
Manual sobre Técnicas Estandarizadas para la Investigación del Mejoramiento del Cocotero

editado por G.A. Santos, P.A. Batugal, A. Othman, L. Baudouin y J.P. Labouisse



Manual sobre Técnicas Estandarizadas para la Investigación del Mejoramiento del Cocotero

editado por G.A. Santos, P.A. Batugal, A. Othman,
L. Baudouin y J.P. Labouisse

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el invaluable apoyo de la Sra. Lleana Acevedo, la Srita. Rossana Marrufo y el Sr. Miguel Fernández en la preparación de esta versión al español del Stantech Manual.

PROLOGO

El cocotero se cultiva en cerca de 11 mil millones de hectáreas en más de 85 países, y el 96 % de esta extensión está en manos de pequeños parcelarios cultivando de 0.4 a 5.0 hectáreas. La producción mundial ha estado decayendo en años recientes de 710 kg. de copra por hectárea en 1976 a 430 kg. en 1984 y 400 kg. en 1992. La productividad en plantaciones también ha decrecido, disminuyendo la competitividad del cultivo y los ingresos de los productores que viven de él.

Una manera para aumentar la producción y la competitividad de los pequeños propietarios, es desarrollando variedades mejoradas que tengan la capacidad de alta productividad, resistencia a patógenos y buena adaptación específica al ambiente donde se desarrollan. Es también muy importante conservar los recursos genéticos del cocotero, los cuales pueden servir como la base fundamental para establecer en el futuro, programas sólidos de mejoramiento. Lo cierto es que esta es una tarea muy grande, debido a la naturaleza a largo plazo que requiere la investigación del cocotero y a la carencia de investigadores bien calificados.

Para superar las dificultades anteriormente citadas, el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), tomando en cuenta las recomendaciones aportadas por 15 países productores de cocotero, estableció una Red Internacional de Recursos Genéticos del Cocotero (COGENT) para la coordinación de actividades de importancia nacional, regional y global, particularmente en la exploración, colección, conservación y utilización del cocotero, y para establecer bases de colaboración sobre los amplios aspectos de la investigación y desarrollo del cultivo.

Una de las primeras actividades de COGENT fue trabajar para homologar las técnicas de investigación. Esto se llevó a efecto en la estación experimental de cocotero Marc Delorne, IDEFOR en Costa de Marfil del 20 de junio de 1992 a través del apoyo de GTZ, BUROTROP e IPGRI. Durante el taller, productores de cocotero de 16 países y expertos de CIRAD e IPGRI formularon el primer borrador de este manual. Este borrador fue pre-examinado y revisado durante un curso de entrenamiento sobre técnicas de investigación para la producción de cocotero, que se llevó a cabo en el Instituto de Cocotero y Palmas, en Manado, Indonesia al cual asistieron 21 investigadores contando con los apoyos recibidos por el Banco Asiático de Desarrollo. El manuscrito fue entonces enviado al IPGRI para su revisión y publicación.

El Manual STANTECH, como se ha llamado a este documento, permitirá a productores de cocotero e investigadores del germoplasma de este cultivo, utilizar técnicas estandarizadas a nivel mundial, como guías para el cultivo y la conservación del germoplasma. Se espera que este manual ayude a los investigadores del cocotero a obtener mejores resultados y estos puedan ser comparados, lo cual permitirá acelerar el desarrollo de variedades mejoradas para millones de agricultores dedicados a este cultivo.

COGENT está en deuda con GTZ, BUROTROP, y ADB por haber proporcionado apoyos financieros en la elaboración de este manual, con ODA por cubrir los gastos de su publicación y con CIRAD, IPGRI, con los investigadores del taller en Costa de Marfil y con los capacitadores del curso en Indonesia (Apéndice 1) por sus aportaciones. Finalmente COGENT, desea agradecer al equipo de edición por haber ejecutado esta tarea, al Sr. F. Bonnot de CIRAD por su asesoría en el contenido estadístico de este manual y al Dr. V. Ramanatha Rao de IPGRI, quién revisó cuidadosamente este trabajo.

Basil Been
Presidente del Comité Directivo de COGENT

INDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	ii
PROLOGO	iii
Capítulo 1 BOTANICA DE LA PALMA DE COCOTERO	1
Capítulo 2 ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENETICA <i>IN SITU</i>	4
Capítulo 3 EXPLORACION Y COLECTA DE GERMOPLASMA	8
Capítulo 4 MANEJO DEL VIVERO	11
Capítulo 5 DISEÑOS EXPERIMENTALES Y ANALISIS DE DATOS	14
Capítulo 6 ESTABLECIMIENTO DE LA PLANTACION	19
Capítulo 7 OBTENCION DE DATOS	21
Capítulo 8 POLINIZACION MANUAL CONTROLADA	27
Capítulo 9 CULTIVO DE EMBRIONES	35
Capítulo 10 ESTRATEGIA DE MUESTREO GENERALIZADO	38
Capítulo 11 GUIA DEL FORMATO PARA REGISTRO DE DATOS	40
REFERENCIAS	

APENDICES

1. Lista de quienes contribuyeron a la preparación del manual STANTECH.
2. Distancia generalizada de Mahalanobis.
3. Diagrama de flujo para el manejo de semilla y plántulas en colecciones.
4. Cálculos para la recuperación de copra y los componentes del fruto.
5. Equipo y materiales que se necesitan para la colecta de polen, su procesado y la polinización.

LISTA DE ILUSTRACIONES

- Fig. 1 - Medición del diámetro del tallo a 1.5 m del nivel del suelo.
- 2 - Medición de la longitud del tallo hasta la cicatriz de la hoja 11.
- 3 - Todas las formas de fronda.
- 4 - La hoja del cocotero.
- 5 - El pecíolo de la hoja del cocotero, mostrando la inserción del primer folíolo.
- 6 - Apertura de la inflorescencia del cocotero.
- 7a - Vista polar del fruto del cocotero.
- 7b - Forma del fruto del cocotero, vista polar.
- 8 - Vista ecuatorial del fruto.
- 9 - Forma/Apariencia de la cavidad de la semilla.
- 10a - Semillero para la germinación del cocotero.
- 10b - Siembra de semillas en camas de germinación.
- 11 - Arreglo de plántulas en bolsas de germinación.
- 12 - Estacado para el acomodo de las plántulas en el semillero.
- 13 - Marcaje de la hoja No 1.
- 14 - Bolsa colectora de flores masculinas.
- 15 - Asperjado de insecticida “suave” en la inflorescencia, justo antes del embolsado para la colecta de polen.
- 16 - Embolsado de inflorescencias para la colecta de polen.
- 17 - Cortado de las espiguillas con flores masculinas.
- 18 - Esterilización de la Caja para Manipular Polen (CMP) usando dos focos de infrarrojo (1000 watt por foco).
- 19 - Transferencia de espiguillas con flores masculinas a la CMP.
- 20 - Desprendimiento de las flores masculinas de las espiguillas en la CMP.
- 21a - Introducción de las flores masculinas a las bolsas de papel.
- 21b - Introducción de las bolsas de papel en bolsas de tela.
- 22 - Triturado de las flores masculinas para liberar los granos de polen.
- 23 - Secado de las flores masculinas trituradas.
- 24 - Tamizado de las flores masculinas trituradas para separar el polen.
- 25 - Constrictor de ampolletas.
- 26 - Colocación de las ampolletas en las entradas de la liofilizadora.
- 27 - Sellado de las ampolletas con un soplete.
- 28 - Almacenamiento de polen procesado en un congelador vertical.
- 29 - Verificación de la viabilidad del polen.
- 30 - Emasculación. Las flores masculinas son colectadas en una bolsa.
- 31a - Una inflorescencia de cocotero propiamente emasculada.
- 31b - Una inflorescencia emasculada propiamente aislada.
- 32 - Retiro de la bolsa de aislamiento de una inflorescencia emasculada
- 33 - Mezclado de polen y talco dentro de la CMP.
- 34 - Polinización de flores femeninas aisladas.
- 35 - Pizarra del control de actividades indicando operaciones a realizar.
- 36 - Inflorescencia ya politizada manualmente, en el momento de retirarle la bolsa.
- 37 - Caja para la inoculación en el campo.
- 38 - Mapa de Filipinas.

Capítulo 1

BOTANICA DE LA PALMA DE COCOTERO

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) es la única especie del género *Cocos*, pertenece a la Subfamilia Coccoideae la cuál incluye 27 géneros y 600 especies. Es una especie diploide con 32 cromosomas ($2n = 32$). Por lo tanto su hibridación es principalmente intraespecífica.

La clasificación mayor del cocotero se basa en la altura de la planta, y es de la siguiente manera:

- (1) **Palmas altas**, algunas veces referidas como var. *typica* (Nar). Son ampliamente cultivadas tanto para su uso comercial como doméstico y crecen a una altura de 20 a 30 m. Estas maduran lentamente y florecen de 6 a 10 años después de haber sido plantadas. Presentan una larga vida productiva de 60 a 70 años, a pesar de que existen palmas mas viejas que producen bien. Normalmente son alógamas y por lo tanto son consideradas heterocigotas.
- (2) **Palmas enanas**, algunas referidas como var. *nana* (Griff). Se cree que son mutantes de los tipos altos con una corta estatura, de 8 a 10 m. cuando tienen 20 años de edad. Comienzan a producir alrededor del tercer año a menos de un metro de altura. Tienen una corta vida productiva de 30 a 40 años, se autofecundan y por lo tanto se consideran homocigotas.

Las Raíces

Las palmas presentan raíces adventicias que se producen continuamente en los 40 cm basales del tronco conformando una parte abultada conocida como “bola” en los tipos de palmas altas y en algunos enanos híbridos. No presentan raíz principal o central ni raíces peludas pero tienen muchas raíces primarias que contienen grandes cantidades de raicillas.

Las raíces primarias crecen algunas veces horizontalmente desde la “bola” y principalmente se encuentran cerca de la superficie. Las ramificaciones crecen hacia abajo y pueden extenderse lateralmente hasta de 10 m.

Las raíces primarias al no tener cambium son notoriamente uniformes, las raíces principales logran alcanzar un máximo de diámetro de aproximadamente 1 cm. La punta de la raíz es la región de crecimiento activa y detrás de ella, está el área de absorción cuya epidermis es de una sola capa de células formadas por una pared muy delgada que gradualmente se engorda y se convierte en impermeable con la edad. En raíces viejas, la epidermis se desintegra y deja expuesta la dura hipodermis que generalmente es de color rojo.

El centro de la raíz presenta una estela rodeada por una funda de células simples de la cual surgen las raicillas y las protuberancias aerocrimatosas (encargadas del intercambio respiratorio) o neumatóforos. El intercambio respiratorio ocurre más abundantemente cerca de la superficie del suelo, donde se permite una difusión fácil de oxígeno y bióxido de carbono fuera de la raíz.

El Tallo

El tallo se desarrolla a partir de una yema terminal individual llamada “cogollo” o “palmito”, el cual es el único punto de crecimiento vegetativo de la palma. Bajo condiciones favorables, la base o cimientto del tronco de una palma joven alcanza su desarrollo completo en un período de 3 a 4 años.

En los tipos altos, la base del tronco llega hasta 0.8 m. en diámetro, disminuyendo rápidamente hasta 0.4 (Child, 1974). Una vez formado, el tronco no cambia mucho en diámetro. Si la variación ocurre en la base a la copa o corona, esto no es causado por factores biológicos pero sí por condiciones climáticas y prácticas de cultivo.

El crecimiento del tallo es rápido en los estadios tempranos, el cual puede ser superior de 1.5 m por año. La tasa de crecimiento disminuye conforme las palmas envejecen, hasta unos 10 a 15 cm por año después de los 40 años.

El tallo del cocotero no tiene *cambium*, por tanto no puede regenerar tejidos dañados. Sin embargo una palma madura puede tener tanto más que 18,000 haces vasculares, los cuales pueden ayudar a resistir daños físicos significativos en su tronco, como prevenir la entrada de insectos.

La Hoja

Las primeras hojas de un cocotero presentan los folíolos fusionados aparentando ser hojas simples. Después de que se han abierto de 8 a 10 hojas, las hojas subsecuentes presentan los folíolos separados. Después de casi 3 o 4 años, el tallo comienza tomar forma a partir de la punta terminal de crecimiento, que es el lugar donde se desarrollan las hojas nuevas. Generalmente una palma adulta normal produce de 12 a 16 hojas al año, cada una produciendo una inflorescencia. Existen cerca de 30 a 40 hojas en una corona sana con un número similar de primordios de hojas diferenciándose cerca de 30 meses antes de que emerja como una "hoja espada". Una hoja madura tiene de 3 a 4 m de largo y de 200 a 250 folíolos. Una hoja permanece: en la palma cerca de 3 años y posteriormente se desprende dejando una cicatriz permanente sobre del tronco.

La edad de una palma adulta está correlacionada con el número de cicatrices que deja en el tronco. El número de cicatrices en el tronco dividido entre 13, da la edad aproximada de la planta en años (Mahindapala, 1991). Esto puede ser importante para estimar la edad de las palmas que serán utilizadas como padres en la producción de nuevos materiales.

La Inflorescencia

La inflorescencia del cocotero se encuentra encerrada en una vaina doble o espádice. Toda la estructura se conoce como "espádice" o "espata" la cual nace individualmente en la axila de cada hoja. La palma es monoica, esto significa que contiene tanto flores masculinas como femeninas. Las flores masculinas son más numerosas que las femeninas. Aquellas nacen en la porción distal de las espiguillas las cuales están unidas a un eje central o pedúnculo.

El primordio de la inflorescencia puede ser detectado cuatro meses después de que el primordio de la primera hoja se diferenció; las flores masculinas y femeninas, 22 meses después. La apertura completa del espádice ocurre 1 año después.

Las flores masculinas son las primeras en abrir, comenzando por la parte superior de cada espiguilla, continuando hacia la base. Después de que cada flor se abre, el polen es expulsado y las flores masculinas caen, todo el proceso toma solamente un día. La fase masculina tarda sin embargo cerca de 20 días en la mayoría de las palmas, pero esto puede variar de acuerdo con la temporada y la variedad.

Una flor femenina permanece receptiva de 1 a 3 días. Dependiendo de las condiciones ambientales y de la variedad, la fase femenina bien puede comenzar unos cuantos días o después de que la espata ha abierto y durar de 3 a 5 días en palmas altas y de 8 a 15 días en la variedad enana. Una inflorescencia normal puede tener de 10 a 50 flores femeninas. Con polinización natural, del 50% al 70% de las flores femeninas abortan usualmente y caen, especialmente aquellas que emergen durante una severa sequía. Las flores que aún permanecen se desarrollan en frutos, que toman cerca de 12 meses para madurar.

El tiempo que tardan las fases masculina y femenina es afectada por las condiciones climáticas y usualmente no se sobreponen o traslapan en los cocoteros altos, de modo que la autopolinización ocurre raramente. En algunos cocoteros enanos particularmente los malayos enanos, existe un traslape de las fases masculina y femenina, promoviendo la autofecundación. Por lo tanto los cocoteros enanos son razonablemente homocigóticos.

El Fruto

Una vez que la polinización y fertilización ocurre, los frutos se desarrollan hasta madurar en un período de 12 meses, o menos de un año para algunos cultivares enanos. La cantidad de racimos y el número de frutos por racimo permite razonablemente estimar el rendimiento de una palma.

El fruto es una drupa fibrosa con cáscara lisa (exocarpo), la cual puede variar de verde a un café rojizo o aún hasta un tono marfil. La cubierta (mesocarpo) en cocoteros jóvenes es blanca y firme. El mesocarpo en un fruto maduro constituye una masa fibrosa, de donde se obtiene el bonote, el cual es una especie de fibra. Dentro de esta masa fibrosa se encuentra una concha dura o hueso (endocarpo) que encierra la semilla. La semilla está formada por la almendra o carne blanca (endospermo sólido), cubierta con una delgada capa de color café adherida firmemente de cerca de 12 mm de grosor (testa). En la cavidad central contiene el agua (endospermo líquido). Presenta además un embrión embebido en el endospermo sólido en la porción basal de la semilla. Hacia el final de la maduración del fruto, el volumen del agua en esta cavidad disminuye considerablemente lo cual puede deberse a la absorción por el tejido del endospermo sólido o por evaporación. Cuando se agitan los frutos maduros puede oírse un sonido característico del agua en su interior. El rendimiento generalmente se estima en términos del número de frutos producidos por palma o su equivalencia en peso de copra por unidad de área.

Capítulo 2

ESTUDIO LA DIVERSIDAD GENETICA *IN SITU*

Hay varios métodos para estudiar la diversidad genética. Estos incluyen métodos morfométricos, bioquímicos y moleculares. En este manual, solamente se discute el método morfométrico ya que los procedimientos para el uso de los otros aún están pendientes de ser estandarizados.

El estudio la diversidad genética *in situ*, así como la exploración y búsqueda de nuevas fuentes de germoplasma son dos de las cuatro áreas de actividades principales de la Red Internacional de Recursos Genéticos del Cocotero (COGENT). Estas incluyen la obtención de muestras de palmas y frutos en los sitios identificados para el muestreo, siguiendo las estrategias ordinarias de Muestreo por rejilla amplia y fina propuesto por el Instituto Internacional de Recursos Genéticos de Plantas (IPGRI) (Capítulo 10). La práctica ideal es observar *in situ* las poblaciones identificadas durante seis meses a un año siguiendo un calendario regular. El trabajo *in situ* requiere de observaciones de las poblaciones basadas en el comportamiento individual de las palmas. De ahí que, todas las palmas observadas podrían también servir posteriormente como fuente de germoplasma al coleccionar semillas para el banco de genes. Lo anterior se describe en el Capítulo 3.

Guía para el muestreo

Una descripción precisa de las poblaciones *in situ* es de crucial importancia, debido a que ésta será la única guía de que dispondrán los usuarios en los programas de mejoramiento durante un largo período de tiempo, desde el momento en que las poblaciones fueron colectadas, hasta concluir una década después la evaluación y la caracterización completa. La descripción abarca dos aspectos:

- (a) Identificación de las poblaciones de acuerdo con la lista de descriptores del IBPGR como se discute en el capítulo 11, y
- (b) La caracterización de cierto número de componentes en una planta y fruto. Estas ediciones deberá de tomarse al azar de 30 palmas normales en el sitio escogido o seleccionado (descartando palmas que estén enfermas o atípicas), donde sea y en cualquier tiempo posible, un fruto maduro deberá ser analizado por palma estudiada. Si esto no es posible, 30 frutos deberán ser tomados del montón.

Dependiendo de la situación del campo, es necesario considerar las siguientes técnicas del muestreo:

Muestreo de palmas al azar - Esta es la técnica ideal. El colector escoge al azar 30 muestras de palmas y obtiene un fruto representativo por palma.

Muestro de un montón al azar - Esto se hace cuando al momento del muestreo, las palmas ya fueron cosechadas y los frutos amontonados o apilados. Los frutos entonces se toman al azar del montón. Solamente son tomados los frutos no dañados, completamente maduros y no germinados.

Caracteres a registrar.

La siguiente lista de parámetros no es completa y deberá ser vista como la base mínima para realizar comparaciones. Los detalles del procedimiento se presentan en el Capítulo 7.

- (a) Morfología de tallo (Figs. 1 y 2.)
 - Medición del perímetro a 20 cm. sobre el nivel del suelo (cm)
 - Medición del perímetro a 1.5 m de altura (cm)
 - Longitud (m) del tallo entre 11 cicatrices de hojas, medida comenzando desde la parte inferior de la cicatriz de la primera hoja hasta la parte inferior de la cicatriz de la undécima hoja

(b) Apariencia general/forma de la copa (Fig. 3)

1. Esférica
2. Semiesférica
3. Silueta en forma de "X"
4. En forma de "V"
5. Otra (especificar)

(c) Morfología de las hojas (Figs. 4 y 5)

Las observaciones se realizan normalmente en la hoja número 14, la cual es la hoja cuya axila que protege un racimo con los frutos del tamaño de un puño. Sin embargo, por razones prácticas en palmas viejas de cocotero en las cuales no se conoce su edad con precisión, es posible cortar de la fronda una hoja madura y completamente verde, desprendiéndola con todo y pecíolo utilizando un machete afilado. La siguiente información deberá ser registrada de la hoja muestreada:

- Color del pecíolo

- | | | | |
|---|------------------|----|--------------------|
| 1 | Amarillo | 7 | Verde |
| 2 | Amarillo-rojizo | 8 | Verde-amarillento |
| 3 | Rojo-amarillento | 9 | Amarillo-verdoso |
| 4 | Rojo | 10 | Café |
| 5 | Rojo-verdoso | 11 | Otro (especificar) |
| 6 | Verde-rojizo | | |

- Longitud del pecíolo (cm) - desde la base del folíolo más próximo
- Grosor del pecíolo (cm) - mídase en la inserción del primer folíolo
- Ancho del pecíolo (cm) - mídase como el anterior
- Longitud de raquis - desde la base del pecíolo hasta la punta de la hoja
- Número de folíolos - cuéntese en un solo lado de la fronda, la que presente el primer folíolo en la base
- Longitud de folíolo (cm) - use cuatro folíolos (dos de cada lado) cerca del punto medio del raquis y anote el promedio
- Ancho del folíolo (cm) - utilice los mismos folíolos del punto anterior, mida el ancho máximo y anote el promedio de las cuatro mediciones

(d) Morfología de la inflorescencia y flor (Fig. 6)

Las mejores muestras son inflorescencias con flores masculinas abiertas (que pueden usar para la colección de polen si fuese necesario), una inflorescencia por palma

Tipo

1. Normal
 2. Espigada (llena o parcial)
 3. Andrógina
 4. Con espádice y bráctea adicionales
 5. Otros (especificar)
- Traslape de las fases femenina y masculina
 - Presencia de flores femeninas receptoras en la palma
 - Presencia de flores masculinas abiertas en la palma
 - Si ambas están presentes, ¿se encuentran las flores en la misma inflorescencia?
 - Largo del pedúnculo (cm) - distancia entre el punto donde se inserta el racimo en el tallo y la base de la primera espiguilla

- Largo del eje central (cm) - mídase desde la primera espiguilla hacia el fin del eje
- Diámetro del pedúnculo (cm) - en la inserción de la primera espiguilla
- Número de espiguillas con flores femeninas
- Número de espiguillas sin flores femeninas
- Largo de la primera espiguilla con flor femenina - número total de espiguillas
- El número de flores femeninas puede ser contado a partir de las cicatrices de flores que ya se han desprendido o removido
- Proporción de flores femeninas por espiguilla: número de flores femeninas divididas por el total de las espiguillas

(e) Apariencia del fruto

Todos los frutos analizados deberán estar maduros, esto es que el color del fruto este cambiando de fresco a seco y el agua rebote cuando se sacuda el fruto.

- Establecimiento de los frutos (estimación visual en cada palma muestreada del número de frutos más grandes que un puño)
 1. 0 a 10
 2. 11 a 20
 3. 21 a 50
 4. 51 a 80
 5. 81 y más.
- Color del fruto (a menos de 6 meses de edad) - siguiendo el código de color para la descripción del pecíolo
- Forma del fruto (vista polar, Figs. 7a y 7b)
 1. Redonda
 2. En forma de huevo
 3. En forma de pera
 4. Elíptica
 5. Otros (especificar)
- Forma del fruto (vista ecuatorial, Fig. 8)
 1. Redondo
 2. Angular
 3. Plano
 4. Otro (especificar)
- Forma del endocarpo (hueso o concha) (Fig. 9)
 1. Plano
 2. Puntigudo
 3. Ovoide
 4. Casi redondo

(f) Análisis de los Componentes del Fruto (FCA)

- Peso del fruto (g)
- Peso de endocarpo conteniendo la semilla completa (g)
- Peso del endocarpo partido sin agua, endocarpo y endospermo sólido juntos (g)
- Peso del endocarpo o hueso (g)
- Peso de la carne (endospermo sólido) - diferencia de los pesos del endocarpo partido sin agua y el peso endocarpo sin carne

(g) Endospermo sólido

Medir en mm el grosor del endospermo sólido o carne, en la porción ecuatorial de 10 frutos maduros (más o menos de 12 meses de edad) y tómesese el promedio. No incluir tipos makapuno (que es un tipo de con endospermo gelatinoso).

Análisis de datos

Los análisis estadísticos de los caracteres de la palma y del fruto registrados son complicados debido a que los caracteres son influenciados por las condiciones ambientales. De tal forma que, cualquier información disponible sobre el suelo, las condiciones climáticas y el origen probable de las poblaciones debe tomarse en cuenta al momento de interpretar los resultados.

Debe tenerse en cuenta que los caracteres a estudiar deben ser aquellos altamente heredables. En algunos casos puede ser aún mejor, considerar la proporción entre dos mediciones, como el número de frutos por palma, peso de la copra por fruto y peso de copra por palma, mas que la información básica. Los estudios conducidos en estaciones experimentales podrían proporcionar respuestas claras a estas preguntas.

Un análisis de varianza simple (ANOVA) es suficiente para determinar los coeficientes de variación debidos a los efectos de los tratamientos (ejem. cultivares) sobre parámetros individuales (ejem. rendimiento). Sin embargo, para comparar vanos caracteres o parámetros a la vez, se requieren de análisis multivariados.

Existen varios métodos para desarrollar un análisis multivariado. La selección de un método depende del problema que se este tratando de solucionar. Si el problema es representar grupos de individuos sin una agrupación preliminar puede utilizarse el *Análisis de Componentes Principales*. El propósito de esta técnica es condensar la información proporcionada por todas las variantes originales dentro de un pequeño grupo de variables independientes.

La comparación de poblaciones puede realizarse con pruebas de homogeneidad. La prueba de T^2 , de Hotelling puede utilizarse para pruebas de igualdad de medias entre dos poblaciones con muchas variables. Para más de dos poblaciones puede utilizarse el *Análisis de Dispersión* (Análisis Múltiple de Varianzas). Un Análisis de Discriminantes puede utilizarse para ubicar un conjunto de puntos que representan a las poblaciones sobre un eje principal, tomando en cuenta la variabilidad de la población, y calcular las *distancias Mahalanobis* entre poblaciones. El método de distancia generalizada de Mahalanobis entre dos poblaciones se presenta en el Apéndice 2.

La representación de distancias entre individuos puede ser definida con métodos de clasificación. Los *dendrogramas* hechos con técnicas de agrupamientos jerárquicos pueden ayudar a definir grupos de individuos. Los *árboles aditivos* pueden interpretarse como representaciones filogenéticas para representar relaciones entre individuos o poblaciones. Todos estos métodos pueden aplicarse tanto a poblaciones como a plantas individuales.

Otro problema es agrupar individuos dentro de conjuntos previamente definidos. En este caso un Análisis de Discriminantes o las *funciones discriminantes de Fisher* pueden ser utilizados.

La ayuda de un biometrista es particularmente importante al analizar diferentes tipos de datos como (color, forma de fruta, etc.) o variables discontinuas (grupos de frutos) lo que requiere de una codificación especial. El uso del manejo de datos en un sistema software para facilitar el análisis deberá ser explorado.

Capítulo 3

EXPLORACION Y COLECTA DE GERMOPLASMA

Selección de la población

El éxito de una prospección de germoplasma, ya sea para el estudio de la diversidad genética o para la colecta de semillas para una colección de germoplasma está determinado fuertemente por la selección de la muestra poblacional. Idealmente, es mucho mejor identificar y coleccionar la mayor variación genética como sea posible. Sin embargo el área disponible, los recursos financieros y la capacidad de las organizaciones implicadas en la conservación, evaluación, caracterización y utilización de los materiales genéticos imponen limitaciones sobre el número de poblaciones que serán observadas y colectadas.

En ausencia de un criterio de selección expreso, es mejor establecer el número de poblaciones a muestrear, basado en un esquema de colecta bien concebido y balanceado, que tome en cuenta los factores limitativos mencionados. Las estrategias de muestreo ordinarias en rejilla amplia y fina pueden ser utilizadas. Usando efectivamente una base de datos se podrá dar un enfoque racional a la colecta, por ejemplo un análisis multivariado, aumentará la eficiencia de la exploración.

En ciertos casos, la colección completa de semillas podrá hacerse siempre y cuando el área esté libre de enfermedades y plagas y si la población posee características y cualidades altamente distintivas, que las haga distinguir de otras poblaciones, el transporte de frutos para sembrarlos debe hacerse siguiendo las normas técnicas para una movilización segura de germoplasma (Frison *et al.*, 1993). El método abajo propuesto está destinado a guiar a los investigadores en la selección de las poblaciones.

1. Establecer los objetivos de la prospección

La estrategia de colecta podrá diferir dependiendo del objetivo, como se presenta a continuación.

- Si el objetivo es el describir y explotar la diversidad genética existente en una cierta región sin una idea preconcebida de los caracteres que se buscan, deberá procurarse un muestreo sistemático de la población.
- Si el propósito es coleccionar genes que codifican para características particulares (algunas veces llamada colecta objetivo) el enfoque deberá estar centrado en la población más prometedora que contenga los caracteres deseados; y
- Si lo que se pretende es salvaguardar poblaciones amenazadas para su conservación y uso subsecuente, entonces deberán ser identificados los factores de riesgo que amenacen a la población con desaparecer (ciclones, plagas y enfermedades, urbanización, cambio de cosecha o, conversión etc.) para señalar con precisión el área de colecta.

2. Identificar todas las poblaciones en las cuales se coleccionarán las muestras.

Dependiendo de la estrategia de colecta, las zonas geográficas que se cubrirán deberán de señalarse con precisión y deberá realizarse un inventario de las poblaciones implicadas. Un reconocimiento previo de la zona es muy útil en esta etapa.

3. Obtener información sobre la población.

Solo en raras excepciones, el cocotero no está asociado históricamente y estrechamente con las actividades humanas, que hayan incidido en su establecimiento en grandes plantaciones estatales, o en cultivos tradicionales en pequeña escala. Su distribución geográfica está probablemente reflejada en registros históricos relacionados a su establecimiento y adaptación al ambiente, lo cual generalmente toma muchas generaciones. La búsqueda de documentos escritos e información mediante relatos debe por consiguiente cubrir una amplia diversidad de

campos como la etnobotánica, la ecología, la agronomía, los sistemas agrícolas, la patología de las plantas y naturalmente, la genética, de esta forma podrá obtenerse la información relevante sobre su probable origen, los caracteres adaptativos, los rendimientos y los usos de la población.

Estos datos deberán ser indagados no solamente en la literatura científica como en las listas de flora, libros, tesis, estudios, reportes de colecta, sino también en fuentes tales como folletos de los servicios de agricultura, organizaciones de investigación agrícola, compañías de siembra de plantaciones, cooperativas de agricultores, jardines botánicos, gente local, etc.

4. Reunir datos pre-prospección *in situ*.

Las mediciones *in situ* sobre el hábito de crecimiento y los componentes del fruto, se harán como están descritos en el Capítulo 2, estas son herramientas valiosas para la selección de la población que será colectada. Las mediciones deberán realizarse antes de la colecta. Si esto es posible, las observaciones serán útiles para formar una guía para el manejo de la colección, por ejemplo: el número que llevarán, los objetivos de producción y los requerimientos logísticos.

Colecta de muestras

Una vez que la selección de la población se ha realizado, el tipo de muestra (fruto, polen y/o embriones) y el tamaño de la muestra debe ser establecido, junto con el número de palmas a muestrear. El objetivo último es el de obtener muestras representativas que posean la variación genética de la población que será examinada.

Cuando se está tratando con frutos provenientes de varias poblaciones y/o orígenes, se comete un gran número de errores en su identificación cuando los frutos llegan al centro de acopio sin la información de despacho de los frutos y de la población.

En el Apéndice 3, se muestra un diagrama de flujo para el manejo apropiado de frutos, la colecta y despacho de los mismos, A pesar de que los costos en el transporte de los frutos, puede llegar a ser prohibitivo bajo muchas circunstancias, la colecta de frutos es la mas simple y frecuentemente la forma mas barata. Los frutos permiten el pronto establecimiento de la población para su caracterización, evaluación y utilización. Debe tenerse cuidado para asegurar que las palmas estén libres de cualquier enfermedad o plaga.

Transferencia a los bancos de genes

El fruto del cocotero le toma mas o menos 12 meses para madurar desde que fue fertilizada la flor. Sin embargo, frutos de hasta 11 meses son considerados fisiológicamente maduros y pueden ser cosechados. Estos frutos pueden ser identificados fácilmente cuando la epidermis de uno o dos frutos del racimo comienzan a tomar cierto color café.

En teoría, el tamaño de la muestra de los tipos de enanos pueden ser más pequeña que de los tipos altos ya que los enanos son relativamente homogéneos. Sin embargo, dado que el procedimiento de multiplicación se lleva a cabo mediante semilla y los cocoteros enanos frecuentemente se utilizan como progenitores femeninos en la producción de híbridos, la muestra debe ser lo suficientemente grande como para estar bien representados.

Para conservar y caracterizar al mismo tiempo la población muestreada, tan efectivamente como sea posible, las plántulas deberán de plantarse siguiendo un diseño experimental apropiado. Los tipos altos y enanos deberán de sembrarse separadamente utilizando un cultivo de control para cada tipo, con al menos tres réplicas. Los altos plantándolos a una distancia de 9 m en triángulo para los altos y 7.5 a 8 m para los tipos enanos. Es apropiado que cada accesión incluya tres réplicas y parcelas de 5 x 6 palmas (estos es 90 palmas por accesión). Este diseño puede ser modificado si no estuviera disponible un terreno lo suficientemente grande. De cualquier modo, cada accesión deberá

estar representada por lo menos con 72 palmas, con un mínimo de dos réplicas dispuestas en parcelas o lotes cuadrados o rectangulares o bloques de cuando menos tres filas por réplica. Incluir parcelas para el control es esencial para que el control esté suficientemente representado (una parcela de control por cada cuatro parcelas de colección).

Bajo ciertas circunstancias tales como un tamaño inadecuado de la población, una pequeña cantidad de frutos disponible, o bien, si se presenta una pobre germinación, la población muestreada puede ser preservada mientras que una colecta adicional es llevada a cabo para lograr el tamaño deseado de la población. Si la colecta no puede ser repetida, existe el riesgo de que el material presentado represente una muestra sesgada o incompleta de la población bajo estudio. Sin embargo, si la población ha sido seleccionada para propósitos precisos de mejoramiento, como una colecta objetivo, su preservación como fuente de genes es justificable.

Enfoques generales para la colecta de germoplasma del cocotero

Coleta de frutos para su conservación ex situ - Escójase 100 palmas normales al azar hacia la parte media de la población y tóme una muestra de dos frutos por palma para generar un total de 200 frutos. Si el número de palmas en la población es demasiado pequeño, el número de frutos muestreados por palma puede ser aumentado, deberán plantarse en el banco de genes entre 80 a 100 palmas. Las muestras de fruto tomadas de un montón solo deberán de usarse cuando no hay otra alternativa.

Colección de polen - Cuando la colecta de polen y frutos se combinan, la población original y sus híbridos podrán estudiarse al mismo tiempo, y por tal razón se ganará un ciclo de reproducción. Ello permite el estudio rápido de una población cuando ha sido hibridizada y/o recombinada con otro material mas avanzado.

La colecta de polen implica la cosecha de flores masculinas de 25 a 30 palmas al azar hacia la parte media de la parcela o solar. Si el lugar de colecta está cerca de la estación de investigación, las flores masculinas podrían empacarse separadamente. De otra manera, el polen deberá tomarse de todas las inflorescencias y producir un paquete el polen representativo de toda la población muestreada.

Colecta de embriones - La técnica del cultivo de embriones fue desarrollada por primera vez por el Dr. E. V. de Guzmán en la Universidad de Filipinas en Los Baños a principios de los sesenta. Además, utilizarse para el rescate de embriones de los efectos letales del endospermo gelatinoso en el cocotero makapuno, puede ser aplicado en el transporte seguro de germoplasma de cocotero a grandes distancias. Adicionalmente puede utilizarse para la colecta de embriones para su crioconservación y experimentación bajo condiciones de laboratorio. A través de los años, la técnica ha pasado por una serie de refinamientos y modificaciones para servir los requerimientos actuales.

Las muestras de embrión deberán de tomarse de acuerdo con el método recomendado por IPGRI (Assy Bah *et al.* 1987), el cual está descrito con todo detalle en el Capítulo 9, que consiste en coleccionar más de 600 muestras de embriones (200 para colecciones de campo, 200 para crioconservación y 200 para intercambio) que pueden ser tomadas de cuando menos 100 palmas.

Capítulo 4

MANEJO DEL VIVERO

El establecimiento de un semillero de cocoteros en un vivero bien mantenido facilita la selección eficiente de plántulas normales y uniformes. Esto permite la aplicación de tratamientos y evaluaciones similares e imparciales. Se deberá de tener cuidado al seleccionar las plántulas para iniciar una plantación ya que lo que se plante estará en el campo por muchos años. Las técnicas en el manejo de un vivero serán descritas aquí, y pueden utilizarse tanto para el banco de genes como para los ensayos de híbridos.

Selección del sitio para el vivero

Un buen vivero deberá: (a) estar abierto, nivelado y con buen drenaje (b) tener suelo ligero o textura media que facilite las operaciones agrícolas; (c) tener una buena fuente de agua sin la posibilidad de inundarse; (d) tener acceso a vías de comunicación; y (e) encontrarse lejos de fuentes potenciales o existentes de plagas e insectos que afecten al cocotero, así como enfermedades, por ejemplo: aserraderos, pilas de troncos carcomidos, sitios en donde se vacíe estiércol de animales, etc. Un vivero con un mínimo de 3,600 m² de superficie es necesario para acomodar cerca 12,000 frutos para 50 hectáreas.

Para ser completamente operacional, el vivero deberá tener una reja de seguridad, un cobertizo para guardar los implementos y enseres, herramientas de labranza y equipo pequeño, una fuente de agua o pozo para irrigación; y suficiente mano de obra capacitada.

El semillero

Preparación del semillero - El semillero (Fig. 10a) deberá preferentemente estar en el centro del vivero. Para facilitar la siembra, deberá estar despejado, arado, y rastrillado con un leve declive. Los semilleros son preparados con las siguientes dimensiones:

elevación:	10-20 cm de altura para tener buen drenaje
ancho:	1m para evitar pisar los frutos durante su mantenimiento y operaciones de traslado
largo:	un semillero de 2 m de largo es ideal para una fácil inspección, administración y mantenimiento
andador:	este deberá de ser de 1 m entre semilleros para proporcionar la facilidad de inspección, selección, siembra, mantenimiento y actividades de traslado de las plántulas

Sembrado de plántulas - Los frutos son plantados colocándolos firmemente bien sea hacia arriba o ligeramente inclinados con el embrión hacia arriba (Fig. 10b), los frutos son colocados uno junto a otro para prevenir que éstos floten en caso de haber fuertes lluvias, los frutos son entonces cubiertos con tierra hasta cerca de 2/3 de su tamaño. Además debe colocarse una pizarra de registros en la parte del frente de cada cama que proporcione la siguiente información.

Nombre de la variedad o tipo
Fecha de siembra
Número de frutos sembrados
Número de cama o semillero
Fecha de cuando los frutos fueron cosechados, si se conoce

Mantenimiento del semillero - Esta actividad comprende el riego diario excepto cuando llueva, deshierbe cuando sea necesario, sombra parcial, cuando se necesite; e inspección de enfermedades o incidencia de plagas.

Transplante - Cuando los retoños emergen a través del mesocarpo a una altura de 4-6 cm, las plántulas se plantan en el vivero ya sea directamente en el suelo o en bolsas de plástico que les permiten mayor espacio para crecer. En esta etapa, algunas raíces están fuera del mesocarpo las cuales podrán ser dañadas en el proceso de transplante. Por tal razón será necesario podarlas o recortarlas antes de trasladar a las plántulas al suelo o a las bolsas de plástico. La poda de estas raicillas ayuda al establecimiento dentro de las plántulas induciendo la formación de nuevas raíces.

Las plántulas de la misma edad son trasplantadas el mismo día e inmediatamente plantados en el suelo o en la bolsa de plástico en el vivero. Es muy importante que el trasplante se haga solamente cuando el suelo o bolsa ya estén preparados. El trasplante puede programarse una vez a la semana. La fecha de germinación de la semilla es registrada en un libro de campo así como la fecha de cada traslado o cambio al suelo del vivero o a las bolsas plásticas. Después del trasplante de las plántulas del semillero, el terreno desocupado es rellenado con tierra a fin de no desestabilizar los frutos no germinados restantes. El óptimo período de espera para finalizar las observaciones de germinación en cada semillero es de cerca de 16 semanas de la fecha de siembra o cuando se ha alcanzado el 85% de germinación, lo primero que acontezca.

El vivero en bolsas de plástico - Como se mencionó anteriormente hay dos tipos de viveros para el establecimiento de plántulas de cocotero: viveros en bolsas de plástico y en suelo, un vivero en bolsa plástica (Fig. 11) hace uso de bolsas negras de polietileno, lo que le da el nombre, se prefiere sobre el vivero de suelo debido a que: a) el impacto del trasplante es minimizado grandemente, y es por eso que se promueve el establecimiento temprano de plántulas; b) las plántulas pueden ser retenidas por un período mas largo en el vivero cuando las condiciones para la siembra en el campo no son favorables y; c) la selección de plántulas con la edad conveniente se logra fácilmente.

Preparación de la tierra - Dependiendo del área, puede comprender tanto una limpieza del área de hierbas u otra vegetación existente como una profunda o leve preparación del suelo que faciliten las operaciones como el almacenamiento y la colocación de los frutos.

Embolsado de plántulas - Una bolsa plástica resistente, preferentemente negra resistente a los rayos ultravioleta con medidas de 40 x 40 x 0.015 cm (para frutos pequeños) o 45 x 45 x 0.015 cm (para frutos grandes) con 8 a 10 hoyos en los lados del fondo de la bolsa, se rellena hasta la mitad con tierra y composta mezclada a una proporción de 50:50. Pueden ser utilizados aserrín descompuesto, mazorcas de maíz, cáscara de arroz u otras materias orgánicas; esto reducirá el peso de la bolsa a medio llenar y mejorará la fertilidad de la tierra. Si las bolsas no son con dobleces en el fondo (nota: las bolsas pueden ordenarse con dobleces en el fondo), las esquinas del fondo deberán de doblarse hacia adentro para hacer el fondo de la bolsa redondo para que se mantengan firmes. El lado abierto de la bolsa también debe ser doblado hacia atrás (cerca de 3 cm) para prevenir que se rompa con facilidad. El fruto germinado es entonces colocado en bolsas a medio-llenar con el brote en posición erecta en el centro de la bolsa; después, la bolsa es llenada con tierra con los lados ligeramente presionados para mantener el fruto firme hasta que éste, esté completamente cubierto. En lo que a la tierra se refiere, ésta cubrirá arriba de 2/3 del fruto después de algún tiempo. Cuando las plántulas embolsadas estén listas, éstas serán colocadas en el vivero.

Disposición de las plántulas embolsadas en el vivero - La colocación de las plántulas a un distanciamiento óptimo, les permite crecer y desarrollarse normalmente. La técnica consiste en un arreglo triangular con distanciamientos iguales de 60 cm. Los materiales necesitados son los siguientes:

- 30 m de cuerda o sogas para establecer una Línea recta y hacer un triángulo 3, 4, 5.
- 100 estacas de bambú o su equivalente, de 30 cm de largo
- una cinta métrica o estaca marcada
- sogas para marcar espacios de 30 cm, de unos 10 m de largo
- estacas, de 52 cm de largo
- un machete afilado o su equivalente
- brújula
- plumón o marcador

La figura 12 muestra como estos materiales son utilizados para lograr espaciamientos de 60 cm de manera triangular, para minimizar el sombreado, las filas deberán de orientarse en dirección Norte-Sur.

Para iniciar se marca una cuerda de 10 m aproximadamente (preferentemente de algodón), cada 30 cm a lo largo de su longitud. Primero se establece una línea recta y una esquina de 90° con el lado más largo hacia el norte. Esto se hace fácilmente haciendo un triángulo 3, 4, y 5 utilizando una soga de 30 m. Los linderos se fijan con la soga para guiar la disposición de las filas. Esto se realiza para establecer los cuatro linderos con líneas rectas y las cuatro esquinas de 90°.

El siguiente paso es tender el corcel de 10 m con las marcas a 30 cm con dirección al norte y entonces marcar los espaciamientos de 30 cm convirtiéndose en la fila 1 o línea 1. Para hacer la fila 2 o línea 2, se miden 52 cm hacia el este (o al oeste) en ambas puntas extremas de la fila 1, entonces se alinea el cordel de 10 m y se marcan los distanciamientos cada 30 cm y subsecuentemente en cada marca de 30 cm se clavan las estacas. Se repite el procedimiento para hacer las líneas 3, 4, 5, etc. Para establecer los distanciamientos de 60 cm; se remueven alternadamente las estacas de cada fila, iniciando en la segunda marca en la fila 2. Esto está marcado (x) en la Fig. 12. A medida que el trabajo progresa, los trabajadores ganan experiencia, las estacadas estarán entonces cada 60 cm.

La medida de un vivero de plantas embolsadas podría ser de 3 x 6 m con un espaciamiento entre lotes de 1.5 m. Cada lote o parcela se acomodarían fácilmente 115 plántulas mientras que solo de 72 a 96 palmas serían usadas, las plántulas extra pudieran ser necesitadas en el futuro como reemplazo o sustitución.

Fijación de las plántulas embolsadas - Las plántulas embolsadas son colocadas de frente a la estaca, y fijadas firmemente con el brote alineado con la estaca. Dado que el centrado del brote en la bolsa puede no ser preciso, el brote emergente puede orientarse al punto más cercano de la estaca.

Situar las plántulas embolsadas en el mismo orden como van germinando. Las plántulas que presentaron una germinación temprana son colocadas en la primera fila, en el lado este del lote. Las últimas en germinar son colocadas en la sección oeste del lote. Esta práctica reduce la competencia por la luz solar entre los brotes tempranos y los tardíos. Lo más importante de esta práctica es que al momento de ir colocando a las plántulas en las filas se va seleccionando a las más vigorosas, y posteriormente su colocación señala con facilidad su edad. Una pizarra indicando el tipo/variedad, número de plántulas y fecha de transplante se instala al frente de cada lote.

Mantenimiento del vivero de plántulas embolsadas - En orden de prioridad, esta actividad involucra riego, deshierbe e inspección de plagas y enfermedades. La aplicación de fertilizantes para cada plántula es recomendable como sigue:

Edad después de germinar (meses)	Sulfato de amonio (NH ₄) ₂ SO ₄ 21-0-0 (g)	Cloruro de potasio (KCl) 0-0-60 (g)	OR	Cloruro de sodio (NaCl) (g)
2	20	25		20
5	40	45		40

Los fertilizantes son mezclados y aplicados directamente en la tierra alrededor de los frutos. Posteriormente, la tierra es ligeramente removida para promover una más pronta disolución y absorción del fertilizante.

Después de transcurridos 6-8 meses del embolsado, ocurre la separación de los folíolos en las hojas, indicando que las plántulas están listas para ser plantadas en el campo.

Capítulo 5

DISEÑOS EXPERIMENTALES Y ANALISIS DE DATOS

La evaluación *in situ* y *ex situ* de la diversidad genética, las técnicas para la obtención o producción de plántulas y el manejo de plántulas en vivero han sido descritas en los capítulos anteriores. Este capítulo se enfoca al diseño experimental, los métodos usados en la colección de datos, en el análisis de los mismos en el banco de genes campo y en los ensayos experimentales.

Principios básicos

Tres principios básicos son necesarios para lograr un control válido y eficiente del error experimental, los cuales deberán ser seguidos en el diseño y en el arreglo de los experimentos. Estos son:

Replicación - La replicación proporciona un estimado del error experimental, mejora la precisión del experimento mediante la reducción del error estándar de la media e incrementa el alcance de la inferencia de los resultados experimentales

Aleatorización - Esta es realizada para evitar un sesgo en el error estimado del experimento y para asegurar la validez de pruebas estadísticas.

Control experimental del error - El error experimental puede controlarse o reducirse mediante la utilización de bloques.

En adición, a estos tres principios básicos, se recomienda incluir una variedad local de cotejo, esto proporciona un medio para comparar “ganancias” o “beneficios” del comportamiento de los materiales a prueba o de los tratamientos sometidos con respecto a los cultivos locales.

Selección del tamaño de muestra

Tres factores deben ser considerados cuando se selecciona el tamaño de la muestra para medir un carácter.

- (1) El intervalo de confianza deseado (**CI**): es el intervalo $[x-b_{\alpha}, x+b_{\alpha}]$ alrededor del promedio muestral (**x**), el cual incluye al “promedio real” de la población (**m**) a una probabilidad $1-\alpha$ (generalmente, $\alpha = 0.05$).
- (2) El coeficiente de variación (**CV**) de una simple medida está determinado por la variabilidad de la población y el error experimental.
- (3) El costo de una muestra, el cual está relacionado con el tamaño de la muestra **N**.

Dado $CI_{\alpha} = x \pm b_{\alpha}/m \times 100$, los factores están ligados por la fórmula:

$$CI_{0.05} = 1.96 \times CV/\sqrt{N}$$

donde el factor 1.96 corresponde a una $\alpha = 0.05$. Así calculamos el tamaño de muestra como sigue:

$$N = \{ 1.96 \times CV/CI_{0.05} \}^2$$

La Tabla 1 muestra los valores calculados para un tamaño óptimo de muestra de acuerdo a **CV** y al $CI_{0.05}$.

Tabla 1. Tamaño óptimo de muestra de acuerdo a CV y al $CI_{0,05}$

$CI_{0,05}$	Coeficiente de variación (%)								
	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0	22.5	25.0
5.0%	4	9	16	25	35	48	62	78	97
7.5%	2	4	7	11	16	21	28	35	43
10.0%	1	3	4	7	9	12	16	20	25
12.5%	1	2	3	4	6	8	10	13	16
15.0%	1	1	2	3	4	6	7	9	11

Los caracteres de los componentes del fruto generalmente son mas variables que los caracteres vegetativos. Por esta razón, y debido a su importancia económica, el tamaño de la muestra no debe ser inferior a las utilizadas para las mediciones vegetativas. Se necesitan medir cuando menos 30 palmas para obtener un CI fluctuando de $\pm 5\%$ a $\pm 7.5\%$ para los estudios de componentes de fruto.

Diseño experimental para la colección de germoplasma

Tamaño de la población - El tamaño de muestra recomendada por población o variedad en las pruebas de campo fluctúa de entre 72 a 96 palmas para una población con alta heterogeneidad, un tamaño de muestra más baja podría ser utilizada para enanos homogéneos, pero es beneficioso el mismo número.

Arreglo - Además de la caracterización de las accesiones en el banco de genes es muy importante estimar la variabilidad genética dentro y entre poblaciones. Un diseño de bloque completamente al azar puede ser utilizado ya que las diferencias ambientales entre bloques puede ser minimizada. En el banco de genes, es recomendable el uso de lotes de 6 filas de 5 palmas con tres réplicas. El diseño de una sola fila debería descartarse porque está sujeto a un error alto.

Cultivar de cotejo o población control - Una evaluación exacta de cultivares en una colección es conducida en relación con una población bien conocida como control. Un control de enano debe usarse para ecotipos de enanos mientras que poblaciones altas deben servir para cotejar las variedades altas.

La frecuencia de un cultivar control depende del diseño experimental seleccionado. Si este es uno de bloques completamente al azar, el cultivar control debe tener lugar en cada bloque. En los casos donde las plantas para los tratamientos o el área para la investigación son limitativos, los tratamientos deben ser colocados en un bloque simple de parcelas no replicadas, considerando que el control ocurra más frecuentemente, por ejemplo: uno de cada cuatro entradas.

Los cultivares control se plantan al principio y al final de 4 bloques de tratamiento para permitir la comparación de su crecimiento y desarrollo. En la estación de investigación del cocotero en el Marc Delorme en Costa de Marfil, como fue descrito por De Nuce de Lamothe (1977, 1979, 1981), Sangare *et al.* (1984), N'Cho *et al.* (1988), el Enano Amarillo Malayo (MYD) es el control para los cocoteros

enanos, mientras que el Alto Oeste Africano (WAT) es utilizado como control para los cocoteros altos. Por otra parte, en el Centro de Investigación de Zamboanga PCA, el MYD es también utilizado para los enanos mientras que al alto Bay-Bay es utilizado como control para los altos.

Densidad de plantación - La densidad de plantación óptima para los ecotipos enanos es de 180 palmas/ha. (8 m en triángulo); para los altos una densidad de 143 palmas/ha. (9 m en triángulo). Esta densidad podría ser aumentada a un máximo de 210 palmas/ha. (7.5 m triangular) para ecotipos enanos con copas pequeñas o cuando el terreno es limitativo.

Condiciones de manejo para una exacta caracterización y evaluación.

Cualquier fuente de heterogeneidad que pueda aumentar el error experimental y reducir la exactitud debe ser evitada para permitir una mejor evaluación del germoplasma. Esto requiere un manejo eficiente del campo donde se establece el banco de genes, a través de una colaboración efectiva interdisciplinaria entre los productores, agrónomos y especialistas en protección de las plantas.

Marcaje y muestreo - Para facilitar la evaluación, debe adoptarse un sistema de marcaje por número de campo, número de fila y número de palma dentro de fila. Las palmas muestra, en la evaluación de las diferentes variedades deben poseer una marca específica. Deben usarse etiquetas de aluminio para grabar las marcas y como material de amarre el alambre de cobre, para asegurar que la etiqueta sea durable por muchos años tanto en el vivero como en el campo. En áreas donde los trabajadores del campo no estén calificados, un método de marcaje sencillo es desde luego más apropiado. Etiquetas simples son generalmente preferidas ya que el tamaño del estudio morfológico y el de componentes de fruto abarca 30 palmas por variedad. Debe seguirse un método regular de obtención de datos del rendimiento (en los enanos e híbridos enano por enano mensualmente; y en los enanos por alto, alto por alto y altos cada dos meses). Para el análisis de los componentes de la fruta, la frecuencia es bimensual, la cual está descrita con mas detalle en la sección del ACF.

Diseños experimentales para pruebas de híbridos

En esta sección se presenta el esquema de los lotes de cruza y las condiciones para la obtención eficiente y análisis de los datos de campo.

Tamaño óptimo de la población - Por población o lote de híbridos se entiende, 24 progenitores masculinos que se cruzan con un número suficiente de progenitores hembras (un mínimo de 48 palmas), las cuales producirán las semillas suficientes, requeridas para cada combinación (144) en el término de 3 meses.

Dado un índice de selección de cerca de un 67% en la etapa de semillero en el vivero, éstas semillas darán 96 plántulas lo cual es el tamaño óptimo para usar por híbrido (t x t; e x e ó e x t). Estos estimados pueden variar debido a las condiciones específicas de cada estación experimental.

Diseño experimental - El objetivo general del diseño experimental es el de reducir el error experimental y aumentar la precisión cuando se comparen los tratamientos (rendimiento de materiales probados, tolerancia a enfermedades, a estrés ambiental). Bloques completamente al azar, cuadro latino, y diseños balanceados de bloques incompletos (Cochran y Cox 1957; Fisher 1960; Addelman 1970) son frecuentemente utilizados por mejoradores de cocotero. La selección de un diseño dependerá del objetivo de las pruebas, el número de accesiones a probar y la homogeneidad del campo experimental.

Por ejemplo, un ensayo de rendimiento que comprenda una prueba general de habilidad combinatoria entre ecotipos (e x e ó a x a), es adecuado un diseño simple de bloque al azar. El diseño de cuadro latino es mas adecuado si los declives del terreno se deben controlar. Por otra parte, un diseño de bloque incompleto balanceado es preferido cuando una característica específica de la palma es el centro de preocupación, dado que esta clase de ensayos incluye un gran número de familias de medios hermanos. El diseño para el estudio de resistencia a enfermedades bajo exposición en

condiciones naturales es similar al arreglo para pruebas de campo. Aparte de estos diseños de bloque, el diseño completamente aleatorio (DCA) con una palma individual por réplica puede utilizarse bajo condiciones uniformes del campo (sin declive) y cuando la competencia entre los materiales probados es mínima.

La densidad de plantación sugerida para los híbridos a x a es de 143 palmas/ha, 180 para los enanos y e x e , y 160 para e x e híbridos dispuestos en un sistema triangular.

Tamaño de parcela - Existe efecto de xenia (influencia del genotipo de polen sobre el endospermo de la semilla) y un alto grado de entrecruzamiento entre la mayoría de los cocoteros altos e híbridos, de ahí que se necesiten grandes parcelas para estimar el componente de copra por fruto para cada prueba de híbridos. En pruebas entre ecotipos con alta heterogeneidad, se sugiere una parcela de 24 palmas (4 x 6), mientras que para las pruebas de comportamiento entre familias de medias hermanas, es adecuada una parcela de 16 palmas (4 x 4).

Número de réplicas - En la literatura puede encontrarse un número estándar de réplicas basado en la variabilidad, comparación de medias, en una prueba de varianza, o en otras pruebas estadísticas para detectar diferencias. Sin embargo el material vegetal del cocotero ocupa un gran espacio y la tierra es frecuentemente limitada, requiriéndose un enfoque más realista para la determinación del número de réplicas, por ejemplo; cuatro réplicas con parcelas de 24 palmas o seis réplicas con parcelas de 16 palmas son suficientes en un diseño de bloques completamente al azar para ensayo de rendimiento. Podrían adoptarse ensayos multilocalizados para incrementar el número de repeticiones.

Filas guarda - Dos filas-guarda (primera y última filas) pueden servir para proteger el área experimental. Dentro de cada fila, la primera y última palma son utilizadas como guardias. Las filas guarda deberán de plantarse con el mismo tipo de material. Las palmas en fila guardas no deben de tomarse como muestra para poder eliminar efectos externos o de orilla.

Control - Un verdadero experimento de rendimiento requiere del uso de un cultivar local como control. El PB-121 (Enano Malayo Amarillo x Alto Oeste Africano), cultivados a nivel mundial, pueden ser utilizados como cotejo internacional para pruebas de producción de híbridos en e x a. EAT x RLT para a x a; por añadidura a otros híbridos locales. Para referencia, la variedad local puede ser plantada en ambos extremos del ensayo para realizar comparaciones relativas.

Aplicación de fertilizantes y control de enfermedades - Los híbridos expresan mejor su potencial genético bajo condiciones óptimas nutricionales. Por lo tanto, es muy importante monitorear el estado nutricional de los materiales a prueba a través de análisis foliar. Una proporción estándar de fertilizante es recomendada (Manciot *et al.* 1979), misma que deberá ser aplicada en todos los tratamientos. Además, las plantas deberán mantenerse con un control adecuado de plagas y enfermedades cuando el objetivo primario de los estudios sea el rendimiento. Cuando la tolerancia a las enfermedades es el objetivo principal, la exposición natural a la infección es por supuesto necesaria para la evaluación de los materiales a prueba.

Marcaje - *Producir* cocotero es un trabajo largo y tedioso, el cual requiere de cuidado especial en cuanto al sistema de registros para evitar errores que pudieran ocurrir en cualquier etapa de la experimentación; desde la producción de semillas híbridas, su manejo en el vivero, evaluación de plantación de campo. Libros de acceso dando información sobre el origen y genealogía de los materiales probados, registros del vivero y los diseños en el campo deben de mantenerse. Las palmas deben marcarse siguiendo el sistema especificado anteriormente en este capítulo. Aún más, las muestras de palmas deberán de marcarse específicamente. Un archivo detallando del estado de cada palma en el ensayo (reemplazo, productor, anormal, muerta, fila de orilla) deberían estar disponibles y actualizados cada año.

Muestreo - Los caracteres vegetativos y reproductivos se observan usando 30 palmas seleccionadas al azar por cada accesión de híbrido. Para los componentes del rendimiento, número de racimos y frutos son contados en cada palma individualmente durante cada cosecha, la cual se efectúa bimestralmente (en caso de los altos a x a e híbridos e x a), ó mensualmente (en caso de enanos e híbridos e x e híbridos). Para el análisis de componentes del fruto, se tomará un fruto por palma y se analizará una muestra compuesta por parcela.

Colección de datos - Los pasos precisos fueron detallados en el Capítulo 7.

Análisis de datos - En el Capítulo 2 se sugirieron métodos para el análisis de datos. Sin embargo, en esta sección se pone énfasis sobre el manejo de datos para facilitar el análisis. Varios archivos de datos se requieren para un eficiente manejo de datos en un programa de producción de cocotero: a) información sobre el estado de la palma; b) origen e identidad de las combinaciones probadas en cada ensayo; c) número de racimos y frutos; d) contenido de copra y aceite; datos sobre los componentes del fruto y e) otros caracteres cualitativos. Para el análisis de datos, un software común deberá ser desarrollado para mejoramiento y ensayos genéticos.

Capítulo 6

ESTABLECIMIENTO DE LA PLANTACION

Cuando se ha seleccionado el sitio apropiado para la colección de germoplasma o para la siembra de un ensayo de híbridos, la cantidad de trabajo para la preparación del terreno dependerá de la naturaleza de la tierra que se utilizará. Las prácticas recomendadas para la preparación del terreno deberán de llevarse a cabo para permitir la óptima siembra y subsecuentemente la aplicación de tratamientos en el campo. El terreno debe prepararse antes de la siembra de acuerdo al diseño experimental seleccionado.

Preparación del terreno

Como otros cultivos, el cocotero no puede establecerse dentro de una vegetación densa. El terreno deberá estar limpio de vegetación y escombros, esto es necesariamente primordial a fin de eliminar posibles sitios en donde se encuentre el destructivo escarabajo rinoceronte. Por tanto, el área deberá estar despejada de árboles caídos, arbustos, tocones, hierbas y otras materiales que obstruyan, y hasta entonces será arado y rastreado el terreno para mejorar el declive.

Demarcación del terreno

La demarcación se hace siguiendo un sistema triangular como se muestra en la Fig. 12. La densidad de sembrado por hectárea para cada tipo de cocotero se muestra a continuación:

	Altos, A x A	E x A	Enanos, E x E
Densidad (palmas/ha)	143	160	180
Distancia entre palmas	9 m	8.5 m	8 m
Distancia entre filas	7.8 m	7.35 m	6.9 m

Vías de acceso y drenaje

Son necesarias vías de acceso para descargar las plántulas y los útiles de labranza, y más tarde para transportar los productos. Estas también facilitan la inspección, las entradas para la colecta de datos y la evaluación de los materiales. El diseño de un bloque experimental o genético determina el tamaño y largo de las vías de acceso. El drenaje de la superficie es esencial para evitar los encharcamientos y consecuentemente la pudrición de los troncos.

Medidas de conservación del suelo

Carreteras, caminos y bloques deberán ser realizados de tal manera que el terreno no quede ondulado o anegado para evitar la erosión del suelo y permita una óptima movilidad.

Preparación de pocetas

Antes de excavar las pocetas, se ponen guías para la siembra, usando dos estacas, colocadas a distancias iguales. Estas indican el centro del agujero donde se colocarán las plántulas mas tarde, y deberán estar perfectamente alineadas. Debe de tenerse en cuenta que el uso de estacas que marquen los centros serán las guías de siembra a la hora de plantar, la reubicación de estacas en el agujero

puede hacerse fácilmente. Los agujeros deberán de excabarse a un tamaño de 50 x 50 x 50 cm. Esta operación se inicia dos meses antes de sembrar para permitir que la tierra se estabilice en los lados y el fondo de las pocetas. La alteración del suelo estimula la promoción temprana de la raíz al contacto con la tierra.

Selección de plántulas

La selección de plántulas es un proceso indispensable en todos los trabajos encaminados a mejorar los rendimientos. La selección de plántulas pretende obtener materiales de alta calidad para el establecimiento de las plantaciones. Cuando ésta se hace correctamente se puede aumentar fácilmente y uniformemente la producción en un 10% o un poco más. Para los ensayos de híbridos, los materiales a prueba deben tener una "imagen genética" representativa del germoplasma seleccionado, al ser seleccionadas las plántulas deben estar libres de plagas y enfermedades mostrando una buena germinación, un buen desarrollo vegetativo y vigor. A no ser que el número de plántulas con apariencias "anormales" excedan significativamente al número promedio de las plántulas con apariencia "normal" en la población, la selección debe dirigirse a las plántulas con apariencia normal. Si se observara una mayor incidencia a lo usual de plántulas anormales, es aconsejable cotejar si esto también se observó en los registros pre-prospectivos.

A menos que sean significativas, como por ejemplo: que el número sea del tamaño adecuado, los rasgos sean distintivos y uniformes, las plántulas con las siguientes características serán eliminadas inmediatamente: con brotes múltiples, delgadas, etioladas, albinas o que carezcan de clorofila.

Registro y disposición de las plantas

Después de hacer la localización en el campo, debe prepararse un plano o mapa de la plantación. En el plano, las parcelas serán identificadas para mostrar los sitios específicos donde van a ir sembradas las palmas. Esto facilita la identificación de la genealogía de las palmas.

Establecimiento de la plantación

La mejor época para trasplantar las plántulas es durante la época de lluvias. Por eso, el tiempo de enviverado debe llevarse a cabo de acuerdo con los cambios de las temporadas. Las palmas, deben tener entre 8 y 10 meses de edad, pero hasta con seis meses se pueden sembrar las plántulas siempre y cuando las condiciones garanticen el establecimiento, por ejem: si las plántulas tuviesen 8 meses cuando se inicia la temporada de secas.

Las plántulas de 8 meses dan una mejor idea de su crecimiento y desarrollo general. Sin embargo, las diferencias en vigor son observadas mejor cuando las plántulas son aún más jóvenes, cuando la mayoría de sus hojas aún son muy suculentas.

Las plántulas deberán de plantarse inmediatamente en el campo después de ser removidas del vivero, cuando muy tarde 3 días después para reducir la mortalidad. Antes del trasplante, cada poceta debe recibir aplicación de fertilizantes mezclados con tierra. Además, o en lugar de estos, debe añadirse una pequeña cantidad de materia orgánica, como algas marinas (sargazo), cáscaras de cocotero o cualquier material de composta, puede colocarse en el fondo de la poceta y ser cubierto con tierra, dejando cerca de 1/3 parte libre para que el fruto de la plántula se asiente.

Para plántulas embolsadas, primero remuévase la bolsa, luego trasplántese la plántula. El agujero deberá cubrirse con tierra suelta, ligeramente firme en la base de la copa o corona. La parte de arriba del fruto debe estar como a 5 u 8 cm. bajo el nivel del suelo. Una siembra profunda puede sofocar el brote mientras que el sembrado a poca profundidad puede causar que el material plantado se abata, se incline, o ladee durante los días de fuerte lluvia y viento. Una ligera depresión hacia la base de la copa o corona proporciona mayor capacidad para recoger agua de lluvia.

Capítulo 7

OBTENCION DE DATOS

Una de las etapas más difíciles en la investigación del cocotero, es la obtención de datos en el campo, a intervalos y durante un largo período de tiempo. Esto es debido en parte por el gran tamaño del campo experimental el cual frecuentemente cubre un área de cuando menos varias hectáreas.

Un “investigador de cocotero deberá por lo tanto, estar preparado para estar expuesto a la penosas condiciones de las pruebas de campo donde se requiere la paciencia, el buen sentido común y la perseverancia.

En el presente capítulo se describe a detalle los varios pasos que deberán seguirse tanto para la colección de germoplasma como para los ensayos de híbridos. Se sugiere una forma en el Capítulo 11. El Capítulo se subdivide en tres secciones: pre-establecimiento (vivero ó etapa de plántula) pre-floración (juvenil) y post-floración o fase reproductiva.

Datos sobre las plántulas

Velocidad de germinación - La velocidad promedio de germinación es usualmente indicada como el número de días desde la fecha de siembra hasta alcanzar: a) el inicio; b) el 25%; c) el 50%; d) el 75% y c) el porcentaje máximo de germinación, basados en el número de frutos sembrados por accesión o población. Este carácter es importante ya que en el cocotero está positivamente correlacionado con la floración (nota: por razones prácticas, se hacen observaciones a intervalos semanales y el número de días se determina por interpolación)

Germinación final - Esta es expresada como un porcentaje, producto del número final de semillas germinadas a 4 meses de haber sido sembradas, sobre el número total de semillas sembradas. Es muy difícil estudiar los caracteres de la germinación en accesiones recientemente introducidas de algún país, dando el retraso en el envío y los desórdenes que esto conlleva en los frutos. En tales casos, se recomienda que las observaciones sobre una velocidad de germinación se haga bien, sea en el país que las está exportando ó en el país importador, tan pronto como las palmas introducidas comienzan a producir.

Número de hojas emitidas (datos sobre producción de hojas) - La producción de hojas es definida como el número de hojas producidas o emitido por una palma en un período definido de tiempo. Este dato se toma antes de establecer las palmas en el campo, siguiendo los siguientes pasos:

1. Marcado de hoja - Esta actividad es muy importante porque sirve como la base para el conteo subsecuente de las hojas en el campo. La hoja número uno es la hoja más joven abierta, y que exhibe o muestra el último folíolo más cerca del brote. La hoja es marcada pintando una pequeña porción del raquis que servirá como seña para el conteo de las hojas emitidas en los períodos de tiempo siguientes (Fig. 13).
2. Conteo - Contar el número de hojas, comenzando desde la hoja más vieja, hacia arriba hasta la hoja número uno. En una plántula de cocotero, la primera hoja es la hoja más vieja, la cual se ve emerger del “cogollo” y la cual sale del mesocarpo, es llamada hoja falsa o pseudohoja. Dado que ésta pudo haberse caído, comenzar a contar a partir de la primera hoja verdadera, la cual emerge como hoja espada, a pesar de que esté pequeña. Regístrese el número de hojas emitidas.

Perímetro. - En una plántula, el perímetro es una porción angosta, localizada justamente entre el punto de germinación y la base de la hoja más vieja. El perímetro se determina usando una cinta métrica atándola alrededor de la base de la plántula. Las mediciones del perímetro se llevan a cabo en intervalos específicos sobre treinta plantas seleccionadas al azar, como por ejemplo en plántulas de 3 a 6 meses en los bancos de genes y sobretodo en las palmas de ensayos experimentales con híbridos.

Obtención de datos de campo: Crecimiento vegetativo antes de floración.

Obtener los datos tan pronto como las plantas hayan sido establecidas en campo. Dado que los datos de esta fase dependerán de los previos tomados durante la siembra, es necesario tomarlos en cuenta para los datos iniciales de producción de hojas.

Número de hojas emitidas (datos sobre producción de la hoja) - La producción de la hoja es un carácter muy simple de observarse. Sin embargo, como en cualquier otra observación hecha en cocotero, el tiempo del intervalo entre observaciones y el tamaño del área experimental que se cubrirá lo hacen un poco difícil. Por ésta razón, los pasos siguientes deben de tomarse en cuenta, para evitar confusión y asegurar observaciones regulares y precisas:

1. Marcar la hoja número uno (Fig. 13), la hoja más joven completamente abierta que se encuentra más cerca al cogollo y que exhibe o muestra el último folíolo insertado. La hoja es marcada por medio de una pintura en una pequeña porción de raquis que servirá como guía para el conteo de las hojas emitidas en un período de tiempo subsecuente. Nótese que la hoja marcada con el número uno se convertirá en la hoja 6 ó 7, seis meses después del último conteo.
2. Contar el número de hojas, comenzando de la hoja subsecuente a la hoja marcada previamente hasta llegar a la nueva hoja número uno. Siga la dirección de la fitolaxia de la palma mientras cuente.
3. Registre el número de hojas producidas en la forma presentada en el Capítulo 11.

Frecuencia de la obtención de datos de la producción de hojas - La producción de hojas es registrada mediante el conteo de las hojas producidas cada seis meses por los primeros 5 años de edad de la palma ó hasta que el 50% de las palmas estén en floración. Lo que suceda primero. El total de dos conteos seguidos se toma como la tasa de producción foliar.

Perímetro - El perímetro de tallo de una palma es una porción angosta debajo de la hoja más vieja que aún esté viva, la cual es llamada "bola" cuando es medida cuando está a 20 cm del suelo, en una palma alta. Conforme una palma, madura, su perímetro se expande hasta que alcanza su máxima dimensión. Dado que el sitio donde se mide el perímetro se mueve hacia arriba conforme se desarrolla la palma, el tamaño del perímetro podrá disminuir o permanecer constante con el tiempo o edad. Después de todo, la palma comienza a crecer hacia arriba, formando el tallo. A pesar de que este carácter se encuentra fuertemente relacionado con el vigor bajo desarrollo normal, y después de 2.5 a 3.5 años, el tamaño del perímetro prácticamente permanece constante y por lo tanto ya no necesita ser medido. Una vez que el tallo se forma, se detiene el engrosamiento, esto es debido a la ausencia del *cambium*, el perímetro del tallo es medido utilizando una cinta de medición alrededor de la base del tallo, justamente debajo de la hoja mas vieja cada seis meses durante los primeros 3 ó 4 años de que la palma fue establecida en campo.

Medición de las hojas - En la etapa joven o juvenil (hasta los dos años) las mediciones de las hojas se toman de la previa hoja a la número 1 y se observa cada seis meses.

Los siguientes caracteres son anotados:

Largo del pecíolo - tomado desde la punta a la base de la primera inserción del folíolo (Fig. 5) promedio de 30 palmas o muestras.

Largo total de la hoja - tomado desde la unión del tallo o base del pecíolo hasta la punta del folíolo más alto, promedio de 30 muestras o palmas.

Número de folíolos - tomado por medio de un conteo de folíolos de un lado del raquis. El conteo se hace en juegos de 5 folíolos (por ejemplo: 5 x 10 juegos = 50 folíolos) utilizando un solo lado de la inserción de los folíolos. No es necesario contar ambos lados de la fronda de la hoja. Una manera práctica de contar los folíolos en una fronda madura es tomando un folíolo por grupo de 5 folíolos

Datos de floración y reproducción

Se requiere un registro comprensivo de la floración, producción y otros datos reproductivos en el cocotero para asegurar la estabilidad de producción/rendimiento, uniformidad y distinción. A pesar de que 10 años de rendimiento es aceptado como un medio de asegurar el valor de cierto material genético, períodos más largos de acopio de datos son alentados para una mejor y precisa información. A través de los años, es conveniente almacenar datos de rendimiento con regularidad, particularmente cuando nuevos productos y otros sub-productos que utilizan el coco apenas están en desarrollo.

Floración y distribución inicial - Más o menos 30 meses después de que el campo fue plantado con palmas de cocotero, especialmente con híbridos, éstos pasan a la etapa de transición e inician la floración. Este fenómeno debe registrarse ya que marca el arranque de la fase productiva. En problemas imprevistos de esterilidad en el manejo de cultivos y condiciones climáticas, se espera que, tan pronto como se ve que se inicia la floración de una palma individual, otras que pertenezcan a la misma variedad o población también iniciarán su floración.

En virtud de que esto no puede predecirse, aparte del conocimiento de que algunas palmas pudieran florecer en 30 meses, deberá de hacerse en este período, un programa de intervalo regular que determine el número de palmas en floración. El número de palmas floreciendo con la presencia del espádice inicial deberá de anotarse y tenerlo en cuenta. Esto proporciona información sobre cual población/accesión muestra una distribución más angosta o una floración más uniforme, así como el promedio de tiempo para alcanzar el 100 % de floración.

Para determinar la distribución de la floración, deberán seguirse los siguientes pasos:

- (a) Observar cada palma mensualmente desde el segundo año o mas tempranamente, para registrar la primera espádice.
- (b) Tan pronto como aparece la primera espádice, márchese con un marcador de tinta sobre la hoja No. 1 y la fecha de su surgimiento o brote.
- (c) Anotar el número de la palma de la población/accesión de que se trate y la fecha de su espádice inicial y su brote en forma apropiada. (Capítulo 11)
- (d) Para determinar la distribución de cada población, contar el número total de palmas con floración inicial trimestralmente. Indíquese el año y el trimestre que está cubriendo en esta observación.

Frecuencia de observaciones - Para los enanos y los híbridos (e x e), la frecuencia recomendada de observación es mensual, desde el primer año, y para los altos, (e x a) y los híbridos (a x a), mensualmente desde el segundo año a partir de que fueron plantados.

Morfología de la flor y de la inflorescencia (Fig 6)

Además de ser observados los caracteres como se en listan en el Capítulo 2, la biología floral debe ser estudiada durante todo el año en 12 palmas muestra, 2 años después de la primera floración para determinar lo siguiente:

- Duración de la fase masculina (días)
- Duración de la fase femenina (días)
- Período entre las fases (días) en una inflorescencia
- Período entre las inflorescencias sucesivas

Conteo de la femenina - Esta actividad se efectúa durante la cosecha de los frutos, siguiendo los pasos:

- (a) Con una podadora elimine cuidadosamente los botones donde estuvieron flores femeninas en cada espiguillas y contar las cicatrices de todos los botones. Este proceso se realiza para evitar repetición en el proceso de conteo de las cicatrices.
- (b) El número total de cicatrices de los botones observados en el racimo más el número de frutos cosechados representaría el número total de flores femeninas en una palma en particular

Conteo de las espiguillas - Después de contar las flores femeninas, contar el número total de espiguillas brotadas en el racimo, recortando individualmente las espiguillas lo más cerca del raquis y simultáneamente contarlas. El Capítulo 11 se detalla la obtención de los datos de registro en las formas.

Datos vegetativos después de la floración

El comportamiento de la floración, como se observa, no es uniforme en el cocotero. Generalmente, sin embargo las flores iniciales pueden aparecer dentro de los 2-5 años 6 más tempranamente después de la siembra, después de la cual los siguientes datos vegetativos deberán de anotarse usándola guía de formas adecuados presentados en el Capítulo 11.

Medición del tallo (circunferencia) - Tómese solamente una vez en dos puntos de las 30 palmas normales seleccionadas al azar por población o híbridos. La circunferencia del tallo a 20 cm. y a 1.5 m del nivel del suelo, usando una cinta métrica rodeando el tallo.

Altura de la planta - Mídase desde el nivel del suelo a la base de la fronda más vieja, igualmente en las 30 palmas normales seleccionadas al azar. Los datos se toman a los 6 y 10 años de haber sido plantadas.

Largo del tallo entre 11 cicatrices de hojas - Mídase a 1.5 m arriba del nivel del suelo a los 10 años de edad. Tomar la medida desde la base de la cicatriz No. 1 a la base de la cicatriz No. 11 como se muestra en la figura 2

Medidas de la hoja - Tómense de la fronda viva más vieja de 12 de las palmas normales seleccionadas por población. Esto se hace, separando la hoja seleccionada de la corona.

Las mediciones (en cm con un decimal, donde sea aplicable) se hace solamente una vez para los siguientes caracteres:

- (a) Largo del pecíolo - medido del tallo a la base de la inserción del primer folíolo.
- (b) Grueso del pecíolo - usando un vernier calibrado midiendo con la punta extendida el grueso, esto es, medido a la base de la inserción de la primera hoja hacia el centro del ancho del pecíolo (Fig. 5).
- (e) Ancho del pecíolo - usando el mismo calibrador, midiéndolo en la base de la inserción del primer folíolo.
- (d) Largo del raquis - medido desde la base de la inserción del primer folíolo hasta el punto más lejano de la hoja.
- (e) Número de folíolos - Se determina por conteo de los folíolos en un lado del raquis, desde el primer folíolo. Se toma el total, y el dato se multiplica por 2.
- (f) Ancho de folíolos - Se mide de la porción media de cada folíolo. Usando cuatro folíolos, dos de cada lado, donde la hoja muestra el raquis más ancho.
- (g) Largo del folíolo - Medida en los cuatro folíolos usados en (f).

Producción de racimos y frutos (PRF)

Cerca de un año después de la floración inicial cuando se espera rendimientos de frutos de la palma, el interés es enfocado al número de frutos, racimos, flores femeninas y espiguillas producidas por cada población/accesión.

Cosecha - La frecuencia de la cosecha es dos meses para altos, a x a y para los híbridos a x a, y mensualmente para enanos y para híbridos e x e. Hacer la cosecha muestreando 30 palmas fijas por población/accesión y en todas las palmas estudiadas en la prueba de híbridos. Poner por un lado los frutos muestreados como lo describe en la ACF en la sección de abajo. Se cosechan aquellos racimos

que tienen por lo menos uno o dos frutos cambiando a color café. Se registra en la forma de colecta de frutos y racimos (Capítulo 11) el total de racimos cosechados sobre las muestras individuales de palmas.

Conteo de frutos - Esta actividad comprende:

- (a) Separar los frutos de los racimos y contar el número total de frutos cosechados.
- (b) Agitar todos los frutos para encontrar si hay frutos anormales o estériles; y
- (e) Registrar el número de frutos cosechados incluyendo alguno anormal o estéril (indicar en la columna adecuada el número de frutos anormales o estériles observados).

Análisis de los Componentes del Fruto¹ (ACF)

Tan pronto como el 90% de las palmas en una accesión comienzan a ser productivas, puede iniciarse los análisis de componentes del fruto. La frecuencia del ACF es de seis veces en un año para todos los tipos, haciéndose durante cuatro años consecutivos y periódicamente de ahí en adelante como sea necesario.

Muestreo del fruto - Se toman al azar, un máximo de dos frutos por cada una de las 30 palmas de muestra. Para pruebas con híbridos, se toma un fruto por palma, por acceso. Sin embargo, el análisis se hace en lotes sobre la base de una parcela.

Identificar los frutos muestreados por palma, asignándole un número de serie y fecha de cosecha y juntar las muestras colectadas de la misma palma.

Manipulación y almacenamiento - Los frutos muestreados se transportan inmediatamente al cobertizo del vivero. A continuación, las muestras se dejan madurar hasta que todos los frutos toman un color café. Este proceso tarda cerca de 1 a 2 semanas.

Peso de los componentes del fruto - Los siguientes pasos son determinar los pesos de los componentes del fruto. Esto se expresa en gramos, con un decimal, donde sea aplicable

- (a) Peso total de la muestra en grupos por población - Cada grupo sería identificado adecuadamente
- (b) Peso total del fruto - Registro del peso del fruto PF y el número de muestras.
- (c) Quitar el mesocarpo del fruto y pesarlo - Registro del peso del fruto sin mesocarpo.
- (d) Partir el endocarpo o hueso en la parte del medio, eliminar el agua y registrar el peso del endocarpo mas el endospermo sólido o carne.
- (e) Quitar la carne del endocarpo y pesar. Registrar el peso del endocarpo o hueso.

Determinación de copra

Seleccionar la carne fresca del fruto o muestra del endospermo sólido - Al azar se seleccionan cuatro frutos de cada población o híbrido. Se parte el fruto y el endocarpo y se toma una muestra del endospermo fresco de la mitad del fruto que no posee el embrión y cerca de la zona ecuatorial (centro). Se muestrea cerca de 15 a 20 g de carne fresca de cada fruto.

¹ Para propósito de registrar el rendimiento, los participantes del STANTECH Workshop sugirieron el uso del término (nut o nuez) vgr. Número de nuez/palma/año, nuez/ha, etc. También para utilizarla como referencia al fruto sin mesocarpo. Cuando se hace referencia a la muestra y al análisis de los componentes como son, la cáscara, hueso, agua, carne fresca y copra se usa el término fruit o fruto. Carne fresca y albumen son términos usados para nombrar al endospermo sólido, mientras agua se refiere al endospermo líquido. El término copra se refiere al endospermo sólido seco y kernel se refiere a cualquiera de los dos. Agua de coco se refiere al endospermo líquido, mientras que leche de coco se refiere a la substancia la cual es extraída de la carne fresca.

Preparación de la carne fresca de la muestra - Se corta la carne de la muestra en pedazos de 1 x 2 cm y se ponen en una bolsa de plástico. Marcar correctamente y registrar el peso de la carne fresca.

Secado en horno - Se ponen muestras individuales en pedazos separados de papel aluminio y se colocan dentro de un horno para secarlas a 105°C por 9 a 10 horas con un período de enfriamiento durante la noche después de 4 a 5 horas de secado para evitar endurecimiento de la carne fresca.

Pesado de la carne secada en el horno - Las muestras se enfrían a temperatura ambiente después de secarlas y se registra el peso seco de la carne.

Modificación de la determinación de la humedad residual - La muestra de copra que tiene un 6% de contenido de humedad es ideal. Esto puede determinarse fácilmente usando medidas estándar de humedad. Sin embargo en ausencia de una medida de humedad, se toman tres muestras de carne secada en horno. Cortarla en pedazos delgados. Se registran los pesos de las muestras secadas al horno. Se debe estar seguro de que todos los pedazos están en buen estado. Se colocan las muestras en un horno para un posterior secado a 105°C durante 3 a 4 horas. Se registra el peso de las muestras secadas al horno. Repetir el proceso hasta tener las muestras a peso constante o sea que no haya variación de pesada a pesada. La diferencia entre el peso original de la muestra secada al horno y el peso final es el contenido de la humedad residual. El promedio de la humedad residual de las tres muestras se toma como la verdadera humedad residual.

Cálculos de recuperación de copra y caracteres de los componentes del fruto - Esto se discute en detalle en el Apéndice 4.

Unidades de medida para datos de rendimiento

Par calcular el rendimiento, el 5% es deducido de la densidad total de las palmas tomando en cuenta las anormales. Los rendimientos de fruto y copra se determina como sigue.

Rendimiento de frutos - El rendimiento de fruto expresa como el número de frutos/palma por año y como el número de frutos/ha/año.

Para todas las poblaciones, el número de frutos/palma por año es registrado como el promedio de la producción de frutos por población basado en la muestra de 30 palmas. Para híbridos, el número de frutos-palma por año, se toma de todas las palmas de muestra.

Fruto/ha por año se obtiene multiplicando el número de frutos/palma por año x 135 (para altos, A x A y E x A; plantadas a 9 m triangular) ó por 171 (para tipos enanos plantados a 8 m triangular) ó por su densidad menos 5% si es plantado a otros espacios.

Rendimiento de copra - El rendimiento es expresado ya sea como kg de copra/palma por año kg de copra/ha por año. Copra/fruto en gramos se toma del promedio de copra por fruto del ACF resumido por población. Copra/palma por año se determina multiplicando copra/fruto por fruto/palma por año. Copra/ha por año se calcula multiplicando copra/palma por año por la densidad plantada (menos el 5%).

Capítulo 8

POLINIZACION MANUAL CONTROLADA

El cocotero es una planta monoica (Fig 6), la sucesión de inflorescencias es mas o menos mensual, pero puede ocurrir que en la época seca tarde menos que en temporada de lluvias, cuando el clima es más húmedo. La duración de la fase masculina es de casi 20 días, pero esto puede variar de acuerdo con la variedad y la época, la fase femenina varía entre tres y cinco días en los tipos altos y en promedio hasta ocho días en las variedades de enanos. En casos extremos, la fase puede extenderse hasta 15 días. Cada flor femenina (también llamada “ovario”) permanece receptiva por uno ó tres días, la polinización se realiza naturalmente por insectos y por el viento; una vez que se ha realizado la fecundación, el estigma se necrosa. Si la flor es fertilizada se desarrolla en fruto, el cual botánicamente es clasificado como una drupa. Algunas flores femeninas no logran alcanzar la etapa de madurez. Durante las primeras seis semanas después de la polinización, mas del 70% de las flores se han caído. La época de cosecha de frutos se realiza después de 11 o 12 meses de que se han fertilizado las flores, es común que en promedio el 30% de los frutos permanezcan o “amarren”.

El polen del cocotero se desprende constantemente de las inflorescencias abiertas hasta el día 24 con un patrón basípeto (hacia la base), éste puede ser dispersado por el viento en la mayoría de los casos hasta 200 m y esporádicamente hasta 315 m (Child, 1974). La producción de polen por inflorescencia varía de poco más de un gramo en algunos cocoterios enanos hasta diez gramos en las variedades altas. El polen puede permanecer viable por vanos días a temperatura ambiente. El polen muere fácilmente cuando se expone al alcohol o a una temperatura de 150°C. El polen desprendido naturalmente no es confiable después de seis días y esto es atribuible a los cambios en las condiciones de humedad y sequía, alternados con cambios en las temperaturas bajas por la noche y altas durante el día.

Selección de padres masculinos y femeninos

El material paternal debe ser escogido con base en sus caracteres fenotípicos y su potencial genético, así como en su comportamiento vegetativo y crecimiento reproductivo. Deben tomarse en consideración características deseables, como la tolerancia a condiciones adversas, y resistencia a plagas y enfermedades. El conocimiento de las características básicas tanto de los cultivares enanos como altos de los ideotipos deseados, es el resultado de estudios genéticos y de pruebas de habilidad combinatoria, así como de los objetivos específicos en los programas de mejoramiento, los cuales son valiosos para guiar la selección de padres masculinos y femeninos.

Los cultivares enanos, debido a su precocidad y bajo crecimiento, son los más utilizados como progenitores femeninos, por otra parte, las poblaciones altas se utilizan como fuente de polen ya que poseen una producción estable, tolerancia a las condiciones adversas y resistencia a plagas y enfermedades.

Colecta de polen

Los métodos convencionales seguidos en la colecta de polen de cocotero, comprenden el aislamiento de la inflorescencia; la cosecha o recolección de flores masculinas; preparación y acondicionamiento del polen; y control de calidad del mismo. Los materiales y el equipo que se necesitan para llevar a cabo estos procedimientos se en listan en el Apéndice 5.

Bolsa colectora de flores masculinas - La bolsa colectora facilita la cosecha de flores masculinas y está diseñada para que después de la colección de polen sirva para la de la palma aceitera. Si se utiliza siguiendo las instrucciones se evitará la contaminación del polen. Entre sus características incluyen: una bolsa principal para la coleta de polen con una surtidor o manga al frente, una ventana y una manga a un lado por donde meter la mano; un recipiente para las espiguillas removible: y un tubo de polivinilo (PVC) (Fig. 14)

Ajuste de los componentes - El surtidor debajo de la ventana de plástico se refuerza con el tubo de PVC. La boca del recipiente receptor de la espiguillas se ajusta al surtidor y se amarra con una liga de hule. La manga del extremo donde se mete la mano también se amarra con una liga.

Cuidado de las bolsas de colecta - Después de cada uso, las bolsas deben ser cuidadosamente lavadas con agua y jabón, se tallan con la palma de la mano por los dos lados. Posteriormente, éstas deben ser remojadas en una solución al 5% de formalina y después se ponen a secar al sol. Cuando no están en uso las bolsas se rocían con "lysol" y se almacenan en cuartos secos.

En el campo, las bolsas algunas veces son dañadas por las ratas, que frecuentemente son atraídas por las semillas de Kapol (*Ceiba pentandra*). Esta planta deberá por lo tanto ser eliminada del área, así mismo debe limpiarse las estípulas de la base del pedúnculo de la inflorescencia. Si persistiera una fuerte invasión de animales, deberán de sebarse las copas de los árboles y la zona del suelo. Si fuera necesario, deben instalarse bandas para ratas en las palmas que se usan como progenitores.

Aislamiento de inflorescencias para la colección de polen - El aislamiento de la inflorescencia para la colección de flores masculinas es importante para obtener polen de la más alta pureza genética. Esta técnica es útil cuando pueda existir competencia a favor de algún otro polen contaminante. Sin embargo, el embolsarlo, reduce considerablemente la duración de la fase masculina debido a la alta temperatura dentro de la bolsa colectora de polen.

En virtud de que el polen tiene un lapso de vida de seis días bajo condiciones de campo, la inflorescencia de la cual las flores masculinas serán colectadas, deberá embolsarse cuando menos seis días antes de que las espiguillas se colecten. Dependiendo del tipo de cocotero y la calidad del polen necesitado, el embolsamiento deberá de hacerse ya sea el mismo día o un día después de que la espádice abra naturalmente. La técnica se describe a continuación.

Colocación de la bolsa - La espata de la inflorescencia que será aislada se remueve. La base del pedúnculo se envuelve con un paño de algodón previamente tratado con insecticida en polvo. Una pequeña cantidad de solución ligera de insecticida disuelto en agua se rocía sobre la inflorescencia para acabar con los insectos (Fig. 15). La bolsa colectora se coloca sobre la inflorescencia procurando no dañar las espigas y flores masculinas, y asegurando que el extremo abierto de la bolsa alcance el pedúnculo. Esta base de la bolsa es plegada sobre el paño o cojincillo de algodón y, asegurada con una liga (Fig. 16). La fecha del embolso se marca y se anota en el libro de registros.

Cosecha de flores masculinas - La duración prescrita de aislamiento de la inflorescencia es de seis a ocho días, después de que las espiguillas son cosechadas/colectadas (Fig. 17). Se podan con tijeras, y los brazos y manos del colector deben de ser desinfectados con una solución de 95% de alcohol etílico antes de abrir la bolsa. Se deben cortar las espigas una por una dentro de la bolsa, cerca de 5 cm por arriba de las flores femeninas, si las hubiese, y deben dejarse caer las espiguillas a través del surtidor dentro de la bolsa. Después de que el número deseado de espiguillas ha sido reunido, entonces se deben de separar cuidadosamente del surtidor y su extremo abierto se debe amarrar inmediatamente con una liga. La bolsa colectora de polen se quita para lavarse; la bolsa con las espiguillas se etiqueta con el número de la palma y la fecha de colección y después se traslada al laboratorio para ser procesada.

Para evitar errores, la etiqueta que indica el número de la palma debe colocarse dentro del recipiente de espiguillas, antes de embolsarlas.

En el caso de que se den dos colectas en una inflorescencia, córtese el número deseado de espiguillas y colóquelas en el recipiente de espiguillas. Cuidadosamente desprenda el recipiente de las espiguillas y amárrelo con una liga. Entonces inmediatamente inserte al servidor el otro recipiente para las espiguillas con su etiqueta adentro y amárrelo al surtidor.

Preparación y acondicionamiento del polen

En la cosecha en fresco, las flores masculinas están demasiado húmedas y emiten muy pocas cantidades de polen, también una gran proporción de estas flores se encuentra inmadura con polen

no viable. Esto explica el porcentaje relativamente bajo de polen viable en el cocotero. Por lo tanto, es necesario someter a las flores masculinas a una serie de tratamientos a fin de poder extraer mayores cantidades de polen viable.

Considerando que bajo condiciones naturales, el lapso de vida del polen fresco solamente es de algunos días, el polen debe de acondicionarse para prolongar y mantener su alta viabilidad. Hoy en día, la técnica mas efectiva para mantener el polen es deshidratado (al 5% de humedad) en un congelador y bajo condiciones de alto vacío. La preparación y acondicionamiento del polen sigue una serie de pasos que se describen a continuación:

Preparaciones - Antes de la esterilización meta una bolsa de papel dentro de pequeñas bolsas de lona y colóquelas adentro la caja de manipulación del polen o CNIP junto con pequeños pedazos de papel, llevando la fecha de colecta, el número de la palma y algunos clips (Fig. 18)

Desprendimiento de las flores masculinas de las espiguillas - Antes de manejar las bolsas llenas de espiguillas, desinfecte sus brazos y manos con un 95% de alcohol etílico. Abra uno de los extremos de la bolsa con espiguillas y colóquela en uno de los hoyos para brazos de la caja de manipulación de polen pre-esterilizada. Meta en el otro hoyo su brazo y desde adentro, saque las espigas con la mano y transfíralas todas a la caja de manipulación de polen (Fig. 19). Cuando todas las espiguillas se hayan pasado, retire la bolsa del agujero para brazos y guárdela en un closet para bolsas usadas. Esterilice sus brazos con alcohol y proceda a desprender las flores masculinas de las espiguillas dentro de la caja de manipulación de polen (Fig. 20).

Cuando las flores hayan sido desprendidas, póngalas en las bolsas de papel (Fig. 21a), es aconsejable utilizar una cantidad moderada de flores masculinas, por ejemplo un puñado por bolsa para facilitar el secado. La identidad del polen y la fecha de colección se identifican sobre cada bolsa de manta (Fig. 21b) usando las etiquetas de papel que se pegan a las bolsas de tela usando clips (ó sujetadores). En caso de que más de una colecta esté siendo procesada, cada clase de flores masculinas debe de manejarse en cajas aisladas por separado.

Molienda de flores masculinas - Las bolsas de lona protegen las flores masculinas durante la operación de molienda el cual se hace haciendo rodar una botella o un rodillo sobre la parte superior de la bolsa de manta para abrir las flores (Fig.22). Esto ayuda en el proceso de secado.

Secado de flores masculinas - El factor crucial en la producción de polen altamente viable es el proceso de secado de las flores masculinas. Las flores masculinas que han sido aplastadas mientras que aún permanecen dentro de las bolsas de manta se ponen dentro de una secadora de aire caliente (Fig 23). Para reducir el contenido de humedad a un nivel que asegure su conservación prolongada. La temperatura de secado debe mantenerse a menos de 40°C para evitar que se dañen los granos de polen. El total del período de secado varía entre 24 y 36 horas. Esto baja el contenido de humedad a casi 5%. El número de palma y el número de bolsa correspondiente por planta se anota en un libro de registros del horno (Capítulo 11).

Tamizado y empaque en las ampollitas - Después de haber sido secadas al horno y antes de tamizarlas, las bolsas de tela conteniendo las flores masculinas son ligeramente sacudidas para liberar los granos de polen. Entonces las bolsas de papel son sacadas de las bolsas de lona y pasadas a las cajas de manipulación de polen a través de las mangas. Los contenidos de las bolsas son vaciados o vertidos en un tamiz estéril que ha sido colocado dentro de la caja de manipulación de polen junto con etiquetas de papel y tapones de algodón.

El tamizado se hace dentro de la caja para manipulación de polen (Fig. 24) ya todas secas y mastrujadas las flores masculinas de una palma en particular son colocadas en un tamiz, suavemente son sacudidas para extraer y colocar el polen de las partes florales, y se coloca en un molde o traste con fondo. Este polen es colectado en cantidades de 0.4 a 0.5 g por cada ampollita de vidrio, taponadas con un algodón estéril con miras al proceso de secado por congelación y debidamente etiquetadas usando una etiqueta que la identifique indicando la identidad del polen y la fecha de la colecta. El polen debe de vaciarse laxamente en la ampollita para facilitar el secado por congelación. En caso de no disponer de ampollitas de vidrio, el polen deberá ser colectado en frascos igualmente utilizando tapones de algodón para cerrarlos.

Constricción de las ampollitas - Esto es necesario para facilitar el sello de las ampollitas después de hacer el secado por congelación. Utilizando un equipo especial, llamado constrictor de ampollitas, las ampollitas conteniendo el polen son constreñidas a 2 cm. Aproximadamente de su fondo abierto (Fig. 25).

Secado por congelación - Después de haber sido constreñidas las ampollitas, éstas son insertadas a presión en una de las tetillas de hule del aparato de secado por congelación (Fig 26). El secado por congelación mantiene el polen por más tiempo porque es secado con un contenido mínimo de humedad residual, mientras retiene por completo sus propiedades originales, por ejemplo proteína, viabilidad enzimas, etc. Al final un alto vacío es creado dentro de la ampollita, el polen retiene así por completo su calidad sin importar el que permanezca almacenado por un largo periodo de tiempo.

Deseccación de polen - Si la secadora por congelación no está disponible, el polen del cocotero puede almacenarse en pequeños frascos de vidrio con cubiertas porosas y colocados en un desecador. Una bolsa de gel de sílice (la cantidad depende del tamaño del desecador) su color puede ser utilizado como indicador para mantener la humedad relativa deseada en el desecador.

El polen desecado puede mantenerse viable para polinización manual por un corto período, por ejemplo 2 a 3 meses. Es importante, sin embargo, aislar cada clase de polen en el desecador para poder prevenir la contaminación del polen.

El sellado de ampollitas y la prueba al vacío - Después de activar la secadora por congelación por espacio de 15 a 20 min a 10^{-1} torr. Al final las ampollitas son selladas por calentamiento y comprimidas con una flama selladora de aire y gas (Fig. 27). El vacío es entonces probado en las ampollitas selladas por medio de un probador centelleante. El centelleo es visto al pasar a través de cualquier rajadura o pequeño agujero en la ampollita dando un claro indicio de que hay una hendidura o cuarteadura que indica el derrame del producto, en caso de que cualquier ampollita hubiera sido sellada inapropiadamente ésta será las primeras que deberán usarse.

Almacenamiento de polen - Las ampollitas selladas se mantienen en refrigeración (Fig. 28) por un período de hasta seis meses pero no más. La experiencia del centro de Investigación Zamboanga (Autoridad Filipina del Cocotero PCA), ha mostrado que el polen apropiadamente preparado, acondicionado y almacenado en un congelador puede retener su viabilidad hasta cinco años. No obstante, es necesario realizar regularmente pruebas de viabilidad de polen antes de usarlo, particularmente si la edad del polen sobrepasa los seis meses.

El polen deberá de sacarse del congelador solamente cuando se necesite porque la frecuente descongelación y derretimiento son perjudiciales para el polen. Todo polen almacenado deberá ser anotado en un registro de polen (Capítulo 11) para facilitar su retiro e identificación.

Control de calidad del polen

Prueba de viabilidad del polen - Una muestra de cada lote de polen se coloca aparte para la prueba de viabilidad y determinación del contenido de humedad. Si los resultados no son buenos, una segunda muestra es analizada; todo el lote es destruido en caso de contaminación. Los niveles de germinación del polen son analizados *in vitro* utilizando una solución de agar ligeramente dulce, suplementada con una pizca de ácido bórico.

Los siguientes pasos deberán de observarse en la observación de la germinación promedio del polen:

- (a) Disuelva 0.5 g de agar en 100 ml de agua destilada calentando suavemente con movimiento continuo hasta que el agar esté completamente disuelto.
- (b) Deje que el agar disuelto se enfríe un rato y añada 10 g de azúcar poco a poco con movimientos envolventes hasta que esté completamente disuelta.
- (e) Añada 1 ml de 100 ppm de ácido bórico mientras continúa moviendo.

- (d) Vierta 10 ml de este medio en una caja de petri limpia y deje que se enfríe a temperatura ambiente. Para prevenir que este medio solidificado se rompa, cúbrase la caja de petri con un cojín de algodón mojado adentro, la cubierta no debe ser quitada excepto cuando se espolvoree el polen en el medio y se examine el polen esparcido.

Espolvoreado de polen - Con una pequeña bola de algodón o un cepillo, se colecta una pequeña cantidad de granos de polen de una ampolleta o frasco. Esta muestra representativa de polen es sacudida o espolvoreada suavemente para formar una nube de polen sobre el medio, esta caja de petri es entonces cubierta y etiquetada. Debe usarse una caja de petri por muestra.

Determinación del porcentaje de germinación de polen - Después de haber activado la germinación de polen por exposición de éste en el medio durante dos horas a la temperatura ambiente, la viabilidad del polen es observada con el uso de un microscopio de luz (Fig. 29). Los granos de polen germinados, anormales y no germinados son contados y las lecturas se expresan como porcentajes del número total de polen contado. Para facilitar el conteo, se usa un contador de Tally. El conteo se realiza cuando al menos 100 granos de polen han sido registrados. El porcentaje de germinación de polen se calcula de la siguiente manera:

$$\text{PGG} = \frac{\text{Número de granos de polen germinados}}{\text{Número total de granos de polen}} \times 100$$

Las lecturas son registradas en una hoja de registro de polen, enfrente al número de la población muestreada (vea guía de formas en el Capítulo 11).

Para poder considerar un polen viable, la calidad normal aceptada es de cuando menos un 25% de germinación en un lote particular de polen. El polen con pobre viabilidad es desechado.

Contenido de humedad en el polen - Para secar el polen fresco colectado (después de haber sido tamizado) se coloca en un horno a 105°C durante 24 hrs lo cual deberá reducir el contenido de humedad entre un 4 y 8 %. Si el contenido de humedad es más del 8%, se necesita continuar con el proceso de secado.

Aislamiento de flores femeninas

Emasculación o remoción de flores masculinas - El tiempo de emasculación o retiro de las flores masculinas depende del inicio esperado de la fase femenina. Es aquí donde el conocimiento sobre la biología floral del progenitor femenino es importante.

Inicialmente la espádice se quita seguido de las flores masculinas de la inflorescencia. Las flores masculinas se colectan en una bolsa y se dispone de ellas según lo conducente (Fig. 30). Regístrese en el libro de registro y también en el pecíolo de la hoja, la fecha en que el trabajo se llevó a cabo. El corte de las espiguillas para facilitar la emasculación no es aconsejable debido a que dispara la producción de hormonas de maduración lo cual promueve la abscisión de flores femeninas. Además, dejando las espiguillas intactas, se previene cualquier roce accidental de las flores femeninas contra la bolsa de aislamiento (Figs. 31a y 31b).

Tiempo de embolsamiento - Para servir como guía en un tiempo determinado de embolse, la biología floral de la variedad usada como progenitor femenino deberá haber sido estudiada previamente. El embolse se hace cuando menos seis días antes de que cualquier flor femenina en una inflorescencia emasculada se vuelva receptiva. La receptividad de una flor femenina se nota por el derramamiento por el estigma de una secreción blanca.

Colocación de la bolsa - La bolsa es deslizada sobre la inflorescencia emasculada con su apertura hacia abajo, hacia el pedúnculo (Fig. 32). Entonces un tampón de algodón el cual ha sido previamente tratado con insecticida en polvo es colocado alrededor del pedúnculo donde se encuentra la apertura de la bolsa que está doblada. Una pequeña cantidad de insecticida en aerosol diluida con agua es rociada dentro de la bolsa antes de que finalmente se asegure el recinto con una liga de hule. La fecha de esta operación es registrada sobre la fronda y se anota en el libro de registros.

Transporte del polen - La polinización se realiza cuando las flores femeninas son receptivas. La receptividad se manifiesta cuando el estigma se parte y simultáneamente se nota la secreción del néctar. Para verificar esto, la inflorescencia aislada deberá de inspeccionarse diariamente o (dependiendo de la habilidad del polinizador) un día alternado desde el tiempo que el embolso sucede para determinar la fecha precisa de la receptividad.

Etiquetas y registros - Un día antes de la polinización el supervisor revisa a los progenitores femeninos que serán polinizados bien sea por visita directa al campo con el polinizador o mirando la pizarra de control de actividad de las plantas. El supervisor determina cuales palmas serán cruzadas mediante el plan de cruza previamente preparado e imprimiendo las etiquetas en las hojas individuales para este propósito (Capítulo 11). A cada polinización se le da un número y para evitar duplicaciones, se numera consecutivamente.

El día de la polinización, el polinizador recibe del supervisor las hojas preparadas y las somete al procesador de polen quien lo saca del congelador. Del número impreso de polinización en la hoja, el procesador de polen prepara una etiqueta utilizando una hoja de aluminio con un pedazo de alambre de cobre que se lo da al polinizador. Entonces el polinizador procede y se dirige al cuarto de mezcla de polen con talco.

Preparación del polen para la polinización - El polen viable de un solo donador es utilizado para cada polinización excepto cuando dos o mas progenitores femeninos simultáneamente requieren del mismo polen como se expresa en los planes de cruza.

Esterilización de equipo y premisas - Al final de cada día todas las cajas de manipulación de polen se limpian con alcohol y esterilizan por calentamiento a 150°C por 10 min. o un poco más. Las pipetas durante el día son lavadas con alcohol, los surtidores son sellados con cinta de enmascarar y colocados dentro de una caja manipuladora de polen previamente esterilizada, la cual se mantiene cerrada todo el tiempo.

Rehidratación de polen - Las ampolletas o viales se abren sin quitarles el tapón de algodón ni la etiqueta. Estas ampolletas son suspendidas en agua y se les deja reposar por una hora dentro de una cámara de humedad relativa. Sin embargo este paso puede ser omitido en caso de que se trate de polen fresco o polen no secado por congelación.

Llenado de pipetas o matraces roceadores (Fig. 33) - En virtud de que el polen rehidratado tiende a aglutinarse, deberá de mezclarse con polvo de talco antes de usarlo para alcanzar mejor dispersión. Debido a las propiedades hidrofísicas del talco (afinidad al agua) y termofílicas (estabilidad de temperatura), el polen se encontrará subsecuentemente protegido del calor y de estar demasiado húmedo. Mientras se le permite al polen rehidratarse, desinfecte manos y brazos con alcohol y llene cada pizeta o matraz con el talco requerido utilizando una cuchara de té. La mezcla se hará en una proporción aproximada de una parte de polen por ocho partes de talco. Esta operación debe de hacerse dentro de la caja manipuladora de polen. Tómese la pizeta o matraz y escríbase el número de cruza de progenitores sobre un pedazo de cinta adhesiva previamente colocada en cada pizeta. Limpie la parte externa de la pizeta con alcohol y distribuya individualmente cada pizeta en una caja manipuladora de polen.

Después, desinfecte manos y brazos con alcohol y mezcle el polen y el talco en cada pizeta, una a la vez. Antes de pasar a la caja siguiente, verifique que el surtidor y la tapa de la pizeta estén cuidadosamente sellados. Desinfecte manos y brazos con alcohol nuevamente y proceda a la caja siguiente. El mismo proceso es seguido hasta que el mezclado se termine. Después de completar esta operación, limpie y frote las cajas con alcohol.

Para facilitar la mezcla de polen/talco, es aconsejable tener un número adecuado de cajas para manipulación de polen. Si esto no es posible, una caja solo puede ser usada, después de que ha sido propiamente descontaminada por calentamiento a unos 150°C por 10 minutos o un poco más. Antes de salir del laboratorio de polen verifique nuevamente los números y los cruza específicas que se harán Entonces proceda al campo para continuar lo siguiente:

- (1) Cuidadosamente coloque la escalera (si se necesitara) cerca de la palma que será el progenitor femenino;
- (2) Tome el material correcto con la etiqueta llevando el número de cruce y la lata de insecticida en aerosol y suba;
- (3) Rocíe una pequeña cantidad de insecticida en aerosol diluido con agua alrededor de la inflorescencia para ahuyentar los insectos. Después quite el parche que cubre el pequeño agujero de la ventana de la bolsa y entonces retire el sello del surtidor de la pizeta o matraz e insértese dentro del agujero (Fig. 34). Haga tres o cuatro resoplidos de la mezcla de polen y talco dentro de la bolsa, golpeándola mientras sopla la mezcla de polen y talco. Retire la pizeta después y pegue el parche para cubrir el agujero;
- (4) Después de la primera polinización amarre la etiqueta al pedúnculo del racimo, bájese y escriba el número de la polinización en el libro duplicado. Si hay más palmas, para ser polinizadas repita los pasos anteriores;
- (5) El paso 3 es repetido por algunos días utilizando el mismo tipo de polen. En general la polinización es realizada por más de cuatro veces. En algunos casos la polinización se hace cada día, por ejemplo, para Enanos Rojos Malayos. Para producir semillas en progenitores de poblaciones altos, la polinización puede hacerse dos veces debido a la más o menos simultánea receptividad de las flores femeninas;
- (6) Al final del día deshágase de toda la mezcla remanente de polen/talco, lleve todas las pipetas y desinfectelas con alcohol. Todas las cajas de manipulación de polen deben ser esterilizadas y preparadas para ser usadas al día siguiente. La hoja de cruces es presentada al supervisor para cotejar y registrar el plan de cruces;
- (7) Antes de finalizar el día, indique en la pizarra de control de actividades las operaciones llevadas a cabo durante el día (Fig. 35).

Retiro de la bolsa de aislamiento - Tan pronto como el estigma de todas las flores femeninas se necrosa o se torna café-negruczo, la bolsa se retira (Fig. 36), usualmente esto ocurre entre el quinto o sexto día después de la última polinización. Para estar seguros, la inflorescencia polinizada es visitada en el tercero o cuarto día después de la última polinización. Después cuidadosamente quite la bolsa; la etiqueta se amarra firmemente al pedúnculo alrededor de la primera espiguilla en la base. La operación entonces es registrada.

Registro de la polinización - Tan pronto como se completa la polinización y la bolsa de aislamiento se ha retirado, la polinización es anotada en un libro de registro. Igualmente, en el libro correspondiente al plan de cruces se tacha.

Reporte mensual - Para tener conocimiento del progreso hecho en la polinización manual, un reporte mensual es escrito en el libro de registro del polinizador individualmente y entonces comparados con los registros de las polinizaciones. Debido a las heridas infligidas sobre la inflorescencia durante la emasculación y la atmósfera desfavorable creada por el embolsamiento, los frutos "amarrados" por polinización manual es usualmente muy baja, por ejemplo de uno a cuatro frutos por racimo.

Polinización en blanco - Los polinizadores y embolsadores deben de ser verificados. Durante la preparación del plan de cruces, la producción de plantas debe incluir polinizaciones en blanco, como un método de verificación de la calidad del trabajo. Algunas ampollas de polen muerto deben utilizarse pero esto sin que los polinizadores tengan conocimiento. El polen se mata hirviendo las ampollas a baño María durante 30 minutos, el polen muerto cuando se emite y si se aplica apropiadamente se puede cotejar la eficacia del embolsamiento ya que no se amarrarían frutos una semana después del desembolso. Los polinizadores deberán saber que hay polinizaciones falsas pero no deben saber cual está hecha con polen vivo o polen muerto. Si el fruto se desarrolla a partir de una polinización en falso después de 10 o 12 semanas, y es reportado en el registro mensual, se toma una acción apropiada para prevenir que se repita lo mismo. La verificación del sistema deberá ser empleado y en cada caso rectificado de manera adecuada según las necesidades.

Falta pagina 40 del original
Harvesting and handling of hybrid seednuts

Capítulo 9

CULTIVO DE EMBRIONES

La colección y conservación de los recursos genéticos del cocotero son prioridades muy importantes para los programas de mejoramiento (IBPGR, 1985). El fruto del cocotero se caracteriza por su volumen y peso considerables. La carencia de dormancia hace que las condiciones de transporte sean muy difíciles y costosas, además de que posee problemas fitosanitarios. El uso de técnicas *in vitro*, pueden facilitar el transporte y ofrecen algunas garantías fitosanitarias (Assy Bah *et al.* 1987). Además, la crioconservación de embriones cigóticos puede también jugar un papel muy importante en la conservación del germoplasma de cocotero y en el intercambio de recursos genéticos (Bajaj 1984; Assy Bah and Engelmann 1992b).

A continuación se presenta un resumen de los 10 años de trabajo de investigación llevado a cabo por el Instituto de Development de Foret/Department du plantes Oleagineous (IDEFOR/DPO) en colaboración con ORSTOM y CIRAD en relación a la colecta y cultivo de embriones cigóticos.

Colecta de frutos utilizando técnicas *in vitro*

La colecta a través de embriones cigóticos implica muestreo, desinfección y transferencia de los embriones al medio de cultivo. La edad ideal de los frutos es de 10 a 11 meses. Los embriones de frutos demasiados maduros, pueden crecer prematuramente y su desinfección en esta etapa es muy difícil.

Muestreo - El muestreo consiste en cortar un cilindro del endospermo el cual contiene al embrión. Esta operación se hace en condiciones no estériles. El fruto, ya sin el mesocarpo se abre. La parte del endospermo con el embrión se coloca sobre una tabla y se corta un cilindro de éste alrededor del embrión utilizando un sacacorchos de 2 cm de diámetro. El cilindro que se extrae lleva una porción de endospermo alrededor del embrión, la cual protege a este órgano durante su almacenamiento y desinfección. Este pedazo de endospermo, se retira justo en el momento de poner a cultivar el embrión en el medio de cultivo.

Desinfección - Los cilindros se ponen en un matraz de 500 ml conteniendo una solución al 8% de hipoclorito de calcio. Durante la imbibición, agitar una o dos veces el frasco. Después de la desinfección, los cilindros pueden ser almacenados y posteriormente los embriones ser cultivados ó pueden ser transferidos inmediatamente los embriones al medio de cultivo.

Transferencia de embriones en el campo - En el laboratorio, la transferencia se hace en una campana de flujo laminar, en el campo, la operación es diferente y se hace en una caja de inoculación para campo (Fig. 37) la cual debe estar equipada con una lámpara de alcohol para la desinfección de la navaja. La navaja se calienta en la flama, luego se introduce en la solución del hipoclorito de calcio para que enfríe antes de cortar el cilindro.

Usando la navaja, se corta cuidadosamente el cilindro de endospermo el cual envuelve al embrión, y éste se coloca en una caja de petri estéril, se lava con agua destilada estéril y se coloca en un matraz conteniendo el medio de cultivo estéril. Los tubos con los embriones pueden ser colocados directamente en un cuarto de cultivo (a 25-27°C) ó, conservados bajo sombra antes de ser transferidos al cuarto de cultivo.

Si el laboratorio donde se cultivarán los embriones está cerca del sitio de colecta, los cilindros de endospermo pueden ser muestreados en el campo y llevados al laboratorio. En este caso, colocar temporalmente los cilindros en una solución de KCl hasta el momento de sacar los embriones del cilindro.

Alineamiento del cilindro de endospermo

Después de la desinfección, los cilindros de endospermo con el embrión incluido se transfieren a un matraz de 30 ml con una solución de almacenamiento de KCl (16 g/L). La navaja se desinfecta regularmente por calentamiento. Todas estas operaciones, efectuadas sobre la flama evitan cualquier contaminación por micro organismos. Los embriones pueden ser transportados al laboratorio dentro de los cilindros de endospermo para posteriormente ser cultivados. Después del período de almacenaje (en KG) máximo de 14 días, el cilindro se desinfecta durante 20 min con una solución de hipoclorito de calcio. Después de ser rescatado cuidadosamente del cilindro con la ayuda de una navaja, entonces el embrión se lava con agua destilada estéril y se pone en el medio de cultivo (véase Tabla 1).

El cultivo directo en el campo tiene un porcentaje mayor de contaminación (10%) que los cultivos después de almacenar en los cilindros (5%). Ambos métodos son aceptables, ya que sus porcentajes de contaminación varía solo ligeramente del porcentaje de contaminación de los controles cultivados en el laboratorio. Este último tiene un porcentaje de contaminación de 3 a 8%.

Tabla 1- Equipo y materiales necesitados en la colecta de embriones de cocotero en el campo.

Material	Almacenamiento de embriones en cilindros de endospermo	Cultivo directo en el campo
4 L de solución de hipoclorito (8% cloro)	+	+
2 navajas	+	+
20 cajas de petri estériles	-	+
Película plástica (Kleen pack)	-	+
100 tubos, c/u con 20 ml de medio de cultivo	-	+
100 matraces de 30 ml conteniendo 15 ml de agua estéril	-	+
100 matraces de 30 ml conteniendo 15 ml de solución de KCl	+	-

El equipo básico está compuesto por: una esponja, un mechero pequeño para campana, un martillo, dos pares de pinzas (30 cm), dos sacabocados, un jabón, cuatro matraces de 500 ml c/u, una mesa portátil y una caja. Para el cultivo de 100 embriones, es necesario el equipo complementario detallado en la Tabla 1.

Medio de cultivo y condiciones aplicadas

Puede usarse un medio de cultivo simple, pero que asegure el adecuado desarrollo *in vitro* del embrión y alcance su subsecuente crecimiento en condiciones naturales. Este medio está compuesto de una solución mineral de Murashige and Skoog (1962) enriquecido con 41 mg/L de Fe-EDTA, 100 mg/L de ascorbato de sodio, 60 g/L de sacarosa, 2g/L de carbón activado y 7 g/L de agar a pH 5.5. El cultivo se coloca en obscuridad a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta la aparición de la plúmula. Cuando la plúmula aparece, entonces el cultivo se transfiere a un cuarto de cultivo con luz (35 EMm-2S-1) con un fotoperíodo de 12 horas. Los subcultivos se hacen cada mes.

Aclimatación

Un mes antes de transferir al vivero, las *vitro*-plántulas son subcultivadas en un medio con una alta concentración de sacarosa (60, 90, 120 g/L). Un mes después de estar en este medio las plántulas son lavadas con agua de la llave y transferidas en lotes, a arena previamente esterilizada en auto-clave. El uso de una cubierta de plástico durante las primeras dos semanas permite una atmósfera saturada. Los lotes de plántulas son regadas regularmente (3 veces a la semana) para mantener a la arena húmeda. Después del mes en esta condición, las plántulas son destapadas y expuestas al espacio abierto. Las plántulas son alimentadas cada 2 días con una solución nutritiva (Tabla 2). Tres meses después, las plántulas son transferidas de la arena y embolsadas en composta. La solución nutritiva es añadida regularmente a las plántulas para mantener el crecimiento.

Tabla 2. Solución nutritiva usada para la aclimatación de plántulas (mg/L).

KNO_3	274
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1095
KH_2PO_4	137
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	274
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	137
KCL	2.74
H_3BO_3	3
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.7
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.74
$(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.74
H_2SO_4	0.137
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.37
EDTA	26.1
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	24.9

ESTRATEGIA GENERALIZADA DE MUESTREO

Un problema básico en la colecta de germoplasma se deriva del hecho de que el cultivo tiene una distribución cosmopolita con un origen incierto.

Los Métodos para el muestreo fueron descritos en el Capítulo 2, las estrategias para el muestreo de rejilla gruesa y fina que se delinearán abajo garantiza que las áreas sean cuidadosamente exploradas y garantiza que un mínimo de áreas sean saltadas. Dado que no existe información sobre el flujo genético natural entre poblaciones de cocotero (tanto los estudios conducidos con polifenoles, electroforesis y más recientemente con patrones de ADN entre variedades de cocotero con diversas procedencias, todos produjeron resultados variables no concluyentes), la estrategia de muestreo de rejilla gruesa fue anteriormente descrita en un curso práctico inicialmente organizado por el IPGR (entonces IBPGR) en 1978 y 1979 en Bogor, Indonesia, habiendo probando su eficacia para una cobertura sistemática en las áreas de cocotero en Filipinas (Santos, 1987) y Malaysia (Jamadon, 1987). Cuando la combinamos con un muestreo segado de rejilla fina, el procedimiento garantiza que no se pierda diversidad importante. Otra característica de esta estrategia es que la exploración puede ser suspendida o reiniciada por el colector/ explorador si es necesario debido a que sean reidentificadas nuevas áreas.

Método de muestreo de rejilla gruesa

Los requisitos básicos son los siguientes:

1. Conocimiento de la extensión y distribución de las áreas cultivadas con cocoterros.
2. Conocimiento de la diversidad ambiental en las áreas cultivadas con cocoterros.

La implementación del procedimiento de muestreo de rejilla gruesa, incluye los siguientes pasos, los cuales han sido seguidos por la División de Genética y Mejoramiento del Philippine Coconut Authority (PCA), serán discutidos a manera de ilustración.

1. Un mapa apropiado de las Filipinas se obtuvo (Escala 1:1,000,000) y rejillas de aproximadamente de 40 por 40 km se marcaron (Fig. 38), siguiendo las divisiones/grados de latitud y longitud.
2. Todas las rejillas en las cuales existían cultivos de cocotero fueron identificadas y de acuerdo con el tamaño relativo o hectareaje, se determinó los sitios de muestreo por rejilla (ver punto 6 abajo).
3. Las rutas de viaje fueron realizadas por el líder de los equipos de exploración en cada Oficina Local, Regional y Provincial, poniendo especial cuidado para que las necesidades de equipo, materiales y sustancias fueran preparadas de antemano.
4. Equipos de dos personas (por ejemplo el líder y un técnico de la división y un técnico de campo/bajador de cocos) viajarán a los sitios preidentificados.
5. Se contrató mano de obra local para que ayudara a realizar el Análisis de Componentes del Fruto, a tomar los datos de caracteres morfológicos siguiendo la lista mínima de descriptores, y los datos de pasaporte.
6. Cada rejilla fue explorada utilizando de 5 a 6 sitios de muestreo (SM) con intervalos entre SM determinados de acuerdo a cualquier cambio notable en las condiciones ecológicas por ejemplo de costa a valle
7. Un guía local (generalmente un oficial o extensionista agrícola) asiste al equipo para explicar a los productores locales la utilidad de la exploración y la colecta.

Muestreo sesgado/colecta dirigida

1. Si el personal técnico encuentra algo nuevo, algo que ella ve o siente que no está representado en el banco de genes, el supervisor será notificado y él podrá determinar si la población encontrada es en efecto única. Si lo es, y no está presente una plaga o enfermedad evidente, decide realizar una colecta de 200 frutos. Estos son enviados al Centro de Investigación para su conservación en el banco de genes.

Como existe en el país una buena información sobre la distribución de enfermedades, el paso anterior es posible. Debe enfatizarse que solo puede hacerse si se está seguro de que no existen riesgos. De tal forma que la colecta no debe hacerse hasta que se está completamente seguro que la transferencia de material es segura y sana.

2. Los datos del pasaporte son enviados a la estación cuando cerca de 4 a 5 rejillas han sido exploradas. Esto significa que han sido colectados datos de 20 a 30 sitios. Los datos son sometidos a análisis mediante el método Mahalanobis de distancias generalizadas y análisis de conglomerados jerárquicos.
3. La exploración es siempre coordinada con oficiales locales y extensionistas porque, dependiendo de los resultados de los análisis multivariados, la colecta de frutos en los ranchos identificados será coordinada por los guías locales.

Colecta de frutos

Dependiendo de los resultados de los análisis estadísticos, muestras de frutos serán colectadas de tal forma que se cubra la más amplia colección de genotipos de la población identificada. Si en alguna rejilla no se notan diferencias en las condiciones ecológicas con respecto a otras rejillas pero entre sitios, entonces el mismo número de muestras se colectarán como se explica en el punto 6 de arriba, para lograr una mejor cobertura. La colecta o accesión resultante es entonces identificada en el banco de genes como Accesión No_, Rejilla #_, SM # 1, 2, 3, 4... plantada al azar dentro de un bloque designado con cada palma identificada apropiadamente así, como su origen exacto, por ejemplo Rejilla # A14, SM#3.

Capítulo 11

GUIA DEL FORMATO PARA REGISTRO DE DATOS

I	Datos del pasaporte:	IBPGR Lista de descriptores (Puede obtenerse de IPGRI)
II	Datos de Colecta:	Lista de descriptores de IBPGR
III	Datos de Caracterización:	Lista de descriptores de IBPGR
IV	Vivero:	Forma de código
	1. Datos de germinación	Forma 1
	2. Registro de frutos	Forma 2
V	Crecimiento vegetativo-estado juvenil	
	1. Observaciones semianuales de crecimiento	Forma 3
	2. Medición de hojas	Forma 4
VI	Datos de floración y reproducción	
	1. Observaciones semianuales de crecimiento	Forma 3
	2. Observaciones de floración	Forma 5
	3. Reparición de flores y racimos	Forma 6
	4. Registro mensual de cosecha	Forma 7
	5. Análisis de los componentes del fruto	Forma 8
	6. Datos del análisis de la copra y de las muestras frescas de la carne	Forma 9
VII	Medición de palmas maduras	
	1. Medición del tallo	Forma 10
	2. Medición de la altura de la planta	Forma 11
VIII	Polinización manual	
	1. Hoja para la colecta de polen	Forma 12
	2. Hoja de registro de horneado	Forma 13
	3. Registro del recibo del polen procesado	Forma 14
	4. Inventario de la colección de polen en campo	Forma 15
	5. Hoja de plan de entrecruzamiento	Forma 16
	6. Hoja de registro de polen	Forma 17
	7. Informe del envío de polen	Forma 18

Forma 2 - REGISTRO DE LAS SEMILLAS

Población: _____ Total de semillas sembradas: _____

Localidad: _____ Total de semillas germinadas: _____

Fecha de siembra: _____ Porcentaje de germinación: _____

No.	FECHA DE GERMINACION	PIGMEN-TACION	No.	FECHA DE GERMINACION	PIGMEN-TACION	No.	FECHA DE GERMINACION	PIGMEN-TACION
1			31			61		
2			32			62		
3			33			63		
4			34			64		
5			35			65		
6			36			66		
7			37			67		
8			38			68		
9			39			69		
10			40			70		
11			41			71		
12			42			72		
13			43			73		
14			44			74		
15			45			75		
16			46			76		
17			47			77		
18			48			78		
19			49			79		
20			50			80		
21			51			81		
22			52			82		
23			53			83		
24			54			84		
25			55			85		
26			56			86		
27			57			87		
28			58			88		
29			59			89		
30			60			90		

Sometido por: _____

Fecha: _____

Forma 12 - HOJA DE COLECTA DE POLEN

COLECTA DE POLEN			
POBLACION	PALMA NO.	POBLACION	PALMA NO.
NO. DE ESPIGUILLAS	FECHA	NO. DE ESPIGUILLAS	FECHA
HORA	COLECTOR	HORA	COLECTOR

COLECTA DE POLEN			
POBLACION	PALMA NO.	POBLACION	PALMA NO.
NO. DE ESPIGUILLAS	FECHA	NO. DE ESPIGUILLAS	FECHA
HORA	COLECTOR	HORA	COLECTOR

COLECTA DE POLEN			
POBLACION	PALMA NO.	POBLACION	PALMA NO.
NO. DE ESPIGUILLAS	FECHA	NO. DE ESPIGUILLAS	FECHA
HORA	COLECTOR	HORA	COLECTOR

Forma 16 - HOJA DEL PLAN DE CRUZAS

PROGENITOR FEMENINO	PLAN DE CRUZA	PROGENITOR FEMENINO	PLAN DE CRUZA
FECHA DE POLINIZACION	EDAD DEL POLEN	FECHA DE POLINIZACION	EDAD DEL POLEN
PROGENITOR MASCULINO	POLINIZACION No	PROGENITOR MASCULINO	POLINIZACION No

PROGENITOR FEMENINO	PLAN DE CRUZA	PROGENITOR FEMENINO	PLAN DE CRUZA
FECHA DE POLINIZACION	EDAD DEL POLEN	FECHA DE POLINIZACION	EDAD DEL POLEN
PROGENITOR MASCULINO	POLINIZACION No	PROGENITOR MASCULINO	POLINIZACION No

PROGENITOR FEMENINO	PLAN DE CRUZA	PROGENITOR FEMENINO	PLAN DE CRUZA
FECHA DE POLINIZACION	EDAD DEL POLEN	FECHA DE POLINIZACION	EDAD DEL POLEN
PROGENITOR MASCULINO	POLINIZACION No	PROGENITOR MASCULINO	POLINIZACION No

REFERENCIAS

- Addleman, S. 1970. Variability of treatments and experimental units in the design and analysis of experiments. J. Amer. Stat. Asso. 65. Pp1095-1108.
- Anonymous. 1968. General instructions for hand pollination and foliar diagnosis of the coconut palm. I.R.H.O. Document No 882, Square Petrarque, Paris 16, France.
- Assybah, B., Durand Gasselín, T. and Pannetier, C. 1987. Use of zygotic embryo culture to collect germplasm of coconut (*Cocos núcifera* L.) FAO/IBPGR Plant Genetic Res. Newslett. 71: 4-10.
- Assybah, B., Engelmann, F. 1992b. Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. Cryo-Letters. 13: 117-126.
- Bajaj, Y.P.S. 1984. Induction of growth in frozen embryos of coconut and ovules of citrus. Curr. Sci. 53: 1215-1216.
- Baliñgasa, E.N. and Carpio, C.B. 1976. Genetic potential of some coconut populations in the Philippines. PCA-ARB 1976 Annual Report. Pp7-19.
- _____ and Santos, G.A. 1978. Manual for coconut hand-pollination technique. Breeding and Genetics Division, PCA-ARB, Bago-Oshiro, Davao City. 45 p.
- _____. Carpio, C.B. and Cano, S.B. 1982. Characteristics of four dwarf coconut populations in the Philippines. PJCS. Pp 1-7.
- Breese, E.L. 1989. Regeneration and multiplication of germplasm resources in seed genebanks: the scientific background. IPGRI, Rome. 69 p.
- Carpio, C.B. 1982. Biochemical studies of *Cocos nucifera* L. Kalikasan Philipp. J. Biol., Pp 319-338.
- Child, R. 1974. Coconuts. Longman, Green & Co., London. 335 p.
- Cochran, W.G. and Cox, G.M. 1957. Experimental designs. John Wiley and Sons, Inc. New York. P 17.
- De Nuce De Lamothe, M. and Rognon, F. 1972. La production de semences hybrides chez le cocotier par fecondation naturelle dirigee. (The production of hybrid coconut seed by controlled pollination) (bilingual). Oleagineux. 27(10): 483-488.
- _____ 1977. Les Cocotiers Nains a Port Bouet (Côte d' Ivoire). I. Nain Jaune Ghana, Nain Rouge Malaise, Nain Vert Guinee Equatoriale et Nain Rouge Cameroun. Oleagineux. 32: 367-375.
- _____ and Wuidart, W. 1979. Les Cocotiers Grands a Port Bouet (Côte d' Ivoire). I. Grand Quest Africain, Grand de Mozambique, Grand de Polynesie, Grand de Malaise. Oleagineux. 34 (7): 347-349.
- _____ 1981. Les Cocotiers Grands a Port Bouet (Côte d' Ivoire). II. Grand Rennel, Grand Solomon, Grand Thaïlande, Grand Nouvelles Hebrides. Oleagineux. 36 (7): 363-365.
- _____ 1972. La production de semences hybrides chez le cocotier per pollinisation assistee. (The production of hybrid coconut seed by assisted pollination) (bilingual). Oleagineux. 27(11): 539-544.
- _____ 1975. Assisted pollination and contamination by undesirable pollens. Oleagineux. 30 (8-9): 359-364
- _____ and Sangare, A. 1980. La fecondation artificielle du cocotier. Oleagineux. 35 (4): 193-205.
- Duhamel, G. 1987. Piquetage de cocoteraies. Conseil de IRHO n °280. Oleagineux. 42: 325-326.
- Firman, I.D., Jackson, G.V.H. and Guarino, L. 1986. Guidelines for the transfer of coconut germplasm and inventory of South Pacific collections. Suva, Fiji, FAO. RAS/83/001. Field Document 10. 27 p.
- Fremond, Y.L. and De Nuce De Lamothe, M. 1971. Le block of amelioration du cocotier de Port Bouet (The coconut improvement block at Port Bouet) (bilingual), Oleagineux. 26 (2): 71-82.

- Fisher, R. A. 1960. The design of experiments (7th edn.). Hafner Pub. Co., Inc. New York.
- _____ 1966. The design of experiments (8th edn.). Hafner Pub. Co., Inc. New York. P 21.
- Frison, E.A. Putter, C.A.J. and Diekmann M. 1992. Safe movement of coconut germplasm. FAO/IBPGR technical report.
- IBPGR. 1985. IBPGR Advisory Committee on *in vitro* storage. Report of the Second Meeting, IBPGR Secretariat, Rome. 15 p.
- Jamadon B. 1987. Coconut genetic resources activities in Malaysia. Report of the First Meeting, UNDP/FAO Project RAS/80/032/G/01/02. Working Group on Genetic Improvement. IBPGR. Pp 32-45.
- Liyanage, D.V. 1954. Controlled pollination of coconut palms. Ceylon Coco Quarterly. 5:135-138.
- Mahindapala, R. and Pinto, J.L.I.G. 1991. Coconut cultivation. Coconut Research Institute, Bandirippuwa Estate, Lunuwila, Sri Lanka. 156 p.
- Manciot, R.M., Ollagnier and Ochs, R. 1979. Mineral nutrition and fertilization of the coconut around the world. Oleagineux. 34 (12): 563-580.
- Menon, K.P.V. and Pandalai, K.M. 1958. The coconut palm, A monograph. Indian Central Committee. Times of India Press, Bombay, India.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- N'Cho, Y.P., Le Saint, J.P. and Sangare, A. 1988. Les cocotiers nains a Port Bouet (Côte y d'Ivoire). III. Nain brun Nouvelle - Guinee, Nain Vert Thaïlande, Nain Rogue Polunesie. Oleagineux. 43: 32-45.
- Rognon, F. 1976. Floral biology of the coconut. Oleagineux. 31(1): 13-18.
- _____ and De Nuce De Lamothe, M. 1978. Harvesting, conditioning of pollen for the pollination of coconut seed gardens. Oleagineux. 33(1): 7-23.
- Sangare, A.F., Rognon, F. and De Nuce De Lamothe, M. 1978. Male and female phases in the inflorescence of the coconut: Influence on mode of reproduction. Oleagineux. 33 (12): 609-617.
- Santos, G.A. and Baliñgasa, E.N. 1977. Observations on the inflorescence component characters and pollen yield of five coconut populations. The Phil. J. of Coco. Studies. 11(4): 34-39.
- _____ 1987. Activities of coconut genetic resources collection and conservation in the Philippines. Report of the First Meeting. UNDP/FAO Project RAS/80/032/g/01/12. Working group on Genetic Improvement. IBPGR. Pp 56-72.
- Sangare, A., Le Saint, J..P. and De Nuce de Lamothe. 1984. Les cocotiers grands a Port Bouet (Côte d' Ivoire). III. Grand Canbodge, Grand Tonga, Grand Rotuma. Oleagineux. 39: 205-215.
- Vasil, I.K. 1963. Effect of boron on pollen tube growth: *In* International Symposium on Pollen Physiology and Fertilization. (H.F. Linskens, ed.). North Holland Publ. Co., Amsterdam. Pp 107-119.
- Withers, L.A. 1989. *In vitro* conservation and germplasm utilization: *In* The use of plant genetic resources. (Brown A.D.H., Marshall DR., Frankel O.H. and Williams J.T. eds.). Cambridge University Press. Cambridge.
- Whitehead, R.A. 1965. Speed of germination, a characteristic of possible taxonomic significance in *Cocos nucifera* L. Trop. Agric. 42: 369-372.
- Wuidart, W. 1979. Production of coconut planting material: Nursery selection. Oleagineux. 36: 453-456.
- _____ 1981. Production de material vegetal cocotier tenue d'un germoir. Oleagineux. 36: 305-309.

A P E N D I C E S

Apendice 1

Lista de

PARTICIPANTES DEL STANTECH WORKSHOP (Preparación de la versión inicial del manual)

Marc Delorme Coconut Research
Station Port Bouët, CÔTE D'IVOIRE
Junio 20-25, 1994 (1)

y

PROFESORES DEL CURSO SOBRE TECNICAS ESTANDARIZADAS PARA EL MEJORAMIENTO DEL COCOTERO

(Terminación de la preparación y pre-prueba del manual)

BALITKA, Coconut Research Institute
Manado, INDONESIA
Septiembre 19-29. 1995 (2)

SURESTE ASIATICO

Dr. NOVARIANTO HENGKY (1 y 2)

Mejorador de Cocotero
Research Institute for Coconut & Palmae
PO Box 1004
Manado 95001
INDONESIA
Tel:(0431)51430
Fax: (0431) 51587

Ms. TINA ROMPAS (2)

Investigadora en Mejoramiento, Balitka (misma dirección que el Dr. Novarianto)

Ms. ELSIE TENDA (2)

Investigadora en Mejoramiento, Balitka (misma dirección que el Dr. Novarianto)

Ms. DONATA S. PANDIN

Investigadora en Mejoramiento, Balitka (misma dirección que el Dr. Novarianto)

Mr. MIETAHORRACHMAN (2)

Investigador en Mejoramiento, Balitka (misma dirección que el Dr. Novarianto)

Mr. HELDERING TAMPAKE (2)

Mejorador de Cocotero
Coconut Research Station-West Java
c/o NCRDC, Jalan Tentara Pejelar 1
Bogor, 16111 INDONESIA
Tel/Fax: (0251) 336194

Mr. BERNARD BILLOTE (2)

Mejorador de Cocotero, CIRAD (misma dirección que el Dr. Novarianto)

Mr. RAMON RIVERA (1 y 2)

Científico Especialista
Breeding and Genetics Division
Philippine Coconut Authority (PCA), Zamboanga Research Center
San Ramon, Zamboanga City,
PHILIPPINES
Tel: (63 62) 991 03 80 c/o Ms. Manirose Marquez
Fax: (63 62) 991 5594 c/o Ms. Manirose Marquez

Mr. GERARDO SANTOS (1 y 2)

Division Chief III
Breeding and Genetics Division
Philippine Coconut Authority (PCA), Zamboanga Research Center
San Ramon, Zamboanga City,
PHILIPPINES
Fax (Davao Office): (6382) 293 0114 c/o PGCP
Tel: (Casa, Davao): (6382) 293 0061
Fax (Oficina Central): (632) 920 0415

Mr. CHULAPAN PETCHPIROON (1 y 2)

Mejorador de Cocotero
Chumplion Horticulture Research Center
Amphoe Sawi, Chumphon 86130,
THAILAND
Tel/Fax: (6677) 502589

Mr. VO VAN LONG (1 y 2)

Mejorador de Cocotero
Institute for Research on Oils and Oils Plants
171-175 Ham Nghi Street
District 1, Ho Chi Minh City,
VIETNAM
Tel:(848)297336
Fax: (848) 243528

Mr. ABDULLAH OTHMAN (2)

Oficial de Investigación
MARDI, Hilir Perak
PO Box 25 36007 Sungai Sumun
Perak, MALAYSIA
Tel: (05) 648 9242
Fax: (05) 548 9132

ASIA DEL SUR

Dr. RORAN RENICK PERIES (1)

Jefe, Genetics and Plant Breeding Division
Coconut Research Institute
Lunuwila, SRI LANKA
Tel: (9431) 5300 (Oficina)
(9431) 8115 (Casa)
Fax: (9431) 8363

Mr. LALITH PERERA (2)

Coconut Research Institute
Lunuwila, SRI LANKA
Tel: (9431) 5300 (Oficina)
Fax: (9431) 8363

Dr. (Mrs.) M. J. RATNAMBAL (1 y 2)

Investigador Titular
Central Plantation Crops Research Institute (CPCRI)
P. O. Kudlu
Kasaragod - 671 124
Tel: (91) 4995 22344 (Casa)
(91) 4995 22333 / 20094 (Oficina)
Fax: (91) 4995 23300

PACIFICO Y PNG

Mr. MATHIAS FAURE (1)

Mejorador de Cocotero
PNG Cocoa and Coconut Research Institute
PO Box 1846
PAPUA NEW GUINEA
Tel: (675) 293031 / 3077
Fax: (675) 293057

Mr. TORE OVASURU (2)

Mejorador de Cocotero
PNG Cocoa and Coconut Research Institute
PO Box 1846
PAPUA NEW GUINEA
Tel: (675) 293031 / 3077
Fax: (675) 293057

Mr. JOELI KAUVERE (1)

Oficial de Agricultura
Taveuni Coconut Centre
PO Box 84
Waiyevo, Taveuni, FIJI ISLANDS
Tel: (679) 880003 (Oficina)
(679) 880107 (Casa)
Fax: (679) 880050

Mr. GERARD DUHAMEL (1)

Coordinador de Proyecto PDICC-PRAP
Vanuatu Agricultural Research and Training Centre
VARTC - BP 231 Lugaville
Espiritu Santo,
VANUATU
Tel:(678)36320
Fax: (678) 36355

Mr. JEAN PIERRE LABOUISSSE (2)

Coordinador de Proyecto
Vanuatu Agricultural Research and Training Centre
VARTC - BP 231 Lugaville
Espíritu Santo,
VANUATU
Tel:(678) 36320
Fax: (678) 36355

Mr. SIAOSI EFU (2)

Ministry of Agriculture, Forests, Fisheries & Meteorology
P.O. Box 1878
APIA, Western Samoa
Fax: (685) 20613

AFRICA

Dr. ALLASSANE SANGARE (1)

Director, IDEFOR/DPO MARC DELORME
Coconut Research Station
07 PO Box 13, Abidjan 07 CÔTE D'IVOIRE
Tel: (225) 248872, 248067
Fax: (225) 226985

Dr. N'CHO YAVO PIERRE (1)

Jefe, Genetics and Breeding
IDEFOR/DPO MARC DELORME
Coconut Research Station
07 PO Box 13, Abidjan 07
CÔTE D'IVOIRE
Tel: (225) 248872, 248067
Fax: (225) 226985

Dr. ROLAND BOURDEIX (1)

Mejorador de Plantas
IDEFOR/DPO MARC DELORME
Coconut Research Station
07 PO Box 13, Abidjan 07
CÔTE D'IVOIRE
Tel: (225) 248872, 248067
Fax: (225) 226985

Mr. OWUSU NIPAH JOSEPH (1)

Oficial Asistente de Investigación
Oil Palm Research Institute
c/o C S I R Secretariat
PO Box M32
Accra, GHANA
Tel: (233) 777651-4 (4 lineas)
Fax: (233) 21-777655

Mr. AMADOU SANOUSI (1)

Jefe del Servicio de Selección
Institut Agricoles National des Recherches
Du Benin Station de Recherches sur le Cocotier
SEME-PODJI, BENIN
Tel:(229)240101

Mr. KENNEDY MKUMBO (1)

Mejorador de Plantas Asistente
National Coconut Development
PO Box 6226
Dar-Es-Salaam
TANZANIA
Tel: (255) 5174834 74605 74606
Fax: (255) 5174832 46454 6652

Dr. E.E.J. AKPAN (1)

Oficial en Jefe de Investigación
Nigerian Institute for Oil Palm Research (NIFOR)
P M B 1030 Benin City
NIGERIA
Tel: (52) 440130 (Oficina) (52) 440160 (Casa)
Fax: (52) 248549

AMERICA LATINA Y EL CARIBE

Mr. JOSE ARELLANO MORIN (1)

Botánico/Mejorador
Centro de Investigación Científica de Yucatán
C P 87 CORDEMEX
97310 Mérida, Yucatán
MEXICO
Tel: (5 1) 99 270110
Fax: (51) 983 20167

Mrs. MILLICENT WALLACE (1)

Botánica/Mejoradora de Plantas
Coconut Industry Board
18 Waterloo Road
Kingston,
JAMAICA, W.I.
Tel: (1809) 92 926177-1
Fax: (1809) 92 9681360

EUROPA

Dr. LUC BAUDOUIIN (1 y 2)

Mejorador/Genetista
UR AMI, PH/CO
CIRAD-CP
B P 5035
34032 - Montpellier Cedex 1
FRANCE
Tel: (33) 67 615800 - ext 5951 (Oficina)
(33) 67 591209 (Casa)
Fax: (33) 615792

Dr. FRANCOIS BONNOT

Division of Biometrics
CIRAD-CP
B P 5035
34032 - Montpellier Cedex 1
FRANCE
Tel: (33) 67 615800 - ext 5951 (Oficina)
(33) 67 591209 (Casa)
Fax: (33) 615792

IPGRI-APO, MALASIA

Dr. PONS BATUGAL (1 y 2)

Científico Titular y Coordinador de COGENT
International Plant Genetic; Resources Institute (IPGRI)
PO Box 236 UPM Post Office
43400 Serdang, Selangor Darul Elisan
MALAYSIA
Tel: (603) 942-3891
Fax: (603) 948-7655
E-mail: p.batugal@cgnet.coni

Apendice 2

LA DISTANCIA GENERALIZADA DE MARALANOBIS

INTRODUCCION

Para caracterizar la relación entre poblaciones multivariadas, varios problemas deben ser resueltos: prueba de conformidad de la media de una población, comparación de la media de dos poblaciones, definición de grupos de poblaciones. Cada uno de estos problemas requiere la definición de una distancia entre los valores de las medias \mathbf{m}_1 y \mathbf{m}_2 de dos poblaciones p -variadas, donde:

$$\mathbf{m}_1 = \begin{pmatrix} m_{11} \\ m_{12} \\ \vdots \\ m_{1p} \end{pmatrix}, \quad \mathbf{m}_2 = \begin{pmatrix} m_{21} \\ m_{22} \\ \vdots \\ m_{2p} \end{pmatrix},$$

m_{ij} , siendo el valor de la media de la variable en la población P. Muchos tipos de distancia entre \mathbf{m}_1 y \mathbf{m}_2 puede ser definido, por ejemplo la distancia euclidiana d está definida por:

$$d^2 = (\mathbf{m}_1 - \mathbf{m}_2)'(\mathbf{m}_1 - \mathbf{m}_2) = \sum_{i=1}^p (m_{1i} - m_{2i})^2$$

Pero distancias de este tipo no toman en cuenta las correlaciones entre variables. Por esta razón, d se incrementa indefinidamente con el número de variables, aún si las nuevas variables no añaden ninguna información útil para una mejor discriminación entre las dos poblaciones.

DEFINICION DE LA DISTANCIA GENERALIZADA MAHALANOBIS

Nos permite considerar dos poblaciones p -variadas con valores de las medias \mathbf{m}_1 , \mathbf{m}_2 y con la misma matriz de dispersión \mathbf{S} . El elemento sobre la línea i^{th} y la columna j^{th} de \mathbf{S} es la covarianza entre la variable \mathbf{F} y la variable f dentro de las poblaciones; si $i = j$, esto es, la varianza de la variable i^{th} entre las poblaciones. La distancia generalizada Mahalanobis es definida como:

$$D^2 = (\mathbf{m}_1 - \mathbf{m}_2)' \mathbf{S}^{-1} (\mathbf{m}_1 - \mathbf{m}_2) = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^p s_{ij} (m_{1i} - m_{2i})(m_{1j} - m_{2j})$$

donde s_{ij} es el elemento sobre la línea i^{th} y la columna j de \mathbf{S}^{-1} , matriz inversa de \mathbf{S} .

El principal interés de esta distancia es que toma en consideración las correlaciones entre variables. Una nueva variable siempre incrementa D^2 pero esta variación es pequeña si la nueva variable es redundante con otras. La distancia D^2 es independiente de cualquier cambio de origen o escala de las variables.

UNA APLICACION DE LA DISTANCIA GENERALIZADA MAHALANOBIS

Consideremos dos muestras p -variadas de tamaños N_1, N_2 a partir de las dos poblaciones previamente definidas. Si \bar{x}_1, \bar{x}_2 son las medias de las muestras, y $\mathbf{A}_1, \mathbf{A}_2$ las matrices de las sumas corregidas de cuadrados y productos, las matrices de dispersión de las muestras son $\mathbf{S}_1 = \mathbf{A}_1/N_1$ y $\mathbf{S}_2 = \mathbf{A}_2/N_2$. Bajo la hipótesis de que ambas poblaciones tienen la misma matriz de dispersión \mathbf{S} , esta matriz puede ser estimada por:

$$\hat{\mathbf{S}} = \frac{N_1 \mathbf{S}_1 + N_2 \mathbf{S}_2}{N_1 + N_2 - 2}$$

Entonces la distancia generalizada de Mahalanobis es estimado por

$$D^2 = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2)' \hat{\mathbf{S}}^{-1} (\bar{x}_1 - \bar{x}_2)$$

Y puede ser demostrado que bajo la hipótesis de que $m_1 = m_2$,

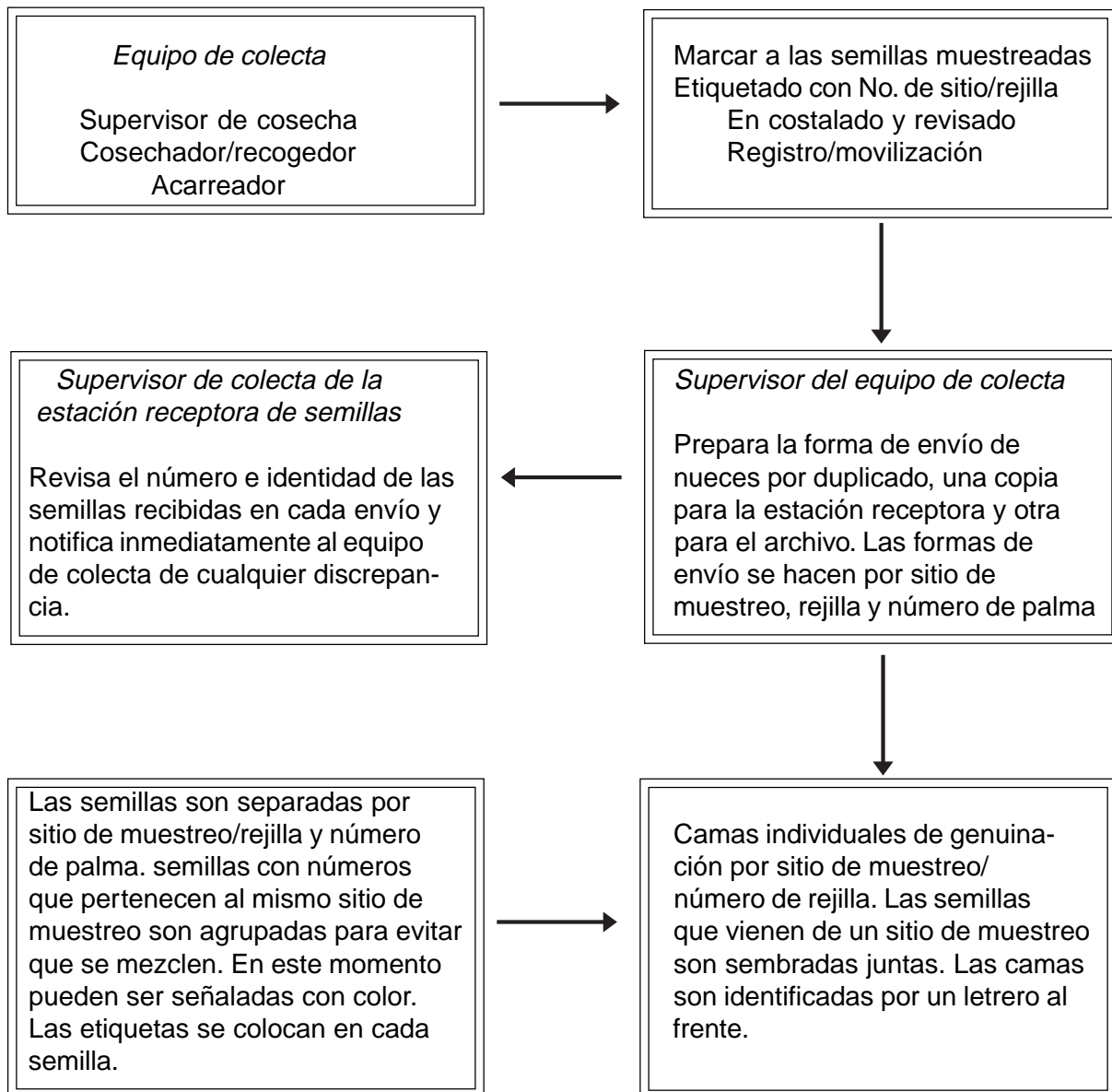
$$F = \frac{N_1 N_2 (N_1 + N_2 - p - 1)}{p (N_1 + N_2) (N_1 + N_2 - 2)} D^2$$

tiene una distribución de Fisher con p y $N_1 + N_2 - p - 1$ grados de libertad. Entonces m_1 y m_2 serán declaradas diferentes en el nivel α si F es mayor que el valor tabular de una variable de Fisher con p y $N_1 + N_2 - p - 1$ grados de libertad, en el nivel correspondiente a Esta prueba es conocida como la prueba T^2 de Hotelling.

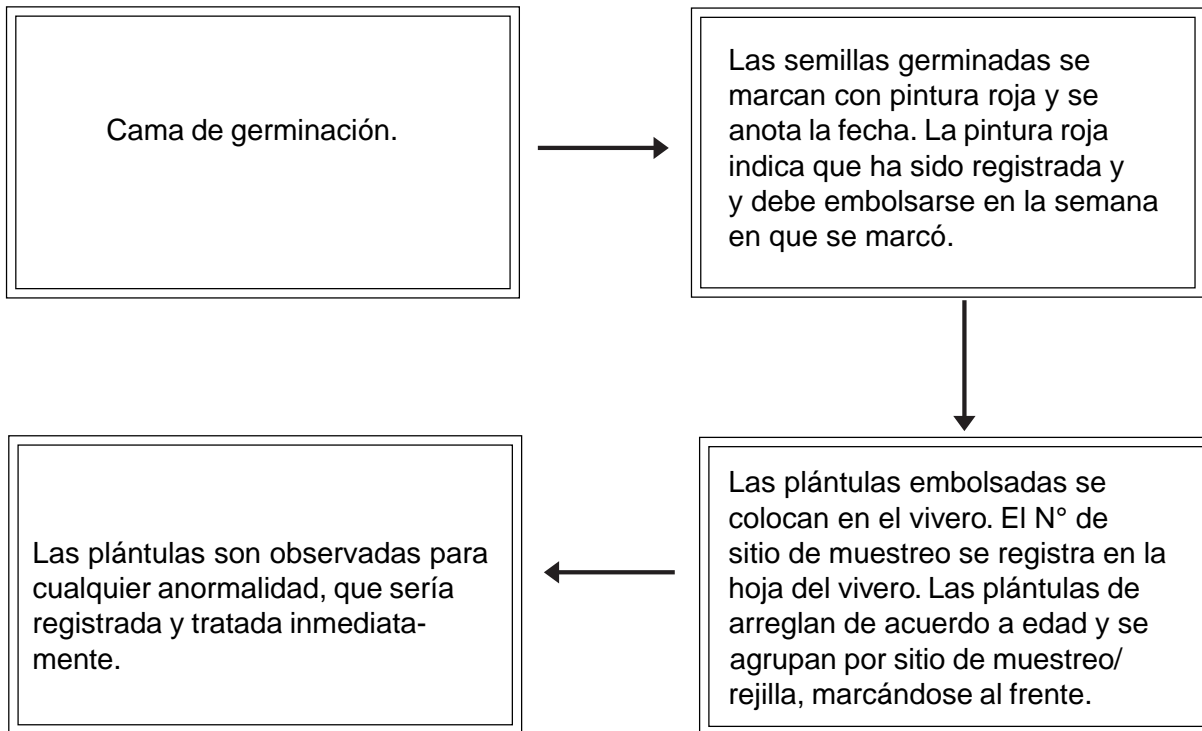
Apendice 3

DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL MANEJO DE SEMILLAS COLECTADAS Y PLANTULAS

A. DE LA COSECHA A LA CAMA DE GERMINACION



B. DE LA EXTRACCION DE LA CAMA AL VIVERO YA EMBOLSADAS



C. DEL VIVERO A LA SIEMBRA EN EL CAMPO

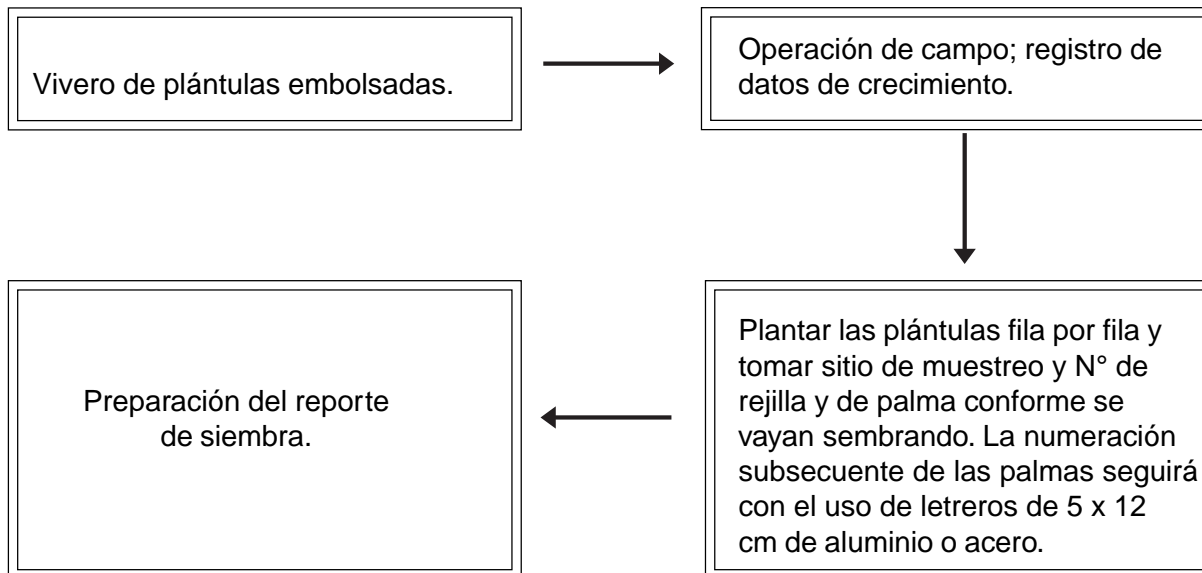




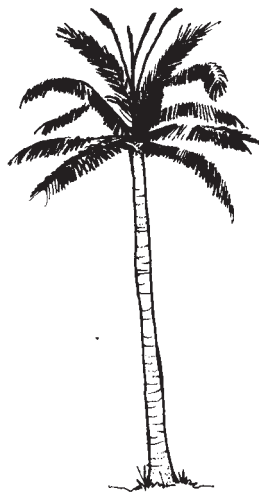
Fig. 1. Medición del diámetro del tallo, 1.5m del nivel del suelo



Fig. 2. Medición de la longitud del tallo hasta la cicatriz de la hoja 11



Esférica



Semiesférica



Forma de X



Forma de V

Fig. 3. Todas las formas de fronda.

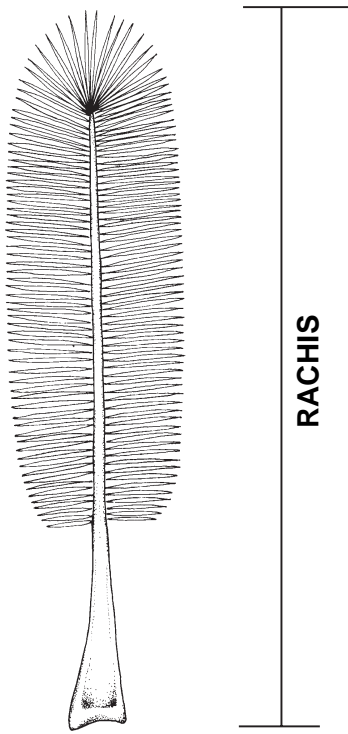


Fig. 4. Hoja del cocotero.

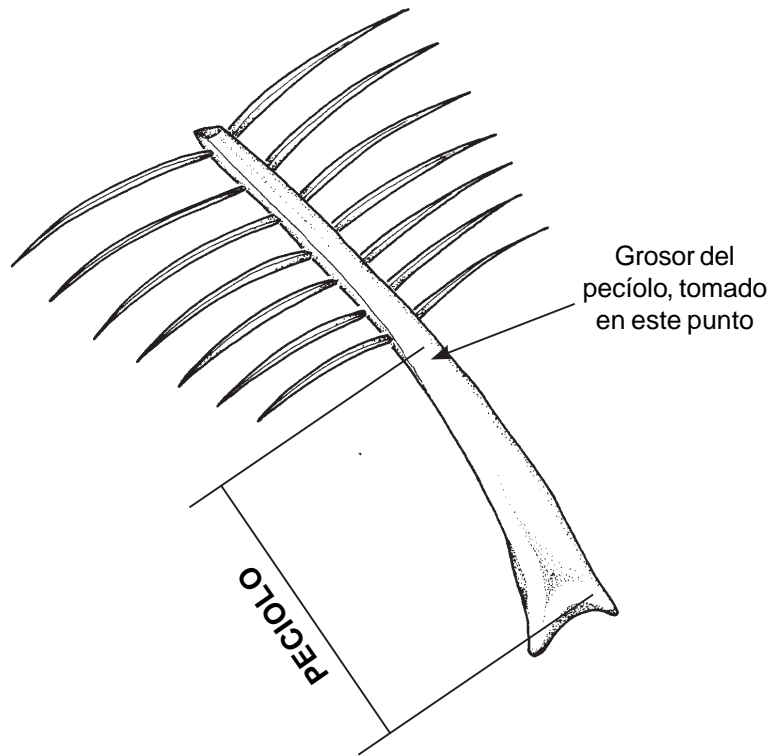


Fig. 5. Peciolo de la hoja de cocotero mostrando la inserción del primer foliolo (pina).



Fig. 6. Apertura de la inflorescencia del Cocotero

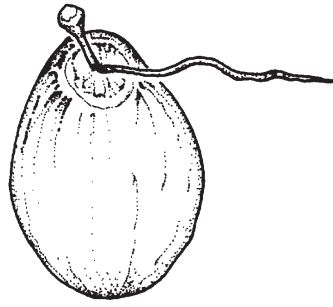


Fig. 7a. Vista polar del fruto del Cocotero

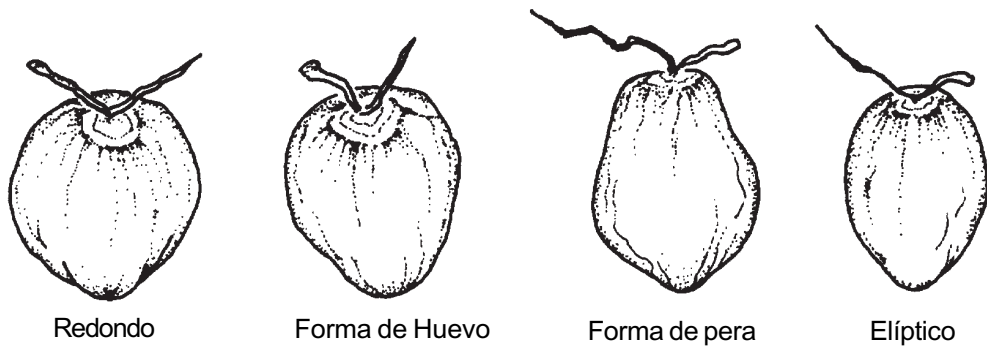


Fig. 7b. Forma de fruto del Cocotero, vista polar

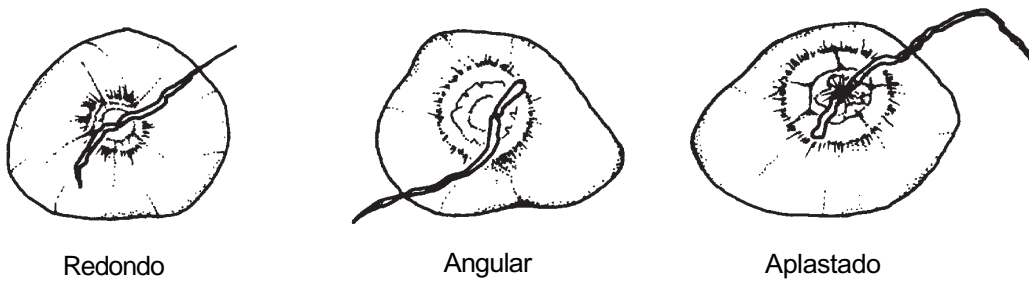


Fig. 8. Vista equatorial del fruto

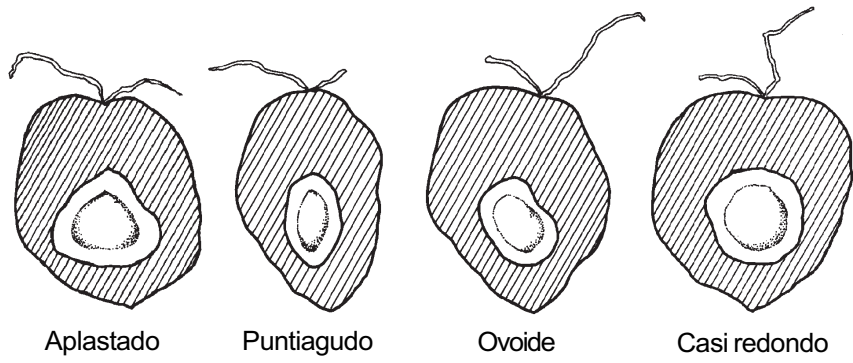


Fig. 9. Forma/apariencia de la cavidad de la nuez



Fig. 10a. Semillero para la germinación del cocotero

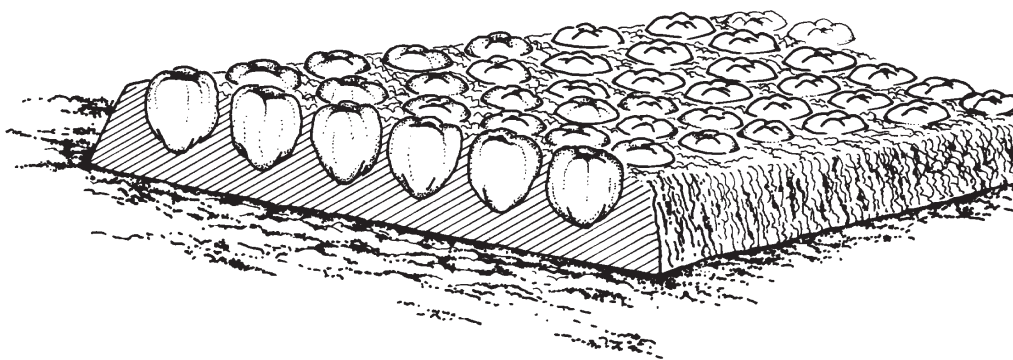


Fig. 10b. Siembra de semillas en camas de germinación

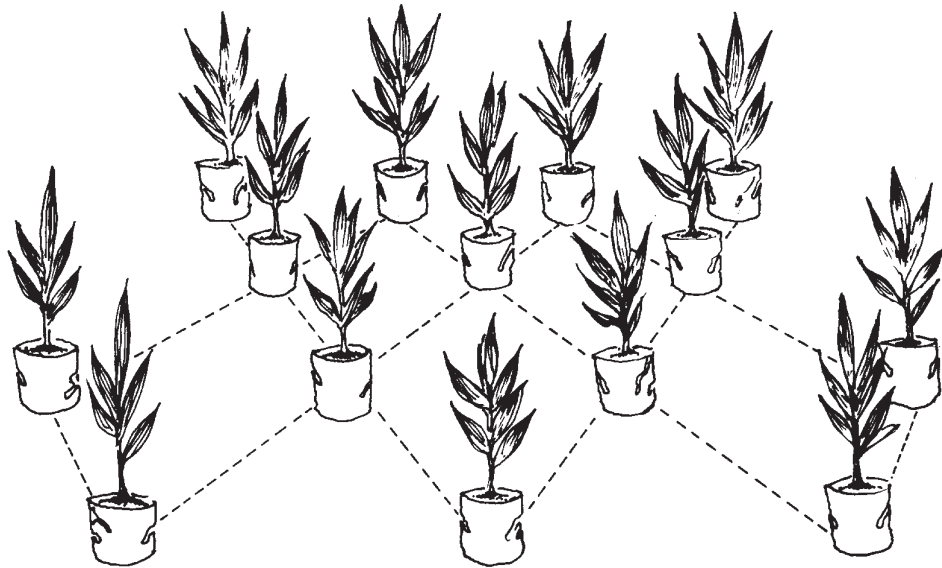


Fig. 11. Arreglo de plántulas en bolsas de germinación

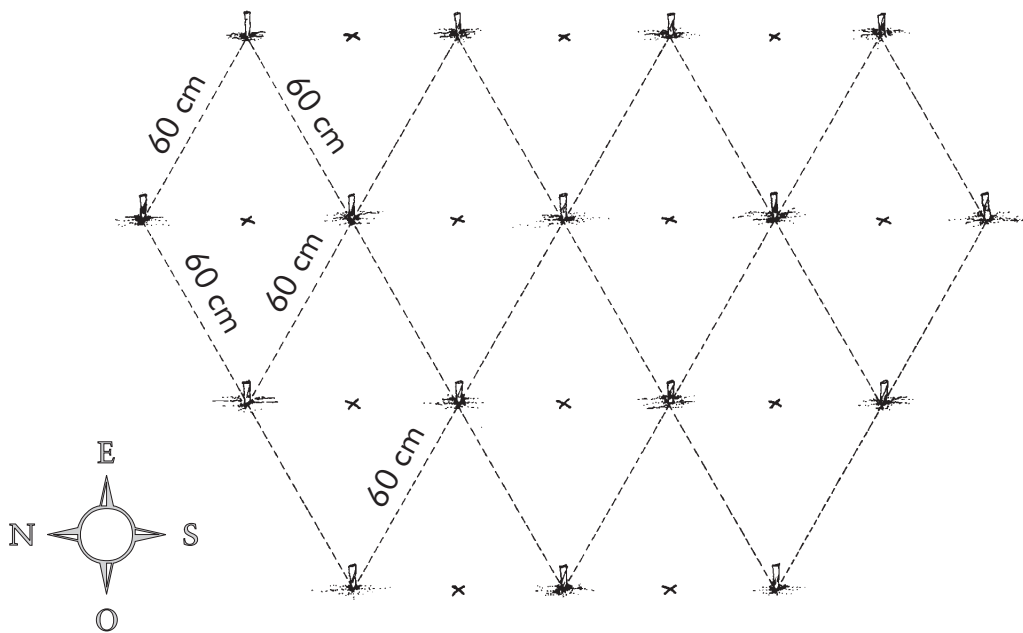


Fig. 12. Estacado para el acomodo de las plántulas en el semillero



Fig. 13. Marcaje de la hoja No. 1

Fig. 14. Colocada después de la Fig. 15



Fig. 15 . Asperjado de insecticida "suave" en la inflorescencia, justo antes del embolsado para la colecta de polen

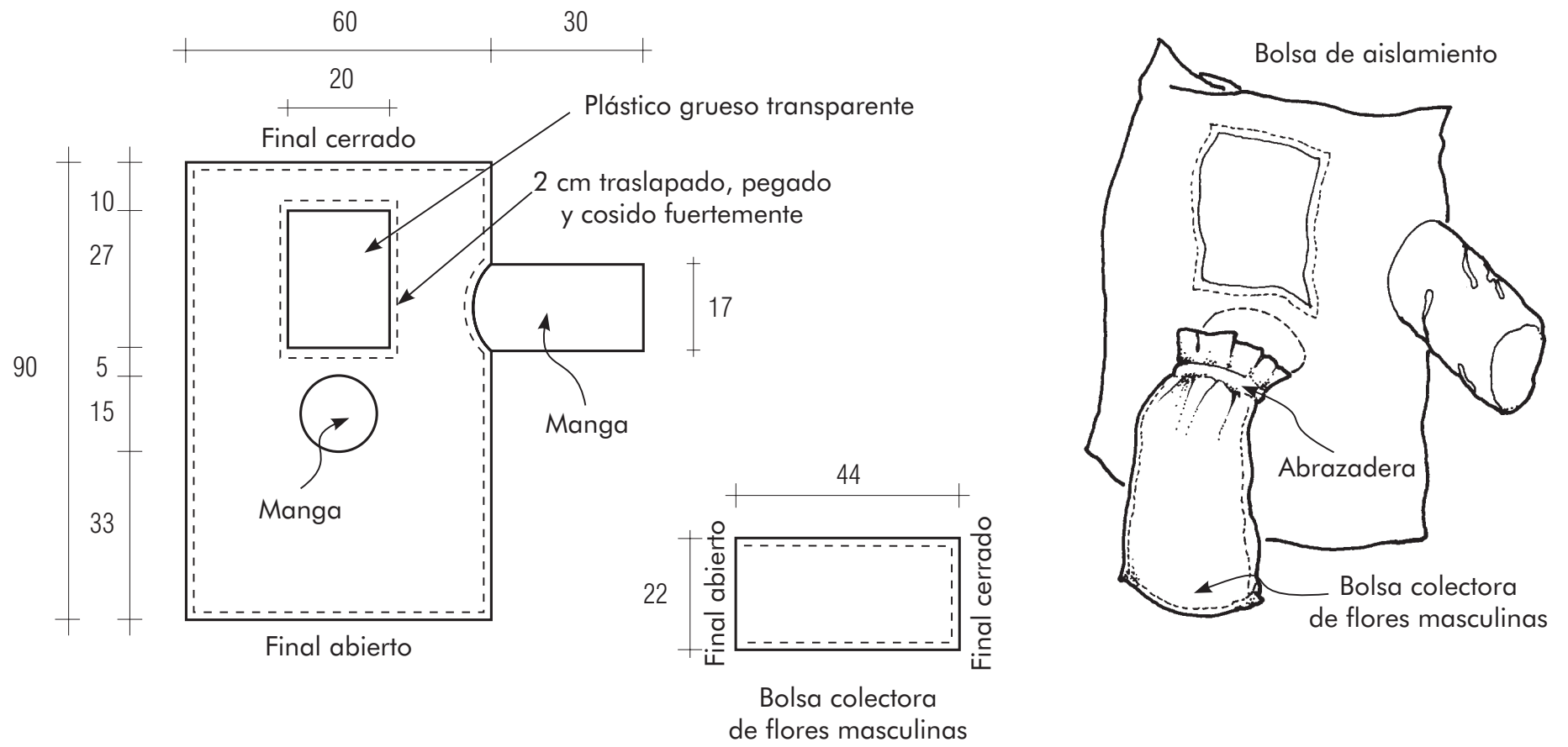


Fig. 14. Bolsa Colectora de flores masculinas



Fig. 16. Embolsado de inflorescencia para la colecta de polen. Nótese la manga sellada



Fig. 17 Tinturado de las flores masculinas para liberar los granos de polen



Fig. 18 . Esterilización de la Caja para Manipular Polen (CMP) usando dos focos de infrarrojo (1000 watt por foco)



Fig. 19. Transferencia de espiguillas con flores masculinas a la CMP



Fig. 20. Desprendimiento de las flores masculinas de las espiguillas en la CMP

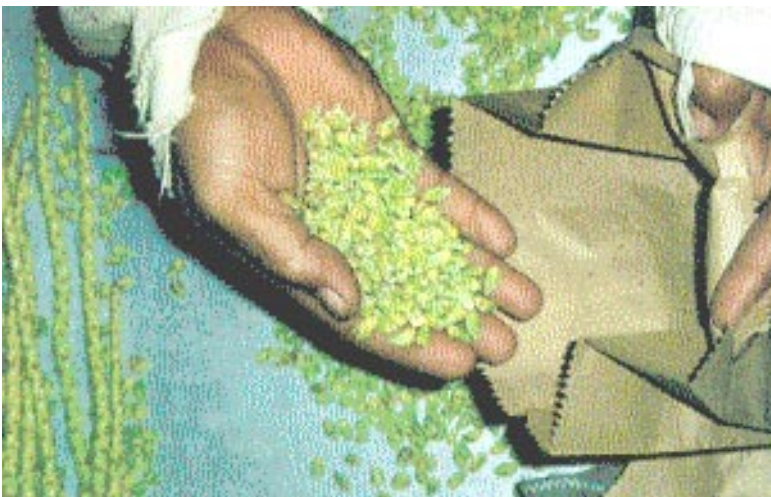


Fig. 21a. Introducción de las flores masculinas a las bolsas de papel

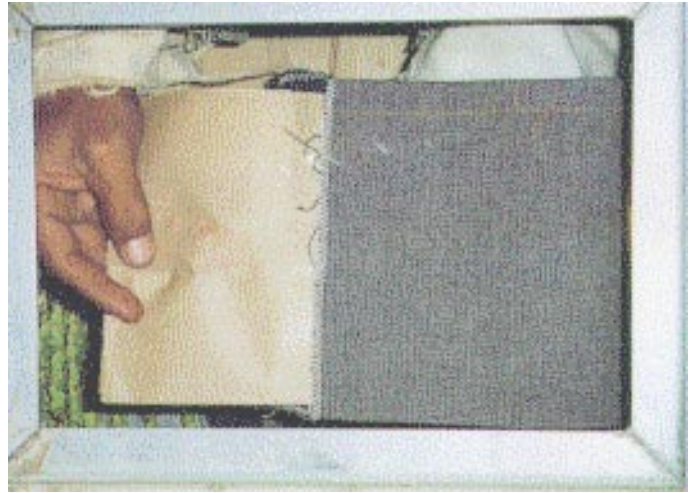


Fig. 21b. Introducción de las bolsas de papel en bolsas de tela



Fig. 22. Tinturado de las flores masculinas para liberar los granos de polen



Fig. 23. Secado de las flores masculinas tinturadas.



Fig. 24 Tamizado de las flores masculinas tinturadas para separar el polen



Fig. 25. Constrictor de ampollitas



Fig. 26. Colocación de las ampollitas en las entradas de la liofilizadora



Fig. 27. Sellado de las ampolletas con un soplete



Fig. 28. Almacenamiento de polen procesado en un congelador vertical



Fig. 29. Verificación de la viabilidad del polen.



Fig. 30. Emasculación. Las flores masculinas son colectadas en una bolsa

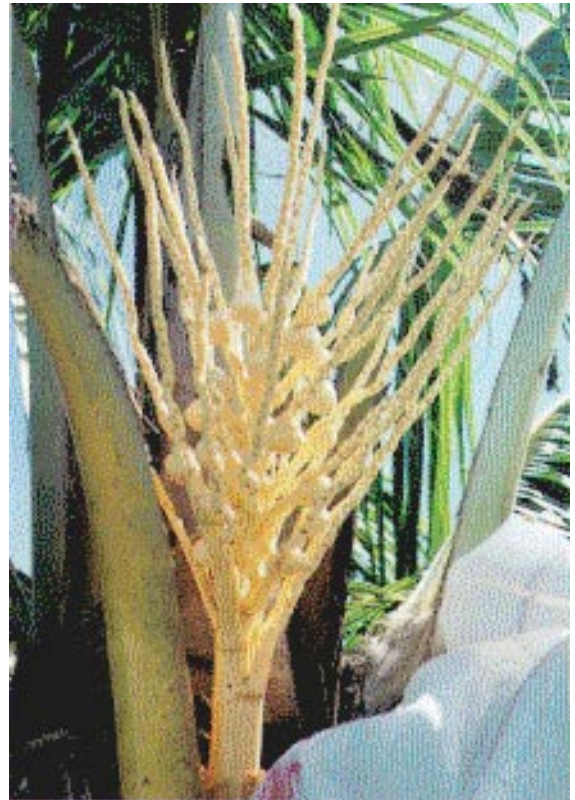


Fig. 31a. Una inflorescencia de cocotero propiamente emasculada



Fig. 31b. Una inflorescencia emasculada propiamente aislada.



Fig. 32 Retiro de la bolsa de aislamiento de una inflorescencia emasculada



Fig. 33. Mezclado de polen y talco dentro de la CMP



Fig. 34. Polinización de flores femeninas aisladas.

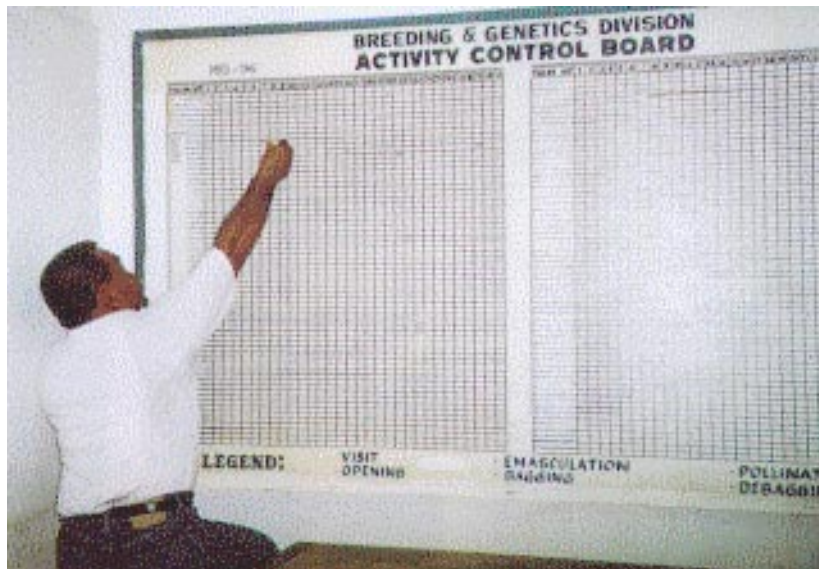


Fig. 35. Pizarra del control de actividades indicando operaciones a realizar



Fig. 36. Inflorescencia ya polinizada manualmente, en el momento de retirarle la bolsa. Nótese la etiqueta con el número de polinización colocado en el racimo.

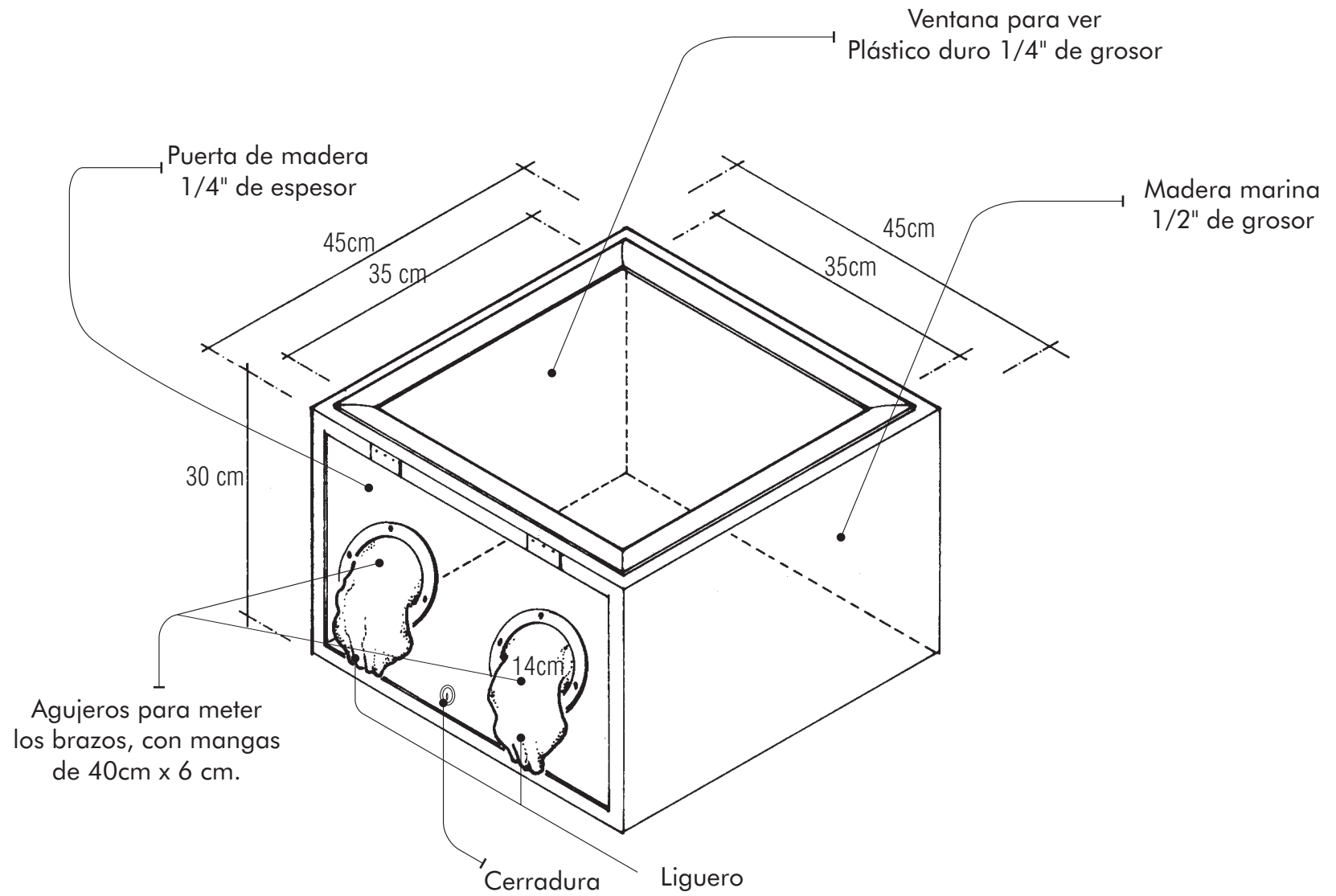


Fig. 37. Esquema de la caja de inoculación

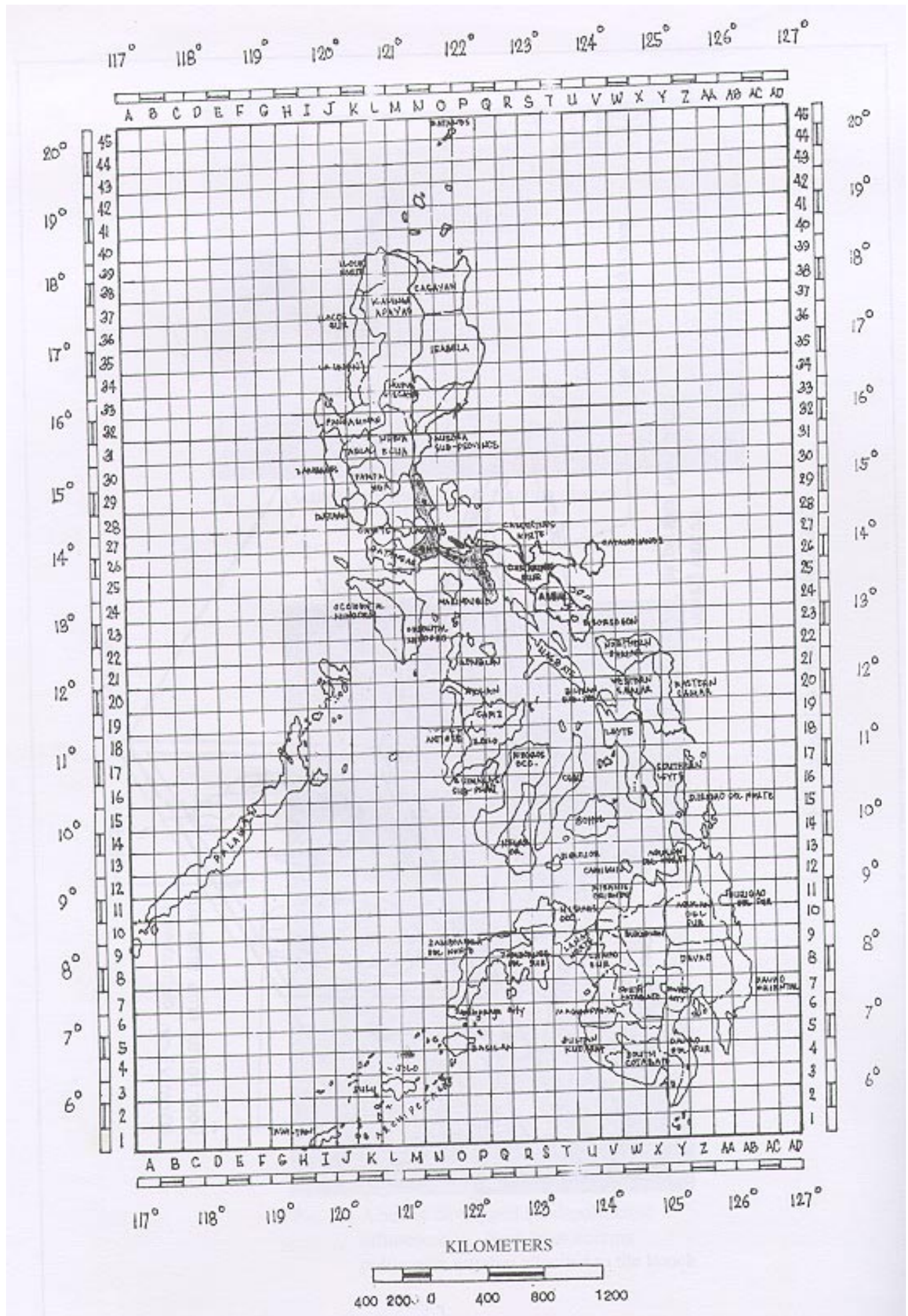


Fig. 38. Mapa de las Filipinas, con cuadrículas