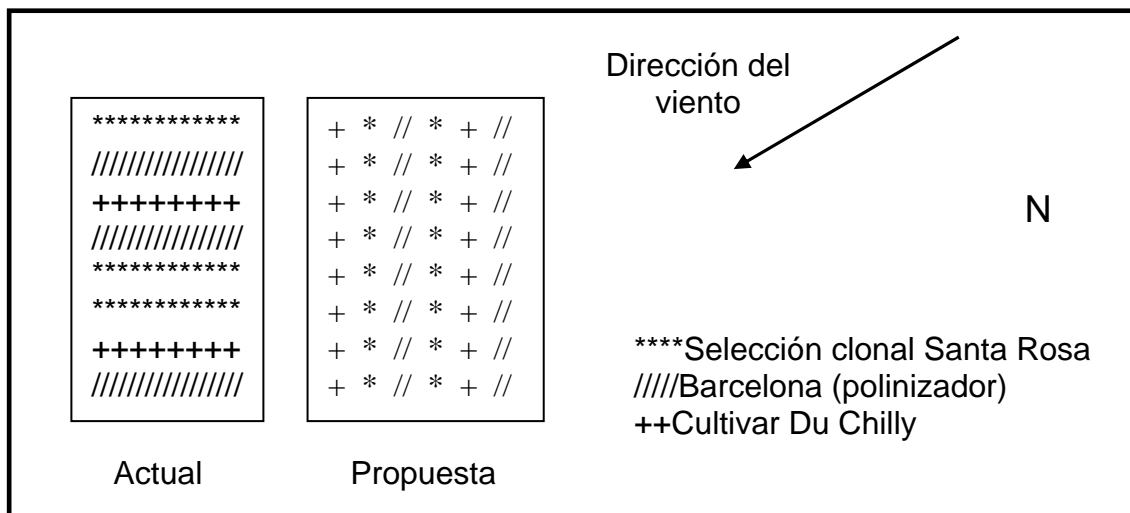


FIGURA 12 Disposición actual de los árboles de *C. avellana* L. y propuesta.

Además, árboles polinizantes deben encontrarse en un porcentaje de 15-20% (DE BERASATEGUI, 1997) y los cultivares productores no deben estar a más de 15-20 metros de un cultivar polinizante, debiéndose plantar 1 a 2 hileras de cultivares polinizantes contra el viento dominante de la variedad principal (GRAU, 2003). En el análisis efectuado en el potrero 3, las plantas se encontraban a 3 m sobre la hilera y a 5 metros entre hilera, encontrándose algunas hileras del frutal *C. avellana* L., a más de 20 m de un cultivar polinizante. Por lo tanto, la llegada de polen compatible a estos árboles será de muy bajos porcentajes o nula. Observándose con frecuencia la presencia de granos de polen germinados en el estigma con una protuberancia en su extremo distal, condición que indicaría la incompatibilidad del grano de polen con el estigma de la flor.

DE BERASATEGUI (1997), señala a las condiciones climáticas como uno de los factores de mayor relevancia al momento de la dispersión del polen, ya que dificultan la movilidad del polen y su llegada a las flores. Dicha condición es considerada en el estudio de *C. avellana* L., como otra de las principales causas de la baja llegada de polen a las flores de la selección clonal Santa Rosa y del cultivar Du Chilly, ya que el potrero muestreado presenta condiciones microclimáticas y físicas que favorecen el estancamiento de las neblinas (véase 4.1). Además, el predio en sí, se encuentra en un terreno adyacente al río, condición que favorece el desarrollo de neblinas y su permanencia en el lugar por periodos de tiempo más prolongados debido a las cortinas de árboles, arbustos y a la pendiente del terreno (véase 4.1).

Los brotes pueden originarse tanto de una yema vegetativa como, en la base de una yema floral. Cuando se forman en la yema floral, en general, poseen de 2 a 3 veces menos yemas florales que los provenientes de una yema vegetativa. Además, la presencia de frutos en desarrollo en una rama inhibe totalmente la inducción floral. Por otra parte, en ramas de igual origen y vigor,

las que reciben más luz poseen 2 a 3 veces más yemas florales que el resto (DE BERASATEGUI, 1997).

CASTRO *et. al.*, (1999) mencionan que dentro de los factores que promueven la longevidad del óvulo, germinación del polen y crecimiento del tubo polínico, destacan la temperatura ambiental y el estado nutricional de yemas, especialmente su contenido de boro. Lo que favorecería una buena germinación del polen y desarrollo del tubo polínico a través del estigma y estilo de la flor, hasta alcanzar el saco embrionario.

Una vez analizadas las muestras en laboratorio se obtuvo (Figura 13) una baja cantidad de polen germinado presente en la superficie del estigma de la flor (18,7% Du Chilly y 11,2% selección clonal Santa Rosa). Por lo cual se cree que de acuerdo a lo citado por CASTRO *et. al.*, (1999) respecto a los requerimientos de boro por el grano de polen en la superficie del estigma y a la deficiencia del mineral arrojados por los análisis de suelos, la baja cantidad de granos de polen germinados de *C.avellana* L. se deba a la deficiencia del mineral en la superficie del estigma.

A esto se suma la alta presencia de polen libre, granos de polen que se encontraban en la flor, pero no estaban adheridos al estigma (33,8% para la selección clonal Santa Rosa y 34,1% para el cultivar Du Chilly).

Además, se encontró una alta presencia de polen extraño (43,1% para el cultivar Du Chilly y 51,8% para la selección clonal santa Rosa), lo que se debe a la gran cantidad de árboles y arbustos que rodean el potrero. La gran cantidad de polen extraño presente, tanto en la selección clonal Santa Rosa como, en el cultivar Du Chilly puede ser sumada a la baja llegada de polen al estigma de *C. avellana* L., debido a que éste ocupa el lugar del polen de la especie de interés, interfiriendo con la adhesión del polen al estigma y quedando gran cantidad de

granos de polen libres, como ha sido observado en los conteos realizados a las muestras de *C. avellana* L.

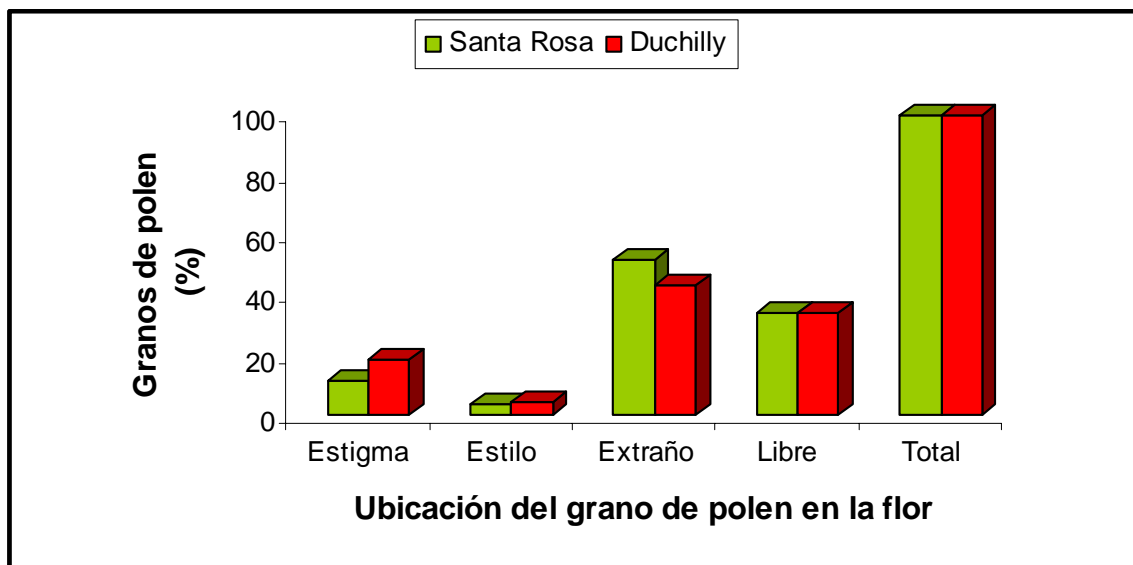


FIGURA 13 Distribución de los granos de polen de *C. avellana* L., en la superficie de la flor.

A las posibles causas de la baja llegada de polen sobre la superficie del estigma de la flor de *C. avellana* L., se suman los altos porcentajes de granos de polen no viables de los análisis de viabilidad (Anexo 16). Por lo tanto, de un total de granos de polen producidos y que logran llegar a la superficie del estigma, sólo una parte de ellos son granos de polen viables, de los cuales una parte es incompatible con el estigma y la otra no llega con el vigor necesario para lograr una germinación adecuada. A esto se deben sumar condiciones del lugar estudiado tales como: condiciones microclimáticas, edáficas y físicas, disposición de las plantas, vientos predominantes durante la polinización y condición nutritiva del frutal, donde el boro juega un rol importante.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que:

Se rechaza la hipótesis de esta investigación, ya que la llegada de polen al estigma de la flor es demasiado baja para lograr una polinización eficiente. La disposición actual de los árboles de *C. avellana* L. no permite la dispersión del polen de forma que este logre llegar a la superficie del estigma.

Tanto la selección clonal Santa Rosa, como el cultivar Du Chilly, poseen la viabilidad necesaria para lograr la germinación y posterior fecundación al cabo de 3 a 4 meses.

La viabilidad inicial de los cultivares (selección clonal Santa Rosa y cultivar Du Chilly), y la interacción potrero-cultivar no presentaron diferencias estadísticamente significativas, pero sí existen diferencias entre los potreros 1, 2 y 3.

El tiempo de almacenaje no tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la viabilidad del polen evaluado de *C. avellana* L. Sin embargo, existen diferencias estadísticamente significativas entre las categorías.

El tiempo de almacenaje sí tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la germinación del polen evaluado de *C. avellana* L. y sobre las categorías I, II, III y IV.

La viabilidad del polen de los árboles muestreados es adecuada para que estos puedan actuar como polinizantes. Sin embargo, los valores de germinación alcanzados son extremadamente bajos, lo cual indicaría que el medio de germinación utilizado en el ensayo no sería el óptimo para la germinación de los granos de polen de la especie *C. avellana* L.

La cantidad de granos de polen en la superficie del estigma fue baja, para la selección clonal Santa Rosa fue de 11,2% y para el cultivar Du Chilly 18,7%.

La mala disposición de los árboles entre si y respecto al viento predominante durante la polinización, son condiciones que provocarían la baja disponibilidad de polen sobre la superficie del estigma. A estas condiciones se suman la cortina de árboles presente en dos lados del potrero que afectarían el flujo del polen una vez liberado desde la antera.

En base a los datos recopilados en el presente estudio se recomienda evaluar las condiciones nutricionales de las plantas de los tres potreros.

Para el caso del potrero 3 se establece que la disposición de las plantas no es la más adecuada para el desarrollo de una polinización eficiente, por lo cual se recomienda evaluar la posibilidad de aumentar la participación de los polinizantes intercalándolos entre las plantas receptoras de polen.

En cuanto a las condiciones del medio que presenta el potrero 3 se recomienda la eliminación de la cortina de árboles presentes en el potrero que estaría interfiriendo con el adecuado desarrollo de las plantas (luz), y con el proceso de polinización (estancamiento de neblinas).

6. RESUMEN

Se determinó la viabilidad y germinación *in vitro* del polen de *Corylus avellana* L., estudio planteado en base a la importancia que ha llegado a adquirir la especie en la fruticultura de la zona sur del país. La región, debido a sus condiciones climáticas se ha limitado principalmente a la explotación ganadera y lechera. El avellano europeo adaptándose a condiciones de clima lluvioso y bajas temperaturas, posibilita a la región la explotación de la fruticultura que hasta ahora se ha limitado a producciones frutícolas de manzanos y berries como el cranberry, frambuesas y arándanos. El trabajo experimental se efectuó entre julio 2004 y enero 2005 en el laboratorio del Instituto de Botánica, ubicado en el campus Isla Teja de la Universidad Austral de Chile, en Valdivia.

Para la evaluación de la viabilidad y germinación *in vitro* del polen de *C. avellana* L., se dispuso del polen de árboles de un predio particular de la zona de Antilhue. Al polen se aplicaron pruebas de tinción con p-fenilendiamina, evaluando el efecto del cultivar Du Chilly, de la selección clonal Santa Rosa y de los potreros (1, 2 y 3) sobre la viabilidad del polen. De los resultados obtenidos se clasificaron los árboles en categorías I, II, III y IV. Enseguida se evaluó la viabilidad de las categorías a través del tiempo de almacenaje (30, 60, 120 y 180 días) a 4° C. Y en forma paralela se realizaron los análisis de germinación *in vitro* del polen de las categorías, utilizando como medio nutritivo el medio de Brewbaker-Kwack modificado. Finalmente se evaluó la llegada de polen a la superficie del estigma bajo lupa (40X) utilizando como medio de contraste lactofenol.

La viabilidad del polen de los árboles de *C. avellana* L., presentó diferencias estadísticamente significativas entre los potreros 1, 2 y 3 (73%; 66,3% y 30,8%, respectivamente). El tiempo de almacenaje no tuvo un efecto significativo sobre la viabilidad del polen de las categorías, sin embargo existieron diferencias entre las categorías I, II, III y IV (99,4%, 60,5%, 60,4% y 44,5%, respectivamente). La germinación del polen de *C. avellana* L., se vio afectada significativamente por el tiempo de almacenaje y se presentaron diferencias entre las categorías I, II, III y IV con medias de germinación de 0,9%, 1,4%, 6,1% y 0,6%, respectivamente.

Los altos porcentajes de viabilidad, los bajos porcentajes de germinación alcanzados por las categorías y el efecto significativo del tiempo de almacenaje sobre la germinación *in vitro* del polen, indicarían que el medio de germinación seleccionado en laboratorio no sería el más adecuado para la especie en estudio.

La baja llegada de polen a la superficie del estigma (11,2% selección clonal Santa Rosa y 18,7% cultivar Du Chilly) se debería a la mala disposición de las plantas entre si y a la dirección del viento predominante durante la polinización. Además existen condiciones físicas y edáficas del potrero evaluado que dificultan el flujo del polen una vez liberado de la antera.

SUMMARY

The viability was determined and *in vitro* germination of pollen of *Corylus avellana* L., study raised on the basis of the importance that has gotten to acquire the species in the fruitgrowing of the South zone of the country. The zone, due to its climatic conditions has been limited mainly, to the cattle and milk operation. The European hazel adapting to conditions of rainy climate and losses temperatures, makes possible to the region the operation of the fruitgrowing that until now has limited fruit productions of apple trees and berries like cranberry, raspberries and bilberries. The experimental work took place between July 2004 and January 2005 in the laboratory of the Institute of Botany, located in the campus Island Teja of the Austral University of Chile, in Valdivia.

For the evaluation of the viability and *in vitro* germination of they pollen of *C. avellana* L., was had pollen of trees of a particular field of the zone of Antilhue. To they pollen were applied to tests of dye with p-phenyldiamine, evaluating the effect of cultivating Du Chilly, of the clonal selection Santa Rosa and of the orchards (1, 2 and 3) on the viability of they pollen. Of the obtained results the trees in categories I classified themselves, II, III and IV. Immediately the viability of the categories through the time of storage (30, 60, 120 and 180 days) to 4° C. And in parallel form the analyses of germination *in vitro* were made of pollen of the categories, using like nutritious means means of modified Brewbaker-Kwack. Finally the arrival was evaluated of pollen to the surface of stigma under magnifying glass (40X) using as average of resistance lactophenol.

The viability of pollen of the trees of *C. avellana* L., appeared statistically significant differences between orchards 1, 2 and 3 (73%; 66,3% and 30.8%, respectively). The time of storage did not have a significant effect on the viability of pollen of the categories, nevertheless existed differences between categories I, II, III and IV (99.4%, 60.5%, 60.4% and 44.5%, respectively). The germination of pollen of *C. avellana* L., was affected significantly by the time of storage and differences between categories I, II, III and IV with averages of germination of 0.9%, 1.4%, 6.1% and 0.6% appeared, respectively.

The high percentage of viability, the low percentage of germination reached about the categories and the significant effect of the time of storage on the *in vitro* germination of pollen, would indicate that the means of selected germination would not be adapted for the species in study.

The low arrival of pollen to the surface of stigma (11.2% selection clonal Santa Rosa and 18.7% to cultivate Du Chilly) would have to the bad disposition of the plants between if and to the predominant wind direction during the pollination. In addition physical training conditions exist and edafics of the evaluated orchard that makes difficult the flow of pollen once released of the anther.

7. BIBLIOGRAFIA

- AIZEN, M. y ROVERE, A. 1995. Does pollen viability decrease with aging?. A cross – population examination in *Austrocedrus chilensis* (Cupressaceae). *International Journal Plant Science* 156(2): 227-231.
- ANDRES, M RODRIGUEZ, J y DURAN, J. 1999. Viabilidad del polen de albaricoquero. *Producción y Protección Vegetal (España)* 14(1-2): 25-32.
- ALEXANDER, M. 1980. Differential staining of aborted and non-anorted pollen. *Stanin Technology (U.S.A)* 44: 117-122.
- BAEZ, P. 2000. Análisis fisiológico y morfológico de los granos de polen en cuatro especies del género *Nothofagus*. Tesis Lic. Cs. Bio. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias. 172 p.
- BARNABAS, B. y KOVACS, G. 1997. Storage of pollen. In: Shivanna, K. R. y Sawney, V. K. (eds). *Pollen biotechnology for crop production and improvement*. Cambridge. (Inglaterra). 293-313.
- BARON, L. , RIGGERT, C. , STEBBINS, R. y BELL. S. 1995. El cultivo del Avellano europeo. *Aconex (Chile)* (49): 26-29.
- BARON, L. , RIGGERT, C. , STEBBINS, R. y BELL. S. 1997. El cultivo del Avellano europeo. *Chile Hortofrutícola. (Chile)* 8(45): 33-35.

- BASTIAS, R. y GRAU, P. 2004. Conozca los mejores polinizantes para la región del Bío Bío. Avellano europeo. <http://www.inia.cl/quilamapu/pubbycom/informativos/info_82.htm> (15 agos. 2004).
- BREWBAKER, J.L. y KWAK, B.H. 1963. The essential role of calcium ion in pollen gemination and pollen tube growth. *American Journal of Botany*. (USA) 50:859-865.
- CABELLO, P. 2003. Viabilidad polínica en dos estados florales de Maqui, *Aristotelia chilensis* (MOL.) Stuntz. (Elaeocarpaceae). Tesis Lic. Agro. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 72 p.
- 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.) Webb). *Ciencia e Investigación Agraria*. Santiago (Chile) 26 (2): 61-66.
- CORFO. 1983. Propagación de algunas especies frutales de interés para el sur de Chile: manzano, castaño y avellano europeo. Corporación de fomento de la producción de Chile. (CORFO). (Chile). 84 p.
- DAFNI, A. y FIRMAGE, D. 2000. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. In: Dafni, A. Hesse, M. y Pacini, E. (eds). *Pollen and pollination*. Springer Verlage. Viena, (Austria). 113-132.
- DE BERASATEGUI, L. 1997. El avellano en la Argentina. Información técnica Nº 13. Estación Experimental Agropecuaria Valle Infeior del Río Negro. Convenio IDEVI-INTA. 64 p.

- FONT QUER, P. 1970. Diccionario de botánica. Labor. Barcelona, (España). 1244 p.
- FRANKEL, R. y GALUM, E. 1977. Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding. In: Monographs on theoretical and applied genetics 2. Springer-Verlag, Berlín. 281 p.
- GATEN, T. 2000. Pollen is?. <<http://www.le.ac.uk/biology/research/pollen/pollenis.html>> (15 oct. 2004).
- GIL-ALBERT, F. 1980. Tratado de arboricultura frutal. Volumen 1. Aspectos de la morfología y fisiología del árbol frutal. Mundipersa, Madrid, (España). 103 p.
- GRAU, P. 2001. El Avellano europeo. Un fruto de nuez especialmente para la zona centro sur. Informativo Agropecuario. Bioleche- INIA QUILAMPU. <<http://www.inia.cl/quilamapu/pubbycom/bioleche/boletin2001/BOLETIN56.html>> (15 nov. 2004).
- GRAU, P. 2003. Avellano europeo. Manual de Plantación y Manejo. Centro regional de Investigación Quilamapu. Chillán, (Chile). 90 p.
- GUERRERO, J. y LOBOS, W. 1987. *Xanthomonas campestris* pv. *corylina*, agente causal del tizón bacteriano o Bacteriosis del Avellano europeo, en la IX Región, Chile. Agricultura Técnica (Chile) 47(4): 422-426.
- HOLMAN, R. y ROBBINS, W. 1961. Botánica general. Hispano Americana, México. 632 p.

INFOAGRO. 2005. El cultivo de la avellana. <http://www.infoagro.com/frutas/frutos_secos/avellana.htm> (03 feb. 2005).

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (INIA). 2004. El cultivo del avellano (*Corylus avellana*). Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro Regional de Investigación La Platina. Fundación para la innovación Agraria. FIA. <http://www.inia.cl/platina/pubbycom/charlas/docs/glemus_avellano.pdf>. (25 agos. 2004).

JEAN-PROT, P. 1970. La botánica y sus aplicaciones agrícolas. Mundi-persa. Madrid, (España). 534 p.

JUNTAWONG, N. y DEEPRALAD, K. 2001. Effects of prehydration, sucrose concentration and developmental stage of anther on pollen germination of Chili cv. Kheenuu (*Capsicum frutescens* L. Cv. Kheenuu). Publicación 38. <<http://www.rdi.ku.ac.th/html/PUBLIC38.html>> (5 sep. 2004).

KEARNS, C e INOUYE, D. 1993. Techniques for pollination biologist. University Press. Of Colorado. (USA). 581 p.

KELLY, J. RASH, A. y KALISZ, S. 2002. A method to estimate pollen viability from pollen size variation. American Journal of Botany (U.S.A) 98(6): 1021-1023.

MASCARENHAS, J. 1975. The biochemistry of angiosperm pollen development. The Botanical Review (USA) 41(3): 259-314.

MEDEL, F. 1986. Requerimientos climáticos y edáficos para las especies frutales en el sur de Chile. Agro Sur (Chile) 14(3): 48-56.

- MEDEL y ORUETA. 1986. Estados fenológicos y adaptabilidad climática de las especies frutales arbóreas en el sur de Chile. *Agro Sur (Chile)* 14(2): 89-94.
- METEOCHILE. 2006. Climas de Chile. X Región. <http://www.meteochile.cl/climas/climas_decima_region.html> (20 agos 2004).
- MONTGOMERY, D. 2005. Diseño y análisis de experimentos. Limusa, (México). 2 ed. 686 p.
- NORWEGIAN BOTANICAL ASSOCIATION. 2006. Norsk Botanisk Forening. <http://www.toyen.uio.no/botanisk/nbf/plantefoto/corylus_avellana_Gunnar_Engan01.jpg> (10 ene 2005).
- OVIEDO y DURAN. 2000. Estudio sobre la viabilidad del polen en las principales variedades comerciales de caña de azúcar de Costa Rica. Dirección de investigación y extensión de la Caña de Azúcar, DIECALAICA. (Costa Rica). 275 p.
- PARRA, C. 2005. Requerimientos de boro y suma de bases del avellano europeo. Comunicación personal. innovación@surnet.cl.
- PLANTYFOLIA. 2006. <<http://www.plantyfolia.com/fiches106-120/page12.php>> (10 ene 2005).
- REIZE,F. 2005. Fertilizaciones anuales realizadas en el predio. Comunicación personal.
- RODRIGUEZ-RIANO, T. y DAFNI, A. 2000. A new procedure to asses pollen viability. Short communication. *Sex Plant Report*. 12: 241-244.

- RUSSEL, J. y RUSSEL, W. 1959. Las condiciones del suelo y las necesidades de la planta. Madrid, (España). 2° ed. 771 p.
- SEILER, G y OLSON, M. 1999. Pollen germination of wild sunflower species. <http://www.ars.usda.gov/research/publications/Publications.html/sep_no_115=99743> (10 ene. 2005).
- SHIVANNA, K.R. y RANGASWAMY, N. S. 1992. Pollen biology. A laboratory Manual. Springer Verlag. Berlín. 119 p.
- SONG, Z. P. LU, B. R. y CHEN, J. K. 2001. A study of pollen viability and longevity in *Oryza rufipogon*, *O. Sativa*, and their hybrids. Genetics resources 26(2): 31-34.
- STANLEY, C. y LINSKENS, H.F. 1974. Pollen Biology. Springer Verlag. Berlín. 119 p.
- STONE, J. THOMSON, J. Y DENT-ACOSTA, S. 1995. Assessment of pollen viability in hand pollination experiments: a review. American Journal of Botany (U.S.A) 82(9): 1186-1197.
- STRASBURGER, E. NOLL, F. SCHENCK, H. y SCHIMPER, A. 1994. Tratado de botánica. 8° Ed. Castellana. Omega. Barcelona, (España). 1068 p.
- TAYLOR, L. y HEPLER, P. 1997. Pollen germination and tube growth. Annual review plant physiology, plant molecular and biology. 48:461-491.
- THOMPSON, M., LAGERSTEDT, H. y MEHLENBACHER, S. 1997. Hazelnuts. In: Wiley, J. y Sons, I. Fruit breeding. Volume III. Nuts. (USA). 125-184.

- TORRES, A. 1994. Ficha Hortofrutícola para la IX Región de la Araucanía. IPA Carillanca (Chile) 13(2): 50-52.
- UNIVERSIDAD DE BERN. 2006. Plant science. <<http://www.jps.unibe.ch/paleo/pollen/b18.htm>> (10 ene 2005).
- UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE. s/f. Guía de consultas botánicas II. Facultad de ciencias exactas y naturales y agrimensura (UNNE). Hamamelidae- Betulaceae. <<http://www.biología.edu.ar/diversidad~/Gu%C3%Ada%20de%20Consultas.%20Fasc%C3%Adculo%20III%20Angiospermas/12%20Betulaceae.pdf>> (11 ene. 2005).
- VALENZUELA, J. LEMUS, G. y LOBATO, A. 2001. Avellano europeo. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro Regional de Investigación La Platina. Curso Frutales de Nuez no Tradicionales: Macadamia, Pistacho, Pecano, Avellano europeo. Santiago, (Chile). pp: 68-86.
- VALENZUELA, J. REGINATO, G. y GRAU, P. 2002. Evaluación de polinizantes chilenos para avellano europeo var. Tonda Gentile delle Lanhe (*Corylus avellana*). PROFO Innovación. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago. Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro Regional Quilamapu. <http://www.ediho.es/horticom/tem_aut/cd/Latinoamérica/fruticultura/234.htm> (05 oct. 2004).
- VALENZUELA, J. LEMUS, G. y LOBATO, A. 2003. El avellano europeo. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro Regional de Investigación La Platina. Encuentro Frutales de Nuez: Mercado y Tecnología. Santiago, (Chile). pp: 42-53.

VIÑAS, M. 2004. Betuláceas. Avellano *Corylus avellana*. L. <http://www.e-rinitis.com/polinosis/pdf.zip/4_2_betulaceas.pdf> (15 dic. 2004).

ANEXOS

Anexo 1 Valor nutricional de la avellana por 100 g de materia seca.

Componente	%
Agua	5-6
Lípidos	55-72
Proteínas	10-22
Carbohidratos	3-11
Fibra	5-7
Minerales	2-3
Calorías	600

FUENTE: INFOAGRO, (2005).

Anexo 2 Producción de avellanas año 2001 para los principales países productores.

País	Producción de avellanas año 2001 (toneladas)
Turquía	630.000
Italia	120.000
Estados Unidos	43.540
España	26.200
República de Azerbaiyán	15.000
China	11.000
República islámica de Irán	11.000
Francia	5.000
Georgia	2.500
Gracia	2.500
Federación Rusia	2.000
Belarús	1.800
Kirguistán	1.650
Tayikistán	1.100
República de Moldova	850
Portugal	800
Hungría	200
Camerún	100

FUENTE: INFOAGRO, (2005).

Anexo 3 Estimadores climáticos para el avellano europeo.

Estimador climático	Limitación severa	Limitación moderada	Sin limitación
Radiación (Kcal/cm ² /año)	< 100	100-110	> 110
Temperatura anual (°C)	< 11	11-12	> 12
Hora frío (Nº)	< 600	600-800	> 800
Temperatura verano (°C)	< 14	14-15	> 15
Período térmico vegetativo (meses)	< 5	5-6	> 6
Período libre de heladas (meses)	< 4	4-5	> 5
Precipitación anual (mm)	< 600	600-800	> 800
Precipitación de primavera-verano (mm)	< 300	300-600	> 600
Período seco (meses)	> 4	2-4	< 2

FUENTE: MEDEL, (1986).

Anexo 4 Estimadores edáficos para el avellano europeo.

Estimador edáfico	
Profundidad (cm)	60-150
Textura	Media
Drenaje	Buena
pH	5,5-7,5

FUENTE: MEDEL, (1986).

Anexo 5 Resumen de plagas y enfermedades que afectan a *C. avellana* L.

Enfermedad	Agente causal	Síntomas y/o signos	Control
Plaga	<i>Aegorhinus superciliosus</i> (Cabrito de los frutales)	Larvas atacan tejidos conductores de las raíces	Organismos entomopatógenos
Plaga	<i>Callisphyrus</i> sp. (Sierra)	Larva, galerías en ramas con la caída de ellas	
Plaga	<i>Myzocallis corylii</i> (Pulgón)	Debilitamiento gral. por alimentación del insecto	Control natural
Plaga	<i>Nezara viridula</i> (Chinche)	Daño ocasionado en frutos en formación	
Plaga	<i>Tettigades chilensis</i> (Chicharra)	Daño en ramillas por ovipostura	
Plaga **	<i>Archips rosana</i> (Enrollador de las hojas)	Hojas enrolladas y disminución de brotes fructíferos	
Plaga **	<i>Corylobium avellanae</i> (Pulgones) <i>Haplidia etrusca</i> (Haplidia)	Debilitamiento gral. por alimentación del insecto y de las larvas y lesiones al sistema radicular por adultos	Microhimenótero <i>Tryoxis pallidus</i>
Plaga **	<i>Curculio nucum</i> L. (Diabló)	Larvas se alimentan de frutos y provocan su posterior caída	
Plaga **	<i>Melissopus latiferreanus</i> (Polilla americana)	Larvas penetran las avellanas tiernas, se alimentan y las destruyen	
Plaga **	<i>Operopthera brumata</i> (Falena inverna)	Destrucción de yemas y enrollamiento de las hojas llegando a la defoliación en ataques severos	
Plaga **	<i>Ozerea linearis</i> (Capricornio del avellano)	Desecamiento de brotes terminales, galerías subcorticales, en forma de anillo alrededor de las ramas	

...Continuación Anexo 5.

Plaga **	<i>Phytoptus avellanae</i> (Aborto de las yemas o badoc)	Dependiendo de las variedades: invasión de las yemas fructíferas o vegetativas, amentos deformados rígidos y quebradizos y caída del fruto	
Plaga**	<i>Piezodorus lituratus</i> , <i>Gonocerus acueangulatus</i> , <i>Palomina prasina</i> , <i>Raphigaster nebulosa</i> , <i>Corythuca salicata</i> , <i>Lygaeus pandurus</i> , <i>Dolycorus baccarum</i> y <i>Carpocoris pudicus</i>	Daño en frutos en formación en su calidad y peso de los mismos	
Plaga **	<i>Recurvaria nanilla</i> (Polilla de las yemas de los frutales)	Yemas florales y foliares son vaciadas y destruidas	
Agalla de la raíz	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Formación de agallas en raíces	Evitar asfixia radicular, exceso de humedad
Podredumbre radical	<i>Armillaria mellea</i> <i>Rosellinia necatrix</i>	Desarrollo débil, hojas amarillas, etc.	
Pudrición de las raíces	<i>Phytophthora infestans</i>	Ataque al sistema vascular de la planta	Evitar exceso de humedad
Mal del desgarro ***	<i>Cytospora corylicola</i>	Sobre ramas manchas pardo-rojizo y posterior necrosis de tejidos corticales	Fertilización equilibrada, evitar suelos calurosos y secos en verano y lesiones de la corteza por frío, insectos, podas, etc.
Gloesporiosis del avellano **	<i>Gloesporium corylii</i>	Amentos pardo oscuro, seguido de necrosis de la inflorescencia completa y yemas y ramas afectadas se secan y mueren	Eliminar fuente de inóculo: restos de plantas, yemas y ramas

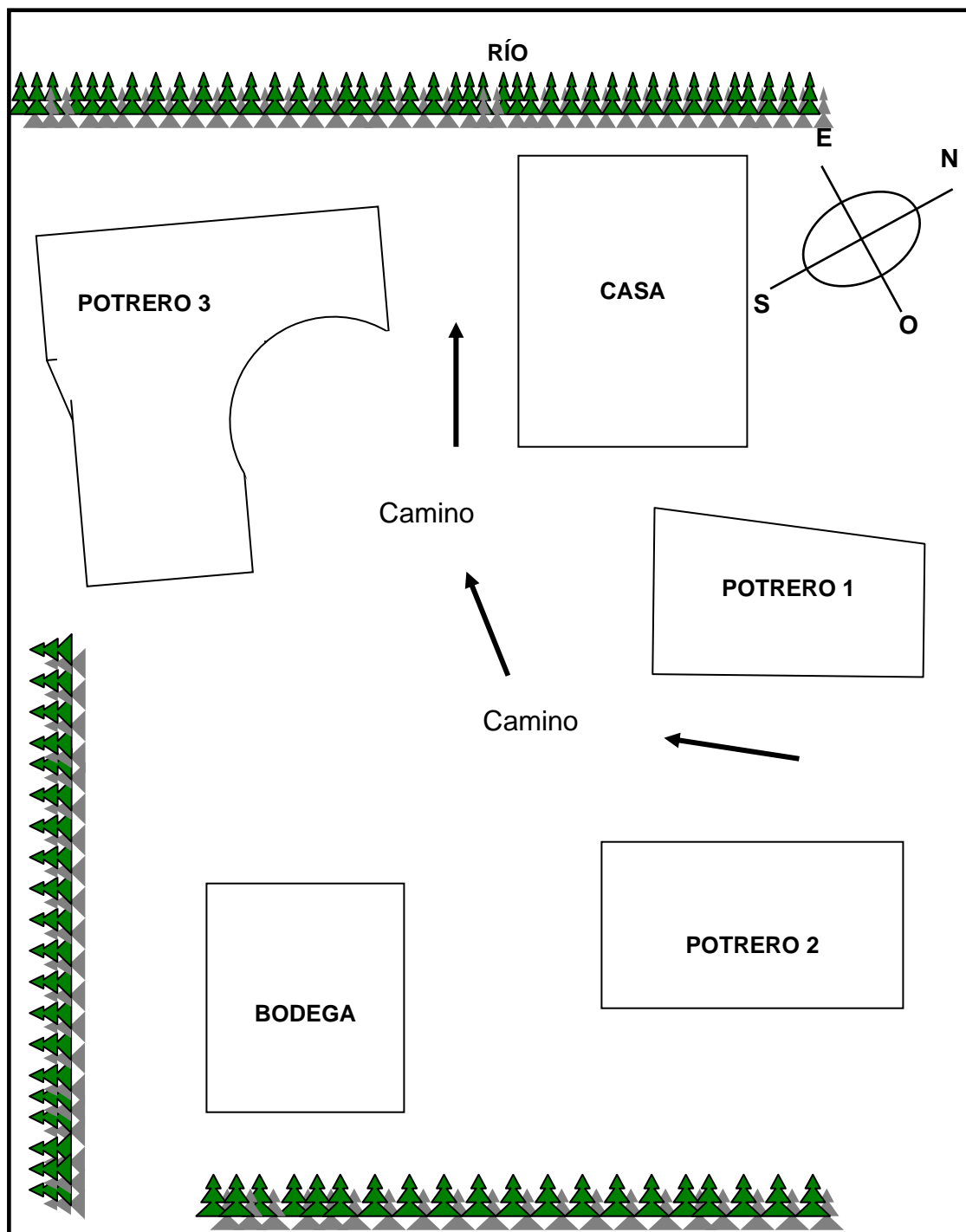
...Continuación Anexo 5.

Oidio **	Phyllartinia corylea	Sobre las hojas se observa el hongo como un depósito blanco-grisáceo un tanto voluminoso y caída prematura del fruto	
Desordenes fisiológicos	Avellanas vacías o con grano arrugado	Aborto seminal, polinización deficiente, fecundación alterada	
Desordenes fisiológicos	Manchas pardas	Zonas de la cáscara blandas, humedecimiento y descomposición del fruto	
Desordenes fisiológicos	Amentos y glomérulos en grupos	Agrupación, elongación, sin producción de polen y necrosis	Evitar estrés por altas temperaturas en la inducción floral
Desordenes fisiológicos	Amentos deformes	Crecimiento anormal, amento de > tamaño y sin producción de polen, necrosis	Evitar estrés por altas temperaturas en la inducción floral

****Plagas y enfermedades no presentes en Chile.**

FUENTE: GRAU, (2003) y VALENZUELA *et. al.*, (2003), modificado por Aragón, (2004).

Anexo 6 Esquema del predio desde el cual se extrajeron las muestras de polen de la selección clonal Santa Rosa y del cultivar Du Chilly, *C. avellana* L.



Anexo 7 Composición de los reactivos de tinción con p-fenilendiamina, lactofenol, medio de cultivo Brewbaker y Kwack y medio nutritivo Brewbaker y Kwack modificado.

El reactivo de tinción p-fenilendiamina consiste de un indicador de peroxidasa (Sigma 390-1) y 200 μ L al 3% de peróxido de hidrógeno (1:9, 30% peróxido de hidrógeno y una solución salina buffer de fosfato a pH 7,4) adicionada a una solución buffer de 50 mL de Trizmal 6,3 precalentada a 37° C, la cual fue preparada por una mezcla concentrada buffer de Trizmal 6,3 (Sigma 90-3 C) con agua desionizada 1:9 (RODRIGUEZ-RIANO y DAFNI, 2000).

La solución debe almacenarse de inmediato en el refrigerador en envases de vidrio ámbar, pues el reactivo es fotosensible, por lo tanto su almacenaje fue en oscuridad absoluta. Esta solución puede permanecer durante 15 a 20 días sin sufrir alteraciones bajo las condiciones descritas (RODRIGUEZ-RIANO y DAFNI, 2000).

El lactofenol contiene: 20 mL de fenol, 40 mL de glicerina, 20 mL de agua y 20 mL de ácido láctico. Por cada 100 mL de lactofenol se adicionan 1-5 mL (1%) de solución acuosa de anilina azul.

El medio BK contiene 10% de sacarosa, 100 mg/L H_3BO_3 (ácido bórico), 300 mg/L $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ (nitrato de calcio), 200 mg/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (sulfato de magnesio heptahidratado), 100 mg/L KNO_3 (nitrato de potasio), todo disuelto en agua destilada (KEARNS e INOUE, 1993).

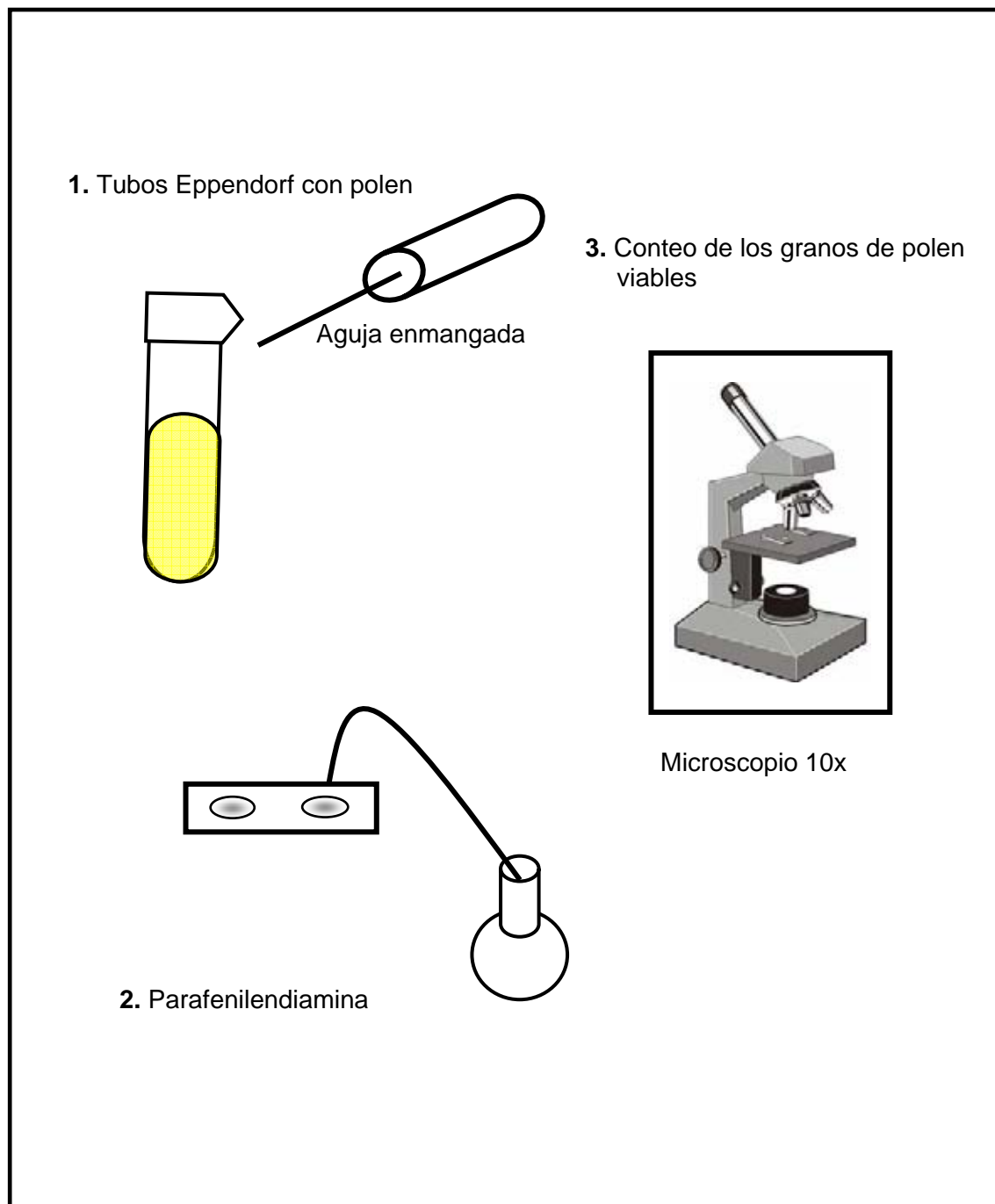
Los medios de cultivo BK modificados son:

- Medio BK A. 10% sacarosa, 10 mg/L ácido bórico, 362 mg/L cloruro de calcio y 100 mg/L nitrato de potasio (SHIVANNA y RANGASWAMY, 1992).

- Medio BK B . 20% sacarosa, 100 mg/L ácido bórico , 400 mg/L nitrato de calcio, 100 mg/L nitrato de potasio, 200 mg/L sulfato de magnesio, 4,86 g/L TAPS (SHIVANNA y RANGASWAMY, 1992).

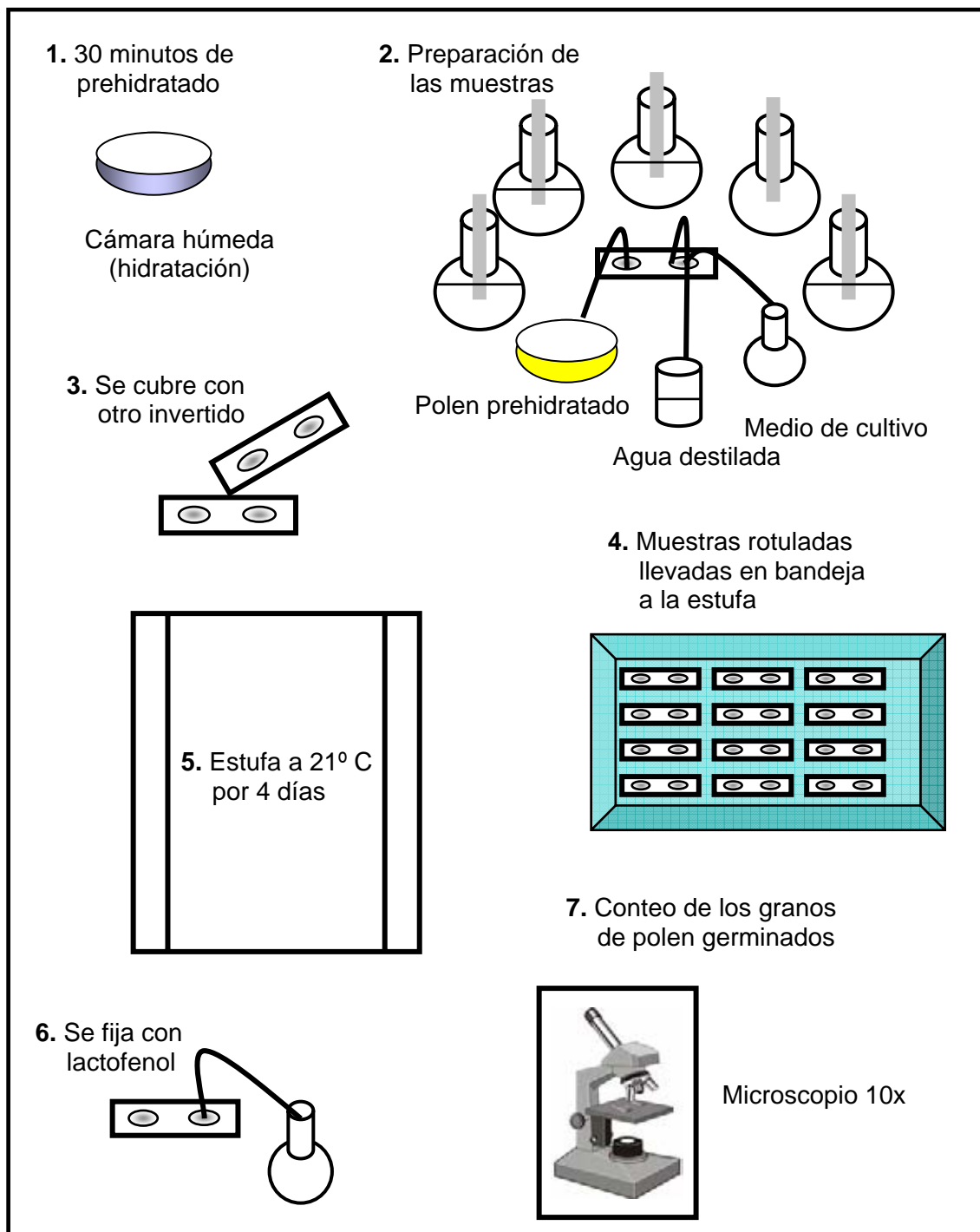
Se debe recordar que se realizaron pruebas de germinación con los tres medios mencionados en los párrafos anteriores y que finalmente se optó por el medio nutritivo BK tipo A.

Anexo 8 Pasos a seguir en la aplicación de la metodología de RODRIGUEZ-RIANO y DAFNI (2000), usada para la tinción con p-fenilendiamina.



FUENTE: RODRÍGUEZ-RIANO y DAFNI, (2000), modificado por Aragón, (2004).

Anexo 9 Pasos a seguir en la aplicación de la metodología KEARNS e INOUYE (1993), usada para la determinación de porcentaje de germinación.



FUENTE: KEARNS e INOUYE, (1993), modificado por Aragón (2004).

Anexo 10 Árboles muestreados de la selección clonal Santa Rosa y el cultivar Du Chilly de *C. avellana* L., para cada uno de los potreros (1, 2 y 3).

	Número de árboles muestreados			
	Potrero 1	Potrero 2	Potrero 3	Total
Santa Rosa	16	15*	12	43
Du Chilly	14**	14	14***	35

*Árbol 3, amento ya había liberado el polen.

**Árboles 3, 5 y 14 sus amentos estaban inmaduros, por lo tanto sin polen que recolectar.

Árbol 9 el amento ya había liberado el polen.

***Árbol 14, amento ya había liberado el polen.

Anexo 11 Tablas con los valores obtenidos de la medición inicial de viabilidad del polen de *C. avellana* L., selección clonal Santa Rosa en los potreros 1, 2 y 3.

Árbol 1		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	993	79,2
No viable	11	0,9
Abortado	250	19,9
Total	1254	100

Árbol 2		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	1063	89,4
No viable	5	0,4
Abortado	121	10,2
Total	1189	100

Árbol 3		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	1152	78,7
No viable	4	0,3
Abortado	307	21,0
Total	1463	100

Árbol 4		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	333	76,9
No viable	19	4,4
Abortado	81	18,7
Total	433	100

...Continuación Anexo 11.

Árbol 5		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	1151	75,0
No viable	19	1,2
Abortado	365	23,8
Total	1535	100

Árbol 6		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	506	69,9
No viable	33	4,6
Abortado	185	25,6
Total	724	100

Árbol 7		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	1424	77,2
No viable	82	4,4
Abortado	338	18,3
Total	1844	100

Árbol 8		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	962	59,2
No viable	3	0,2
Abortado	660	40,6
Total	1625	100

Árbol 9		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	1480	70,2
No viable	19	0,9
Abortado	608	28,9
Total	2107	100

Árbol 10		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	914	67,8
No viable	4	0,3
Abortado	431	31,9
Total	1349	100

Árbol 11		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	1228	61,1
No viable	12	0,6
Abortado	771	38,3
Total	2011	100

Árbol 12		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	864	79,1
No viable	5	0,5
Abortado	223	20,4
Total	1092	100

...Continuación Anexo 11.

Árbol 13		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	1544	65,3
No viable	260	11,0
Abortado	560	23,7
Total	2364	100

Árbol 14		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	1084	57,7
No viable	88	4,7
Abortado	706	37,6
Total	1878	100

Árbol 15		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	1555	70,1
No viable	54	2,4
Abortado	610	27,5
Total	2219	100

Árbol 16		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	1175	66,2
No viable	38	2,1
Abortado	561	31,6
Total	1774	100

Árbol 1		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	933	64,5
No viable	17	1,2
Abortado	496	34,3
Total	1446	100

Árbol 2		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	919	78,2
No viable	17	1,4
Abortado	239	20,3
Total	1175	100

Árbol 4		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	901	49,1
No viable	0	0,0
Abortado	934	50,9
Total	1835	100

Árbol 5		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	798	62,8
No viable	11	0,9
Abortado	461	36,3
Total	1270	100

...Continuación Anexo 11.

Árbol 6		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	861	59,7
No viable	7	0,5
Abortado	575	39,8
Total	1443	100

Árbol 7		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	1192	57,3
No viable	244	11,7
Abortado	645	31,0
Total	2081	100

Árbol 8		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	667	66,2
No viable	9	0,9
Abortado	332	32,9
Total	1008	100

Árbol 9		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	777	81,8
No viable	4	0,4
Abortado	169	17,8
Total	950	100

Árbol 10		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	671	60,9
No viable	12	1,1
Abortado	419	38,0
Total	1102	100

Árbol 11		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	800	62,7
No viable	3	0,2
Abortado	472	37,0
Total	1275	100

Árbol 12		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	797	68,5
No viable	110	9,5
Abortado	257	22,1
Total	1164	100

Árbol 13		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	423	62,6
No viable	13	1,9
Abortado	240	35,5
Total	676	100

...Continuación Anexo 11.

Árbol 14		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	953	54,7
No viable	35	2,0
Abortado	755	43,3
Total	1743	100

Árbol 15		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	1015	68,7
No viable	12	0,8
Abortado	451	30,5
Total	1478	100

Árbol 1		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	302	11,3
No viable	1590	59,6
Abortado	775	29,1
Total	2667	100

Árbol 2		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	180	5,7
No viable	2278	72,6
Abortado	680	21,7
Total	3138	100

Árbol 3		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	867	66,9
No viable	188	14,5
Abortado	240	18,5
Total	1295	100

Árbol 4		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	114	2,5
No viable	3400	75,9
Abortado	963	21,5
Total	4477	100

...Continuación anexo 11.

Árbol 5		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	2178	66,9
No viable	289	8,9
Abortado	788	24,2
Total	3255	100

Árbol 6		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	952	65,2
No viable	103	7,0
Abortado	406	27,8
Total	1461	100

Árbol 7		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	786	51,9
No viable	53	3,5
Abortado	676	44,6
Total	1515	100

Árbol 8		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	939	72,3
No viable	7	0,5
Abortado	352	27,1
Total	1298	100

Árbol 9		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	2165	77,3
No viable	111	4,0
Abortado	523	18,7
Total	2799	100

Árbol 10		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	2537	48,1
No viable	639	12,1
Abortado	2094	39,7
Total	5270	100

Árbol 11		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	1979	50,1
No viable	796	20,1
Abortado	1177	29,8
Total	3952	100

Árbol 12		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	1481	83,3
No viable	41	2,3
Abortado	255	14,4
Total	1777	100

Anexo 12 Tablas con los valores obtenidos de la medición inicial de viabilidad del polen de *C. avellana* L., cultivar Du Chilly en los potreros 1, 2 y 3.

Árbol 1		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	1167	98,6
No viable	7	0,6
Abortado	10	0,8
Total	1184	100

Árbol 2		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	1043	98,0
No viable	8	0,8
Abortado	13	1,2
Total	1064	100

Árbol 4		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	605	70,5
No viable	4	0,5
Abortado	249	29,0
Total	858	100

Árbol 6		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	427	53,2
No viable	51	6,4
Abortado	325	40,5
Total	803	100

Árbol 7		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	642	94,4
No viable	18	2,6
Abortado	20	2,9
Total	680	100

Árbol 8		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	381	44,9
No viable	49	5,8
Abortado	419	49,4
Total	849	100

...Continuación Anexo 12.

Árbol 11		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	683	77,1
No viable	40	4,5
Abortado	163	18,4
Total	886	100

Árbol 12		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	644	68,6
No viable	11	1,2
Abortado	284	30,2
Total	939	100

Árbol 13		Potrero 1
Granos de polen		%
Viable	551	94,3
No viable	12	2,1
Abortado	21	3,6
Total	584	100

Árbol 1		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	1287	36,0
No viable	787	22,0
Abortado	1501	42,0
Total	3575	100

Árbol 2		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	1340	97,4
No viable	20	1,5
Abortado	16	1,2
Total	1376	100

Árbol 3		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	633	42,1
No viable	20	1,3
Abortado	849	56,5
Total	1502	100

Árbol 4		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	632	87,3
No viable	79	10,9
Abortado	13	1,8
Total	724	100

Árbol 5		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	528	59,5
No viable	24	2,7
Abortado	336	37,8
Total	888	100

...Continuación Anexo 12.

Árbol 6		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	500	61,2
No viable	27	3,3
Abortado	290	35,5
Total	817	100

Árbol 7		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	1758	97,2
No viable	23	1,3
Abortado	27	1,5
Total	1808	100

Árbol 8		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	1242	97,3
No viable	11	0,9
Abortado	24	1,9
Total	1277	100

Árbol 9		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	1434	98,2
No viable	15	1,0
Abortado	11	0,8
Total	1460	100

Árbol 10		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	786	98,2
No viable	28	1,0
Abortado	465	0,8
Total	1279	100

Árbol 11		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	491	91,9
No viable	3	0,6
Abortado	40	7,5
Total	534	100

Árbol 12		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	752	56,2
No viable	14	1,0
Abortado	573	42,8
Total	1339	100

Árbol 13		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	883	65,1
No viable	9	0,7
Abortado	465	34,3
Total	1357	100

...Continuación Anexo 12.

Árbol 14		Potrero 2
Granos de polen		%
Viable	701	64,4
No viable	10	0,9
Abortado	377	34,7
Total	1088	100

Árbol 1		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	1764	54,2
No viable	1478	45,4
Abortado	11	0,3
Total	3253	100

Árbol 2		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	1747	30,2
No viable	1351	23,4
Abortado	2682	46,4
Total	5780	100

Árbol 3		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	1178	14,1
No viable	3468	41,4
Abortado	3724	44,5
Total	8370	100

Árbol 4		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	971	21,3
No viable	2949	64,7
Abortado	637	14,0
Total	4557	100

Árbol 5		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	1340	26,8
No viable	1940	38,7
Abortado	1728	34,5
Total	5008	100

Árbol 6		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	1516	43,5
No viable	932	26,8
Abortado	1035	29,7
Total	3483	100

Árbol 7		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	1069	20,1
No viable	2018	38,0
Abortado	2224	41,9
Total	5311	100

...Continuación Anexo 12.

Árbol 8		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	1197	43,7
No viable	145	5,3
Abortado	1396	51,1
Total	2738	100

Árbol 9		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	1096	14,3
No viable	1578	35,0
Abortado	1841	40,8
Total	4515	100

Árbol 10		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	1659	31,6
No viable	1188	22,6
Abortado	2407	45,8
Total	5254	100

Árbol 11		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	691	24,5
No viable	2104	74,6
Abortado	27	1,0
Total	2822	100

Árbol 12		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	404	9,1
No viable	1455	32,8
Abortado	2576	58,1
Total	4435	100

Árbol 13		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	883	65,1
No viable	9	0,7
Abortado	465	34,3
Total	1357	100

Árbol 14		Potrero 3
Granos de polen		%
Viable	508	61,5
No viable	9	1,1
Abortado	309	37,4
Total	826	100

Anexo 13 Análisis de varianza para los porcentajes de viabilidad polínica de los árboles muestreados del cultivar Du Chilly y de la selección clonal Santa Rosa de *C. avellana* L.

	Suma de cuadrados	Grados libertad	Media cuadrática	Significación
Factores				
Cultivar	0,0116486	1	0,0116486	0,8423
Potrero	11,0868	2	5,5434	0,0000
Interacción				
Potrero-Cultivar	0,353277	2	0,176639	0,5491
Residual	21,0397	72	0,292218	
Total corregido	32,6902	77		

Valores expresados en base a ln.

Anexo 14 Tests de Rangos Múltiples para el porcentaje de viabilidad por potrero (Tukey 95%).

Potrero	Cantidad	Media LS	Sigam LS	Grupos homogéneos
3	25	30,855	1,114271	X
2	28	66,354	1,107558	X
1	25	73,032	1,119205	X
Contraste	Diferencia		Límites +/-	
1-2	1,100637		1,438921	
1-3	*2,366935		1,453194	
2-3	*2,150512		1,427798	

* denota una diferencia estadísticamente significativa.

Anexo 15 Manejo de fertilización anual para los potreros 1, 2 y 3.

Fertilizantes	Dosis
Nitromax	125 kg/4,5 ha*
Magnecal	150 kg/4,5 ha*
Superfosfato triple	150 kg/4,5 ha*
Febrero	
Ac. Fosfórico	0,45 L/4,5 ha**
Fosfato amónico	1,5 kg/4,5 ha**
Nitrato de potasio	6,25 kg/4,5 ha**
Sulfato de potasio	8,75 kg/4,5 ha**
Sulfato de magnesio	5,3 kg/4,5 ha**
Sulfato amónico	0,6 kg/4,5 ha**
Nitrato amónico	4,3 kg/4,5 ha**

*La mezcla de los tres fertilizantes se reparte en 150 gr para cada planta en las 4,5 ha del huerto.

**Esta mezcla se entrega a la 4,5 ha por medio del fertiriego una vez a la semana durante el mes de febrero.

Anexo 16 Medias de granos de polen viables, no viables y abortados de la evaluación inicial de *C. avellana* L.

Variables	n	Medias (%)		
		Granos de polen		
		Viable	No viable	Abortado
Cultivares				
1	42	53,7	9,3	27,2
2	36	52,4	13,6	12,2
Potreros				
1	25	73,0	2,5	14,2
2	28	66,3	2,9	18,4
3	25	30,8	28,9	22,3
Interacción potrero-cultivar				
1-1	16	70,9	2,4	24,7
1-2	9	75,1	2,7	8,8
2-1	14	63,6	2,3	32,3
2-2	14	69,2	3,5	10,5
3-1	12	34,3	23,4	25,1
3-2	13	27,6	34,5	19,7

Cultivar 1: Selección clonal Santa Rosa; Cultivar 2: Du Chilly.

Anexo 17 Tabla con las mediciones realizadas para el tiempo 1 (17 de agosto 2004) de la viabilidad del polen de *C. avellana* L., selección clonal Santa Rosa y cultivar Du Chilly.

Potrero	Cultivar	Categoría	G. viable (%)	G. no viable (%)	G. abortado (%)
1	Santa Rosa	II	70,1	1,5	28,3
2	Santa Rosa	II	61,7	2,0	36,3
3	Santa Rosa	II	66,8	6,4	26,8
3	Santa Rosa	IV	6,5	69,4	24,1
1	Du Chilly	II	67,3	3,1	29,5
2	Du Chilly	I	96,4	1,0	2,6
2	Du Chilly	II	61,3	1,8	36,9
3	Du Chilly	III	27,8	40,5	31,8

Anexo 18 Tabla con las mediciones realizadas para el tiempo 2 (17 de septiembre 2004) de la viabilidad del polen de *C. avellana* L., selección clonal Santa Rosa y cultivar Du Chilly.

Potrero	Cultivar	Categoría	G. viable (%)	G. no viable (%)	G. abortado (%)
1	Santa Rosa	II	73,5	0,5	26,0
2	Santa Rosa	II	70,4	2,4	27,2
3	Santa Rosa	II	62,5	1,3	36,2
3	Santa Rosa	IV	50,1	0,6	49,3
1	Du Chilly	II	69,1	4,5	26,3
2	Du Chilly	I	97,9	0,5	1,6
2	Du Chilly	II	57,6	1,8	40,6
3	Du Chilly	III	62,7	2,3	35,0

Anexo 19 Tabla con las mediciones realizadas para el tiempo 3 (17 de noviembre 2004) de la viabilidad del polen de *C. avellana* L., selección clonal Santa Rosa y cultivar Du Chilly.

Potrero	Cultivar	Categoría	G. viable (%)	G. no viable (%)	G. abortado (%)
1	Santa Rosa	II	79,4	1,3	19,3
2	Santa Rosa	II	76,0	4,1	19,9
3	Santa Rosa	II	75,9	1,5	22,5
3	Santa Rosa	IV	74,3	0,8	24,9
1	Du Chilly	II	49,4	14,2	36,4
2	Du Chilly	I	95,2	2,2	2,6
2	Du Chilly	II	54,7	5,4	39,9
3	Du Chilly	III	65,5	2,5	31,9

Anexo 20 Tabla con las mediciones realizadas para el tiempo 4 (17 de enero 2005) de la viabilidad del polen de *C. avellana* L., selección clonal Santa Rosa y cultivar Du Chilly.

Potrero	Cultivar	Categoría	G. viable (%)	G. no viable (%)	G. abortado (%)
1	Santa Rosa	II	39,1	35,8	25,1
2	Santa Rosa	II	52,7	1,5	46,1
3	Santa Rosa	II	45,3	2,4	52,3
3	Santa Rosa	IV	55,7	3,8	40,5
1	Du Chilly	II	53,6	12,2	34,2
2	Du Chilly	I	91,6	2,9	5,5
2	Du Chilly	II	47,0	14,8	38,2
3	Du Chilly	III	62,0	6,9	31,1

Anexo 21 Análisis de covarianza para los porcentajes de viabilidad polínica de las categorías del cultivar Du Chilly y de la selección clonal Santa Rosa de *C. avellana* L., a través del tiempo de almacenaje.

	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Media cuadrática	Significación
Covariable				
Tiempo	0,961	1	0,961	0,9496
Factores				
A: Categoría	3993,35	3	1331,12	0,0045
B: Cultivar	259,21	1	259,21	0,3045
C: Potrero	44,4375	2	22,2188	0,9103
Residual	5649,78	24	235,408	
Total corregido	11491,3	31		

Anexo 22 Tests de Rangos Múltiples para el porcentaje de viabilidad por categoría, a través del tiempo de almacenaje (Tukey 95%).

Categoría	Cantidad	Promedio LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
IV	4	44,575	9,65309	X
III	4	60,475	11,5072	X
II	20	60,55	3,83575	X
I	4	99,4875	9,39563	X
Contraste	Diferencia		Límites +/-	
I-II	*38,9375		24,481	
I-III	*39,0125		28,6699	
I-IV	*54,9125		42,7803	
II-III	0,075		17,8287	
II-IV	15,975		25,575	
III-IV	15,9		36,6642	

* indica diferencias estadísticamente significativas.

Anexo 23 Viabilidad del polen de *C. avellana* L., selección clonal Santa Rosa y cultivar Du Chilly, a través del tiempo de almacenaje.

Potrero	Cultivar	Categoría	% viabilidad/días de almacenaje			
			30	60	120	180
1	Santa Rosa	II	70,1	73,5	79,4	39,1
2	Santa Rosa	II	63,5	70,4	76,0	52,4
3	Santa Rosa	II	66,8	62,6	75,9	45,3
3	Santa Rosa	IV	6,5	50,1	74,3	55,7

Potrero	Cultivar	Categoría	% viabilidad/días de almacenaje			
			30	60	120	180
1	Du Chilly	II	67,3	69,1	49,4	53,6
2	Du Chilly	I	97,5	97,9	95,2	91,6
2	Du Chilly	II	61,2	57,6	54,7	47,0
3	Du Chilly	III	27,8	62,7	65,5	62,0

Anexo 24 Germinación del polen de *C. avellana* L., selección clonal Santa Rosa y cultivar Du Chilly, a través del tiempo de almacenaje.

Potrero	Cultivar	Categoría	% germinación/días de almacenaje			
			30	60	120	180
1	Santa Rosa	II	1,3	0,9	1,6	0,1
2	Santa Rosa	II	6,0	4,1	0,2	0,0
3	Santa Rosa	II	4,6	2,1	0,3	0,0
3	Santa Rosa	IV	2,3	1,1	0,6	0,0

Potrero	Cultivar	Categoría	% germinación/días de almacenaje			
			30	60	120	180
1	Du Chilly	II	2,2	0,9	0,9	1,0
2	Du Chilly	I	1,5	1,0	0,6	0,5
2	Du Chilly	II	1,1	1,0	1,2	0,3
3	Du Chilly	III	11,7	10,7	0,3	0,3

Anexo 25 Análisis de covarianza para los porcentajes de germinación polínica de los categorías del cultivar Du Chilly y de la selección clonal Santa Rosa, *Corylus avellana* L., a través del tiempo de almacenaje.

	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Media cuadrática	Significación
Covariable				
Tiempo	64,516	1	64,516	0,0008
Factores				
A: Categoría	47,8067	3	15,9356	0,0268
B: Cultivar	1,96	1	1,96	0,8371
C: Potrero	1,56417	2	0,782083	0,5093
Residual	104,792	24	4,36631	
Total corregido	243,055	31		

Anexo 26 Tests de Rangos Múltiples para el porcentaje de germinación por categoría, a través del tiempo de almacenaje (Tukey 95%).

Categoría	Cantidad	Promedio LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
IV	4	0,666667	1,31466	X
I	4	0,929167	1,2796	X
II	20	1,41667	0,522393	X
III	4	6,11667	1,56718	X
Contraste	Diferencia		Límites +/-	
I-II	-0,4875		3,33408	
I-III	*-5,1875		3,90456	
I-IV	0,2625		5,82628	
II-III	*-4,7		2,4281	
II-IV	0,75		3,48267	
III-IV	*5,45		4,99332	

* indica diferencias estadísticamente significativas.

Anexo 27 Participación de los granos de polen abortado de las categorías evaluadas en los análisis de viabilidad, por medio del test de tinción con p-fenilendiamina.

Variables	n	Medias (%)		
		Viable	Abortado	Germinación
Categorías				
I	4	99,48	-1,98	0,92
II	20	60,55	33,82	1,41
III	4	60,47	24,87	6,11
IV	4	44,57	34,07	0,66
Cutlivares				
Santa Rosa	16	70,29	19,22	2,63
Du Chilly	16	62,24	26,17	1,93
Potreros				
1	8	68,40	17,00	1,97
2	12	66,08	24,28	2,60
3	12	64,32	26,79	2,26

Anexo 28 Valores obtenidos de los granos de polen cuantificados en el estigma, estilo, libre y extraño (de otra especie), para el cultivar Du Chilly y la selección clonal Santa Rosa, *C. avellana* L.

Santa Rosa		Muestra 1
Granos de polen		%
Estigma	8	6
Estilo	13	11
Libre	5	4
Extraño	97	79
Total	123	100

Santa Rosa		Muestra 2
Granos de polen		%
Estigma	2	8
Estilo	3	12
Libre	2	8
Extraño	18	72
Total	25	100

Santa Rosa		Muestra 3
Granos de polen		%
Estigma	2	29
Estilo	2	29
Libre	2	28
Extraño	1	14
Total	7	100

Santa Rosa		Muestra 4
Granos de polen		%
Estigma	0	0
Estilo	0	0
Libre	1	20
Extraño	4	80
Total	5	100

Santa Rosa		Muestra 5
Granos de polen		%
Estigma	0	0
Estilo	1	12
Libre	5	63
Extraño	2	25
Total	8	100

Santa Rosa		Muestra 6
Granos de polen		%
Estigma	1	7
Estilo	1	8
Libre	11	85
Extraño	0	0
Total	13	100

...Continuación Anexo 28.

Santa Rosa		Muestra 7
Granos de polen		%
Estigma	0	0
Estilo	0	0
Libre	3	38
Extraño	5	62
Total	8	100

Santa Rosa		Muestra 8
Granos de polen		%
Estigma	1	3
Estilo	0	0
Libre	5	13
Extraño	31	84
Total	37	100

Santa Rosa		Muestra 9
Granos de polen		%
Estigma	4	8
Estilo	0	0
Libre	0	0
Extraño	44	92
Total	48	100

Santa Rosa		Muestra 10
Granos de polen		%
Estigma	3	18
Estilo	1	6
Libre	5	29
Extraño	8	47
Total	17	100

Santa Rosa		Muestra 11
Granos de polen		%
Estigma	6	24
Estilo	2	8
Libre	9	36
Extraño	8	32
Total	25	100

Santa Rosa		Muestra 12
Granos de polen		%
Estigma	0	0
Estilo	0	0
Libre	2	40
Extraño	3	60
Total	5	100

...Continuación Anexo 28.

Santa Rosa		Muestra 13
Granos de polen		%
Estigma	0	0
Estilo	0	0
Libre	0	0
Extraño	2	100
Total	2	100

Santa Rosa		Muestra 14
Granos de polen		%
Estigma	0	0
Estilo	0	0
Libre	32	97
Extraño	1	3
Total	33	100

Santa Rosa		Muestra 15
Granos de polen		%
Estigma	2	18
Estilo	0	0
Libre	6	55
Extraño	3	27
Total	11	100

Santa Rosa		Muestra 16
Granos de polen		%
Estigma	33	35
Estilo	4	4
Libre	32	55
Extraño	26	27
Total	95	100

Santa Rosa		Muestra 17
Granos de polen		%
Estigma	0	0
Estilo	2	12
Libre	15	88
Extraño	0	0
Total	17	100

Santa Rosa		Muestra 19
Granos de polen		%
Estigma	2	7,4
Estilo	1	3,7
Libre	22	91,4
Extraño	1	7,4
Total	27	100

...Continuación Anexo 28.

Santa Rosa		Muestra 20
Granos de polen		%
Estigma	0	0
Estilo	0	0
Libre	3	75
Extraño	1	25
Total	4	100

Santa Rosa		Muestra 22
Granos de polen		%
Estigma	3	27
Estilo	0	0
Libre	7	64
Extraño	1	9
Total	11	100

Santa Rosa		Muestra 23
Granos de polen		%
Estigma	4	25
Estilo	0	0
Libre	11	69
Extraño	1	6
Total	16	100

Santa Rosa		Muestra 24
Granos de polen		%
Estigma	0	0
Estilo	0	0
Libre	3	100
Extraño	0	0
Total	3	100

Santa Rosa		Muestra 25
Granos de polen		%
Estigma	2	20
Estilo	0	0
Libre	8	80
Extraño	0	0
Total	10	100

Santa Rosa		Muestra 26
Granos de polen		%
Estigma	0	0
Estilo	0	0
Libre	2	50
Extraño	2	50
Total	4	100

...Continuación Anexo 28.

Santa Rosa		Muestra 27
Granos de polen		%
Estigma	8	44,4
Estilo	0	0
Libre	8	44,4
Extraño	2	11,1
Total	18	100

Santa Rosa		Muestra 30
Granos de polen		%
Estigma	0	0
Estilo	0	0
Libre	1	100
Extraño	0	0
Total	1	100

Santa Rosa		Muestra 31
Granos de polen		%
Estigma	0	0
Estilo	0	0
Libre	2	100
Extraño	0	0
Total	2	100

Du Chilly		Muestra 32
Granos de polen		%
Estigma	1	9
Estilo	0	0
Libre	2	8
Extraño	8	73
Total	11	100

Du Chilly		Muestra 33
Granos de polen		%
Estigma	2	13
Estilo	0	0
Libre	9	56
Extraño	5	31
Total	16	100

Du Chilly		Muestra 34
Granos de polen		%
Estigma	3	43
Estilo	0	0
Libre	3	43
Extraño	1	44
Total	7	100

...Continuación Anexo 28.

Du Chilly		Muestra 35
Granos de polen		%
Estigma	0	0
Estilo	0	0
Libre	0	0
Extraño	13	100
Total	13	100

Du Chilly		Muestra 36
Granos de polen		%
Estigma	3	9
Estilo	0	0
Libre	9	25
Extraño	23	66
Total	35	100

Du Chilly		Muestra 37
Granos de polen		%
Estigma	3	25
Estilo	2	17
Libre	5	41
Extraño	2	17
Total	12	100

Du Chilly		Muestra 39
Granos de polen		%
Estigma	0	0
Estilo	1	33,3
Libre	1	33,3
Extraño	1	33,3
Total	3	100

Du Chilly		Muestra 42
Granos de polen		%
Estigma	0	0
Estilo	1	9,1
Libre	5	45
Extraño	5	45
Total	11	100

Du Chilly		Muestra 43
Granos de polen		%
Estigma	0	0
Estilo	0	0
Libre	1	100
Extraño	0	0
Total	1	100

...Continuación Anexo 28.

Du Chilly		Muestra 44
Granos de polen		%
Estigma	2	20
Estilo	2	20
Libre	2	20
Extraño	4	40
Total	10	100

Du Chilly		Muestra 46
Granos de polen		%
Estigma	1	25
Estilo	0	0
Libre	1	25
Extraño	2	50
Total	4	100

Du Chilly		Muestra 47
Granos de polen		%
Estigma	3	75
Estilo	0	0
Libre	1	25
Extraño	0	0
Total	4	100

Du Chilly		Muestra 48
Granos de polen		%
Estigma	0	0
Estilo	0	0
Libre	5	100
Extraño	0	0
Total	5	100

Du Chilly		Muestra 49
Granos de polen		%
Estigma	3	50
Estilo	0	0
Libre	3	50
Extraño	0	0
Total	6	100

Du Chilly		Muestra 50
Granos de polen		%
Estigma	2	17
Estilo	0	0
Libre	4	33
Extraño	6	50
Total	12	100

...Continuación Anexo 28.

Du Chilly		Muestra 51
Granos de polen		%
Estigma	1	25
Estilo	0	0
Libre	0	0
Extraño	3	75
Total	4	100

Du Chilly		Muestra 52
Granos de polen		%
Estigma	0	0
Estilo	0	0
Libre	2	100
Extraño	0	0
Total	2	100

Du Chilly		Muestra 53
Granos de polen		%
Estigma	1	20
Estilo	0	0
Libre	3	60
Extraño	1	20
Total	5	100