

**EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL POLEN EN CULTIVARES DE FRIJOL
CAUPÍ (*Vigna unguiculata* L. Walp.) EN MONTERÍA-CÓRDOBA**

Jenry R. Hernández Murillo I.A.

**Universidad de Córdoba
Facultad de Ciencias Agrícolas
Maestría en Ciencias Agronómicas**

Montería, 2020

**EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL POLEN EN CULTIVARES DE FRIJOL
CAUPÍ (*Vigna unguiculata* L. Walp.) EN MONTERÍA-CÓRDOBA**

Jenry R. Hernández Murillo I.A.

**Trabajo de grado en modalidad de investigación presentado como requisito
para optar al título de Magíster en Ciencias Agronómicas con énfasis en
Fitomejoramiento**

Director

Hermes AramendizTatis I.A Ph. D

**Universidad de Córdoba
Facultad de Ciencias Agrícolas
Maestría en Ciencias Agronómicas**

Montería, 2020

La responsabilidad ética, legal y científica de las ideas, conceptos y resultados del proyecto serán responsabilidad del autor.

Artículo 17, acuerdo No. 039 del 24 de junio de 2005 del Consejo Superior de la Universidad de Córdoba.

Nota de aceptación

Director:

Hermes Araméndiz Tatis, I.A., Ph. D.

Jurado

Shirley Toro Sánchez I.A., Ph. D.

Jurado

Jorge Luis Romero Ferrer, I.A., Ph. D.

Montería, diciembre de 2020.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo. A mis hijos Nicolás Matías y Alejandro, quienes son el principal motivo de seguir adelante en mi superación.

A mi esposa María Teresa, quien apoyo incondicionalmente en todo este proceso.

A mis padres Gustavo y Nicolasa, a quien les debo todo lo que soy como persona.

Jenry R. Hernández Murillo

AGRADECIMIENTOS

Presento mis sinceros agradecimientos a:

Dr. Hermes Araméndiz Tatis. Por sus consejos personales y profesionales, por sus conocimientos, orientación y valiosa asesoría en el desarrollo de esta investigación.

Dr. Miguel Espitia Camacho. Por sus conocimientos y sus consejos personales y profesionales.

A los estudiantes de pregrado: Luz Mileidy Duque R., Camilo Dueñas C., Leidy Quiñonez A., Yulissa Silva V., Miguel Padilla P., Samuel Tamara R. Por su apoyo en la fase de ejecución, toma y procesamiento de datos.

A la Facultad de Ciencias Agrícolas, por permitirme los espacios, su infraestructura tecnológica (Laboratorio de Genética Vegetal y Fitomejoramiento) para la ejecución y evaluación de esta investigación.

A la Universidad de Córdoba, que a través de sus docentes imparten sus conocimientos para seguir escalando metas y servir a la sociedad.

CONTENIDO

	pág.
RESUMEN GENERAL	xvi
GENERAL ABSTRACT	xvii
 CAPITULO I MARCO GENERAL 	
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	20
2. DEFINICION DEL PROBLEMA	24
3. GENERALIDADES DE LA TEMÁTICA	27
3.1. ASPECTOS GENÉRALES DE FRIJOL CAUPI	27
3.1.1. Origen y Clasificación	27
3.1.2. Requerimientos de la planta	28
3.2. BIOLOGÍA FLORAL DEL FRIJOL CAUPI	29
3.3. VIABILIDAD DE POLEN	31
3.4. RECEPTIVIDAD ESTIGMATICA	33
3.5. CONSERVACIÓN DE POLEN	36
3.6. MÉTODOS DE HIBRIDACIÓN EN FRIJOL CAUPI	38
3.6.1. Emasculación	40
3.6.2. Preparación de la flor masculina	41
3.6.3. Hibridación artificial	42
3.6.4. Identificación de los cruces	43
3.7. EFECTOS DEL AMBIENTE EN LA POLINIZACIÓN	43
4. OBJETIVOS	50
4.1. OBJETIVO GENERAL	50

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
5. HIPOTESIS	51
6. PERFIL Y ALCANCE	52
7. BIBLIOGRAFÍA	54

CAPITULO II

VIABILIDAD DEL POLEN DE CULTIVARES DE FRIJOL CAUPI (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) COLECTADO EN DOS EPOCAS Y DIFERENTES HORAS DEL DIA EN MONTERÍA - CÓRDOBA.

RESUMEN	79
ABSTRACT	80
1. INTRODUCCIÓN	81
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	83
2.1. LOCALIZACIÓN	83
2.2. VARIABLES E INDICADORES	83
2.2.1. Variables dependientes	83
2.2.2. Variables independientes	83
2.3. PROCEDIMIENTO	83
2.3.1. Viabilidad con acetocarmín	84
2.3.2. Viabilidad con sal de tetrazolium	84
2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	85
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87
4. CONCLUSIONES	110
5. BIBLIOGRAFÍA	111

CAPITULO III

RECEPTIVIDAD ESTIGMÁTICA EN FRIJOL CAUPI (*Vigna unguiculata* L.

(Walp.)) EN DIFERENTES HORAS DEL DÍA EN MONTERIA – CORDOBA.

RESUMEN	124
ABSTRACT	125
1. INTRODUCCIÓN	126
2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	128
2.1. LOCALIZACIÓN	128
2.2. VARIABLES E INDICADORES	128
2.2.1. Variables dependientes	128
2.2.2. Variables independientes	128
2.3. PROCEDIMIENTO	128
2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	129
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	130
4. CONCLUSIONES	136
5. BIBLIOGRAFÍA	137

CAPITULO IV

**EVALUACION DE DIFERENTES MÉTODOS DE HIBRIDACIÓN EN FRIJOL
CAUPI (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) EN CONDICIONES DE CAMPO Y
CASA MALLA EN MONTERÍA – CÓRDOBA.**

RESUMEN	143
ABSTRACT	144
1. INTRODUCCIÓN	145
2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	148
2.1. LOCALIZACIÓN	148
2.2. VARIABLES E INDICADORES	148
2.2.1. Variables dependientes	148

2.2.2. Variables independientes	148
2.3. PROCEDIMIENTO	148
2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	150
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	151
4. CONCLUSIONES	159
5. BIBLIOGRAFÍA	160

CAPITULO V

EFECTO DEL ALMACENAMIENTO DE POLEN DE FRIJOL CAUPI (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) SOBRE LA VIABILIDAD EN DOS AMBIENTES EN MONTERÍA – CÓRDOBA

RESUMEN	167
ABSTRACT	168
1. INTRODUCCIÓN	169
2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	171
2.1. LOCALIZACIÓN	171
2.2. VARIABLES E INDICADORES	171
2.2.1. Variables dependientes	171
2.2.2. Variables independientes	171
2.3. PROCEDIMIENTO	171
2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	172
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	173
4. CONCLUSIONES	184
5. BIBLIOGRAFÍA	185
6. CONCLUSIONES GENERALES	191

LISTA DE TABLAS

	Pag.
CAPITULO II	
Tabla 1. Cuadrados medios del análisis de varianza para porcentaje de polen viable (PPV) y polen inviable (PPI), colectado en diferentes horas del día en tres cultivares de frijol caupí. Montería, 2019A	88
Tabla 2. Cuadrados medios del análisis de varianza para porcentaje polen viable (PPV) e inviable (PPI) en tres cultivares de frijol caupí. Montería, 2019B	89
Tabla 3. Promedios para porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) de frijol caupí, mediante el uso de acetocarmin y sal de tetrazolio. 2019A	91
Tabla 4. Promedios para porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) de frijol caupí, mediante el uso de acetocarmin y sal de tetrazolio. 2019B	92
Tabla 5. Promedios para porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) de frijol caupí, colectado en diferentes horas de día. 2019A	94
Tabla 6. Promedios para porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) de frijol caupí, colectado en diferentes horas de día. 2019B	95
Tabla 7. Promedios para porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) en tres genotipos de frijol caupí. 2019A	96
Tabla 8. Promedio de cinco evaluaciones para porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) en tres genotipos	98

de frijol caupí. 2019B

Tabla 9. Promedios de la interacción test por hora de colecta de polen para su viabilidad en tres genotipos de frijol caupí. 2019A	100
Tabla 10. Promedios de la interacción test por hora de colecta de polen para su viabilidad en tres genotipos de frijol caupí. 2019B	101
Tabla 11. Promedio de la interacción hora por genotipo para su viabilidad en tres genotipos de frijol caupí. 2019A	102
Tabla 12. Promedio de la interacción hora por genotipo para su viabilidad en tres genotipos de frijol caupí. 2019B	103
Tabla 13. Promedio de la interacción test por hora y genotipo para la viabilidad de polen en tres genotipos de frijol caupí. 2019B	104
Tabla 14. Coeficientes de correlación Spearman para porcentaje de polen viable e inviable con respecto a la temperatura y la humedad relativa.	105
Tabla 15. Promedios, valores mínimos y máximos para las variables de estudio.	106

CAPITULO III

Tabla 1. Cuadrados medios del análisis de varianza para el tiempo de reacción del estigma al peróxido de hidrogeno (TREP _H) en casa malla y campo, en tres genotipos en frijol caupí. Montería, 2020	130
Tabla 2. Promedios para el tiempo de reacción del estigma al peróxido de hidrogeno (TREP _H) en frijol caupí, evaluado en diferentes horas del día.	132
Tabla 3. Promedios para el tiempo de reacción del estigma al peróxido de hidrogeno (TREP _H) en tres genotipos de frijol caupí, cultivados en campo y casa malla.	132
Tabla 4. Promedios de la interacción hora por genotipo para tiempo de reacción del estigma al peróxido de hidrogeno (TREP _H) en frijol	133

caupí, evaluado en diferentes horas del día.

Tabla 5. Correlación de Spearman del tiempo de reacción del estigma al peróxido de hidrogeno (TREP _H) con la temperatura (TEMP) y la humedad relativa (HR), de muestras que provienen de campo y casa malla.	134
---	-----

CAPITULO IV

Tabla 1. Porcentaje de cruzamientos viables (P.C.V) en frijol caupí realizados en casa malla, utilizando dos métodos de hibridación. Montería, 2020	151
Tabla 2. Porcentaje de cruzamientos viables (P.C.V) en frijol caupí realizados en campo, utilizando dos métodos de hibridación. Montería, 2020	154
Tabla 3. Correlación de Spearman para porcentaje de cruzamientos viables (P.C.V) en frijol caupí realizados en dos fechas en campo.	158

CAPITULO V

Tabla 1. Cuadrados medios del análisis de varianza para las variables porcentaje de polen viable (PPV) e inviable (PPI) de tres cultivares de frijol caupí, almacenado en nevera y cuarto frio, Montería 2019-2020	174
Tabla 2. Prueba de medias para las variables porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI), almacenado en dos ambientes.	176
Tabla 3. Prueba de medias para las variables porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI), conservado por 6 y 12 días.	177
Tabla 4. Prueba de medias para las variables porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) en tres genotipos de frijol caupí.	179

Tabla 5. Promedios de las variables porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) en tres genotipos de frijol caupí, para la interacción ambiente por genotipo utilizando el test de tetrazolium.	181
Tabla 6. Prueba de medias para las variables porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) en tres genotipos de frijol caupí, para la interacción tiempo por genotipo utilizando el test de acetocarmin.	182
Tabla 7. Promedios de las variables porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) en tres genotipos de frijol caupí, para la interacción tiempo por genotipo utilizando el test de tetrazolium.	182
Tabla 8. Promedios de las variables porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) en tres genotipos de frijol caupí, para la interacción almacenamiento por tiempo por genotipo utilizando el test de tetrazolium.	183

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
Anexo 1. Temperatura y humedad relativa en las diferentes horas de colecta de muestras para viabilidad de polen en frijol caupí. 2019A	192
Anexo 2. Temperatura y humedad relativa en las diferentes horas de colecta de muestras para viabilidad de polen en frijol caupí. 2019B	192

RESUMEN GENERAL

La presente investigación se llevó a cabo en la Universidad de Córdoba, Montería; El objetivo fue determinar la viabilidad del polen de frijol caupí colectado a diferentes horas del día en los semestres agrícolas A y B de 2019, la receptividad estigmática, la conservación de polen en bajo las condiciones de nevera y cuarto frío y evaluar dos métodos de hibridación en frijol caupí. La viabilidad del polen se realizó mediante pruebas con acetocarmin y sal de tetrazolium, la receptividad del estigma se determinó con peróxido de hidrogeno. Se evaluó el porcentaje de granos de polen viable e inviable, el tiempo de reacción del estigma al peróxido de hidrógeno y el porcentaje de cruzamientos viables. El diseño utilizado fue completamente al azar con arreglo factorial; para viabilidad del polen a diferentes horas (2 test, 3 genotipos y 4 horas de colecta) con tres repeticiones (plantas); para receptividad del estigma (3 genotipos y 4 horas en el día) con tres repeticiones (flores) para cada ambiente; para el almacenamiento de polen (2 ambientes, 3 tiempos de almacenado y 3 genotipos) con cuatro (4) repeticiones por tratamiento. El polen colectado a diferentes horas del día en los genotipos evaluados en los semestres agrícolas promedio A y B de 2019, el cultivar que presentó mayor porcentaje de polen viable fue Caupicor 50 (93,89% y 94,61%). De acuerdo con el tiempo de reacción del estigma al peróxido de hidrogeno, las polinizaciones controladas que se realicen entre las 7:00 y 9:00 am en campo y entre las 3:00pm y 5:00pm en casa malla tendrán mayor probabilidad de generar vainas y semillas. El método de hibridación, emasculando y polinizando en la mañana de 7:00 a 10:00 am, en los dos ambientes se registraron los mayores porcentajes de cruzamientos viables. Las condiciones de temperatura en cuarto frieron ($T = 1,1 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) y nevera ($T = 5,6 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$), permiten mantener por 12 días la viabilidad del polen de frijol caupí con promedios superiores al 70%, considerados óptimos para la polinización artificial.

Palabras clave: hibridación, test de viabilidad, conservación.

GENERAL ABSTRACT

The present investigation was carried out at the University of Córdoba, Montería; The objective was to determine the viability of the cowpea pollen collected at different times of the day in the agricultural semesters A and B of 2019, the stigmatic receptivity, the conservation of pollen under the conditions of a refrigerator and cold room and to evaluate two hybridization methods. in cowpea beans. The viability of the pollen was performed by tests with acetocarmin and tetrazolium salt, the receptivity of the stigma was determined with hydrogen peroxide. The percentage of viable and non-viable pollen grains, the reaction time of the stigma to hydrogen peroxide and the percentage of viable crosses were evaluated. The design used was completely randomized with factorial arrangement; For pollen viability at different times (2 tests, 3 genotypes and 4 hours of collection) with three repetitions (plants); for stigma receptivity (3 genotypes and 4 hours in the day) with three repetitions (flowers) for each environment; for pollen storage (2 environments, 3 storage times and 3 genotypes) with four (4) repetitions per treatment. The pollen collected at different times of the day in the genotypes evaluated in the agricultural semesters A and B of 2019, the cultivar that presented the highest percentage of average viable pollen was Caupicor 50 (93.89% and 94.61%). According to the reaction time of the stigma to hydrogen peroxide, controlled pollinations that take place between 7:00 and 9:00 am in the field and between 3:00 and 5:00 pm at each mesh will have a greater probability of generating pods and seeds. The hybridization method, emasculating and pollinating in the morning from 7:00 to 10:00 am, the highest percentages of viable crosses were recorded in the two environments. The temperature conditions in a cold room ($T = 1.1 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) and refrigerator ($T = 5.6 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$), allow the viability of cowpea bean pollen to be maintained for 12 days with averages higher than 70%, considered optimal for artificial pollination.

Keywords: hybridization, viability test, conservation.

CAPITULO I: MARCO GENERAL
CHAPTER I: GENERAL FRAMEWORK

1. INTRODUCCION GENERAL

El género *Vigna* pertenece a la familia Fabácea, que comprende más de 200 especies distribuidas en el mundo, de las cuales las de mayor importancia agrícola son *V. radiata*, *V. mungo*, *V. angularis*, *V. subterranea*, *V. aconitifolia*, *V. umbellata* y *V. unguiculata* (Fery, 2002). Esta última especie, se conoce como frijol caupí, y su centro de origen es África, aunque se desconoce la región exacta (Xiong et al., 2016; Carvalho et al., 2017). Se cultiva principalmente en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Boukar et al., 2013), por lo que es una de las cinco leguminosas más importantes para consumo humano (Smýkal et al., 2015).

Es tolerante a la sequía, presenta buena capacidad de fijación de nitrógeno y se adapta a diferentes sistemas de cultivo (Goncalves et al., 2016), que la hace importante en la seguridad alimentaria y nutricional y, proporciona la principal fuente de proteínas a millones de personas en los países en desarrollo (Singh, 2014), los granos de caupí contienen entre 20% y 30% de proteína en peso seco (Boukar et al., 2011; Fall et al., 2003) y son ricos en carbohidratos (63%) (Menssen et al., 2017), por lo que es un cultivo económicamente rentable para los pequeños agricultores (Segura et al., 2013), ya que proporcionan nutrientes y dietas equilibradas y brindan seguridad nutricional con un uso mínimo de recursos (Keatinge et al., 2012).

Las especies pertenecientes al género *Vigna* exhiben una serie de atributos que las hacen particularmente valiosas para su inclusión en muchos tipos de sistemas de cultivo en zonas tropicales y subtropicales. Se pueden cultivar con éxito en entornos extremos (Ej., altas temperaturas, poca lluvia y suelos pobres) con pocos insumos (Boukar et al., 2018). Muchas de estas especies producen múltiples productos comestibles, y estos productos proporcionan a los agricultores de subsistencia un suministro de alimentos durante la temporada de crecimiento, así como semillas secas que son fáciles de almacenar y transportar. Por ejemplo, las

puntas tiernas de brotes y las hojas de caupí se pueden consumir tan pronto como las plantas alcanzan la etapa de crecimiento vegetativo y las vainas y las semillas inmaduras se pueden consumir durante la etapa de fructificación. Las semillas secas cosechadas de todos los cultivos de *Vigna* se pueden consumir directamente, y las semillas de varios de los cultivos se usan comúnmente para hacer harina. Los residuos vegetales pueden usarse como forraje para animales de granja. Los productos alimenticios de *Vigna* exhiben muchos atributos nutricionales excelentes y estos productos proporcionan un complemento necesario en las dietas compuestas principalmente de raíces, tubérculos o cereales (Fery, 2002).

En todo el mundo se producen anualmente alrededor de 6.5 millones de toneladas métricas de caupí en aproximadamente 14,5 millones de hectáreas (Boukar et al., 2016); con un rendimiento promedio de 567,6 kg ha⁻¹, ocupando un lugar preponderante en la alimentación de la población de algunos países en desarrollo, especialmente en África, donde fueron sembradas en el 2016, 12.079.473 ha, con un volumen de producción de 6.739.689 t y rendimiento promedio de 557,9 kg ha⁻¹, lo cual hace al continente africano como el principal productor del mundo (FAO, 2017). En Colombia el área cultivada para 2015 fue de 14.000 hectáreas con rendimiento promedio de 600 kg ha⁻¹, especialmente en el Caribe colombiano, en parcelas que oscilan entre 1.000 y 10.000 m² (Araméndiz et al., 2016). Sin embargo, se han reportado producciones en algunas variedades evaluadas por la Universidad de Córdoba y Agrosavia, que presentan rendimientos promedios de 1.200 a 1.465 kg ha⁻¹ (Araméndiz et al., 2016; Aguirre, 2009).

Es un cultivo que en Colombia está fácilmente al alcance de la población más necesitada, tanto en las zonas rurales donde se produce y consume y, en muchos casos es fuente de ingresos económicos importante para los pequeños agricultores, como en las zonas urbanas marginales donde las dietas son a menudo deficientes (Heredia et al., 2007). Este cultivo es altamente consumido

tanto en Colombia como a nivel mundial, ya que proporciona una fuente barata de proteínas (Alghali, 1991) y fibra dietética, carbohidratos, vitaminas y fitoquímicos (Devi et al., 2015; Rawal et al., 2019), para la subsistencia de millones de personas relativamente pobres en países menos desarrollados y que en casi todos los países productores, su producción forma parte de los cultivos tradicionales, y su explotación es principalmente para autoconsumo (Murillo et al., 2000).

En los ambientes donde se cultiva el frijol caupí en el Caribe Húmedo, diversos factores contribuyen a la inestabilidad de la producción, como manejo agronómico, calidad de la semilla, plagas, enfermedades, irregularidad de lluvias y condiciones climáticas entre otros, que inciden en el sistema de producción (Azevedo et al., 2015). Por estas razones, la respuesta de las plantas al incremento en la temperatura ambiental y al calentamiento global ha alcanzado las agendas sociales y políticas del mundo, porque el suministro sostenible de alimentos es crucial para la seguridad alimentaria de las sociedades, que para el 2050, demanda un incremento del 70% de la producción actual (Powell et al., 2012; FAO, 2016).

Poco se conoce de la biología reproductiva del frijol caupí en nuestro medio; estos conocimientos son indispensables para ser utilizados en programas de mejoramiento genético que contemplen la realización de polinizaciones o cruzamientos dirigidos, y poder aumentar la posibilidad de éxito de la fecundación. Los resultados brindaran la posibilidad de utilizar métodos rápidos, sencillos y confiables que hacen de estos indicadores herramientas útiles en los programas de mejoramiento de frijol caupí.

Los procesos reproductivos, juegan un papel crucial en la adaptabilidad de las plantas al ambiente multivariado. El conocimiento de estos procesos clave puede resultar útil para proporcionar insumos útiles para abordar los desafíos actuales, que afectan directa o indirectamente el funcionamiento de los ecosistemas

(Shivanna, 2020). Al dilucidar las estrategias reproductivas de las especies vegetales, es posible predecir su capacidad de supervivencia y tomar las medidas adecuadas para su conservación (Bernardello et al., 2001).

2. DEFINICION DEL PROBLEMA

El aumento de la productividad agrícola de una manera ambientalmente sostenible, en un contexto de cambio climático, es un gran desafío (Semedo et al., 2018), aún más porque la seguridad alimentaria mundial puede estar en peligro (DaMatta et al., 2010; Reguera et al., 2012; Bitá y Gerats, 2013). Mas aun, por la creciente dependencia de los seres humanos de menos del 1% de las especies de plantas comestibles, junto con los efectos adversos del cambio climático y la escasez de recursos (Massawe et al., 2016; Cheng, 2018). Se espera que la población mundial actual aumente de 7.6 a 9.800 millones de personas para 2050, lo que aumentará la demanda de energía y alimentos (FAO, 2011). En este contexto, la producción mundial de alimentos debería aumentar aproximadamente un 60 a 70% (Powell et al., 2012; FAO, 2016), incluyendo los cultivos básicos en aproximadamente un 43% (Powell et al., 2012). Nuestra capacidad para generar suficiente rendimiento de cultivos para la seguridad alimentaria y nutricional, está cada vez más comprometida por la expansión de la población humana, la competencia por el uso de la tierra, la pérdida de biodiversidad y el cambio climático global (Pachauri et al., 2014). Los cambios climáticos previstos presentan desafíos para la productividad agrícola futura, ya que la mayoría de las especies cultivadas exhibirán una reducción severa del rendimiento bajo temperaturas más altas (Lohani et al., 2020). A nivel mundial la temperatura ambiental se ha incrementado gradualmente en los últimos 150 años, como consecuencia de la actividad humana y la emisión de gases con efecto invernadero (Jones y Moberg, 2003; Wahid et al., 2007). La tasa de calentamiento global en los últimos cien años, produjo un incremento de las temperaturas mínimas y máximas de 1,86 y 0,88 °C, respectivamente (Easterling et al., 1997). Se ha informado que para 2100, el aumento de la temperatura promedio global en el escenario de emisiones más bajas será de 1,0 °C y en escenario de emisiones más altas de 3,7 °C (Pachauri et al., 2014). Se proyecta que los efectos del cambio climático incluirán modificaciones de los ámbitos ecológicos y geográficos donde se distribuyen las

plantas, la zonificación agrícola y las épocas de siembra; irregularidades que representan amenazas potenciales para la producción agrícola y que cambiarán las prioridades actuales del mejoramiento genético (Long y Ort, 2010), en especial en las regiones tropicales cálidas, donde la temperatura es un factor determinante en el rendimiento de los cultivos (Challinor et al., 2007) y la calidad de las semillas en leguminosas (Ruelland y Zachowski, 2010). Todo lo anterior provocará una falla en la satisfacción de la demanda mundial de alimentos de la población en rápido crecimiento (Pachauri et al., 2014).

Las plantas cultivadas son sensibles a las variaciones del clima, las temperaturas del aire cercanas al óptimo favorecen el crecimiento de las plantas, mientras que las temperaturas bajas lo limitan de manera importante; temperaturas altas, de manera constante durante varios días, pueden ser muy perjudiciales, afectando la floración, el desarrollo reproductivo masculino en plantas superiores en todas las etapas de crecimiento (Bita y Gerats, 2013; Sage et al., 2015) y la viabilidad del polen (Hinojosa et al., 2019); además, producen un menor número de semillas debido a la esterilidad masculina, que impide la fertilización de los óvulos en la mayoría de los cultivos de leguminosas, incluyendo frijol común (Gross y Kigel, 1994; Monterroso y Wien, 1990), el caupí (Ahmed et al., 1992), frijol chino (Warrag y Hall, 1984), guisante de campo (Jiang et al., 2015), frijol mungo (Bindumadhava et al., 2017) y soja (Djanaguiraman et al., 2013).

La producción de frijol se enfrenta a una serie de restricciones que son bióticas y abióticas que resultan en un bajo rendimiento de grano y forraje. Se ha establecido que el estrés por calor durante las etapas reproductivas conduce a una pérdida considerable de rendimiento y calidad de la semilla. El estrés por calor durante la pre-antesis y el desarrollo reproductivo da como resultado una reducción en la fertilidad de las flores, lo que se traduce en un menor número de semillas (Bheemanahalli et al., 2019; Kumar et al., 2017). El caupí es una especie valiosa para el cultivo a medida que los efectos del cambio climático global se vuelven

más pronunciados, por su tolerancia a suelos de baja fertilidad y a un amplio rango de pH del suelo, así como la adaptación del caupí a las altas temperaturas y la sequía (Hall, 2004). Las regiones donde el caupí es muy cultivado, como el África subsahariana, se superponen con áreas que se prevé que sufrirán una mayor inseguridad alimentaria debido al cambio climático (Ahdoot y Pacheco, 2015).

Las condiciones cambiantes del clima influyen directamente en la biología floral de algunas especies; es por ello, que las altas temperaturas afectan negativamente la iniciación de la flor, la viabilidad del polen (la germinación y el crecimiento del tubo polínico), la receptividad del estigma, la viabilidad del óvulo, el tamaño del óvulo, la fertilización, composición de la semilla, el llenado del grano y calidad de la semilla (Barnabás et al., 2008). En tanto que, el frijol caupí y otros cultivos importantes en la región del Caribe húmedo, a pesar de su importancia económica y social, han recibido relativamente poca atención desde el punto de vista de la investigación; en especial lo relacionado con la viabilidad de polen, por lo que se plantea realizar la siguiente investigación.

La presente investigación pretende resolver ¿Qué efecto tiene la temperatura y humedad relativa en la viabilidad del polen de frijol caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp), bajo condiciones de Montería?

3. GENERALIDADES DE LA TEMATICA

3.1. ASPECTOS GENÉRALES DE FRIJOL CAUPI

3.1.1. **Origen y Clasificación.** El frijol caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) es originario de África (Litzenberger, 1991), los centros de diversidad genética están ubicados en África e India (Phansak et al., 2005). África es el continente donde más se cultiva, aunque también se realiza extensivamente en América Latina y sur este de Asia (Boukar et al., 2018). Estudios realizados por Coulibaly et al. (2002), concluyeron que la especie silvestre se originó en África oriental y por ende, la domesticación debería haber ocurrido en el noreste de África y la planta domesticada probablemente se dispersó hacia el oeste de África. Según Ng y Padulosi (1988), África occidental parece ser el centro de la diversidad de formas cultivadas; el caupí en estas regiones podría haber sido domesticado junto con el sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) y el mijo perla (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.), en el tercer milenio antes de Cristo (Huynh et al., 2013).

La taxonomía del caupí ha sido establecida por Pasquet y Padulosi (2012) como Dicotiledónea perteneciente al orden Fabales, familia Fabácea, subfamilia Faboideae, tribu Phaseoleae, subtribu Phaseolinae, género *Vigna* y sección Catjang. Todo el caupí cultivado se agrupa bajo *V. unguiculata* subespecie unguiculata. También hay cinco subespecies silvestres: ssp. dekindtiana, ssp. protracta, ssp. pubescens, ssp. stenophylla y ssp. tenuis. *V. unguiculata* ssp. dekindtiana var. spontanea se encuentra comúnmente en todo el África subsahariana y se cree que es el progenitor del frijol domesticado (Pasquet y Padulosi, 2012). Fabácea es la tercera familia más grande de plantas con flores y la segunda en importancia económica (Parvin et al., 2020), entre las especies cultivadas se puede citar el frijol común, caupí, maní y soya (Souza y Lorenzi, 2008). *V. unguiculata* presenta una tasa media de cruzamiento natural, que puede

variar de acuerdo con el cultivar, las condiciones ambientales y, más particularmente con la población de insectos visitantes, especialmente las abejas (Teofólio et al., 2001; Rizzardo, 2007).

El caupí cultivado se basa en cinco grupos llamados (Cultigroups), a saber; unguiculata, que es la forma común; sesquipedalis, se encuentra principalmente en Asia y se caracteriza por sus vainas muy largas que se consumen como un frijol verde; textiles, que se encuentra en África occidental y que se utiliza para fibras que se obtienen de sus largos pedúnculos; melanophthalmus, con semilla de testa fina y, a menudo arrugada; biflora, que se caracteriza por pequeñas vainas erectas y se encuentra principalmente en Asia. Debido a su importancia económica, el caupí, *Vigna unguiculata*, puede considerarse como la principal especie africana dentro del género *Vigna*. Incluye el caupí domesticado en sus diferentes formas (llamados grupos de cultivares), su progenitor silvestre y pocos taxones estrechamente relacionados (Westphall, 1974; Marechal et al., 1978; Ng y Marechal, 1985).

3.1.2. Requerimientos de la planta. El frijol caupí es una planta rustica que se adapta a una gran diversidad de suelos, puede tolerar la acidez (pH 5,5 a 6,6) pero no la alcalinidad, salinidad, ni suelos con mal drenaje. Prospera bien en suelos ligeros, bien drenados, profundos, de fertilidad media a alta. Es un cultivo que puede prosperar en temperaturas entre los 18°C y los 40°C, presentando un óptimo crecimiento en temperaturas entre los 20°C y 35°C (Albán, 2012); temperatura superior a 35 °C reduce el rendimiento (Alidu, 2018). La cantidad de horas luz optimo oscila entre las 8 a 14 horas, la reducción de estas horas induce a poco desarrollo de la planta y crecimiento rastro de la misma; a su vez es un cultivo resistente a periodos de sequía, pero no tolera periodos largos de humedad, excesos de esta ocasionan proliferación de enfermedades a nivel de planta, manchado de los granos, y algunas veces tanto la falta como exceso de esta en época de floración ocasiona caída de las flores (Albán, 2012).

3.2. BIOLOGÍA FLORAL DEL FRIJOL CAUPI

El caupí es una especie autógama, y por lo general la polinización de flores ocurre antes de que abran (Ige et al., 2011). El recinto del pistilo y estambre dentro de la quilla mejora la autopolinización; la literatura ha reportado tasas de exogamia de hasta 2% (Susó et al., 2015; Fatokun y Ng, 2007). Los granos de polen son transferidos desde la antera al estigma y por lo tanto se produce la polinización (Ige et al., 2011). En las flores de caupí, las anteras liberan polen durante la primera mitad de la noche cuando estas aún están cerradas (Ladeinde y Bliss, 1977), el polen es pegajoso y pesado. La cutícula que protege la superficie estigmática se rompe y libera un exudado estigmático durante la segunda mitad de la noche, momento en el que puede comenzar la autofecundación. Posteriormente, la flor se abre temprano en la mañana y luego se cierra a última hora de la mañana (OECD, 2016).

Estudios realizados por Rocha et al. (2001), indican que la inflorescencia del frijol caupí se forma a partir de un eje central que consiste de un racimo modificado con 6 a 8 pares de yemas florales. Los pares de yemas florales están dispuestas de forma alterna, en una sucesión acropetala en un eje entumecido denominado cojín. Las flores son perfectas, zigomorfas y se distribuyen en pares en el racimo, en el extremo del pedúnculo, el cual se desarrolla a partir de la axila de la hoja. El cáliz es pentámero, persistente y gamosépalo, pudiendo variar de completamente verde a completamente morado. La corola es pentámera y dialipétala. El mayor pétalo se denomina estandarte y se encuentra en la parte posterior de la flor. Durante la antesis, el estandarte es el único pétalo que se abre completamente. Las otras cuatro permanecen en la misma posición que ocupaban anteriormente en la yema. Los dos pétalos laterales, denominados alas, cubren los pétalos inferiores. El estandarte y las alas pueden variar el color, de completamente blanco a completamente morado. Los dos pétalos inferiores se funden y forman la quilla, que es recta y de coloración blanca, independientemente del color de los

otros pétalos. El androceo se compone de diez estambres, siendo uno libre y nueve unidos (diadelfos). La antera es libre con dehiscencia longitudinal. El gineceo presenta un ovario multilocular. El estilo es piloso del lado interno y el estigma es oblicuo (Poonia et al., 2018).

De acuerdo con Rocha et al. (2001), en investigación realizada sobre la biología floral del frijol caupí en Brasil (Teresina), la antesis se inicia con la dehiscencia de las anteras y continúa hasta la apertura completa del estandarte. La apertura de las anteras se inicia alrededor de las 3:00 am y la de las flores se inicia alrededor de las 5:30 am y se prolonga hasta las 9:30 am en estudios realizados en Brasil (Cruz das Almas, Bahía) (Ribeiro et al., 2013). En días nublados, las flores se abren más tarde, algunas incluso pueden permanecer cerradas. Según Ige et al. (2011), realizando estudios de biología floral en el Estado de Ondo (Nigeria), encontraron que la antesis se inicia el horario de 6:00 am - 6:30 am y se cierran entre las 11:30 am a 12:00 m; cuando el clima es cálido y seco, las flores se cierran más temprano en comparación cuando el clima es frío y húmedo. Después de aproximadamente uno o dos días de apertura y cierre, se marchita la flor y se caen. Los estigmas son receptivos durante un período de tiempo corto y las flores no fertilizadas se caen dentro de 24 horas después de la antesis.

Cada pedúnculo desarrolla comúnmente dos o tres vainas y las vainas difieren en tamaño, forma, color y textura. Son cilíndricas, aunque podrían ser rectas, ligeramente curvas, curvas o enrolladas y, cuando maduran, el color puede variar de amarillo a marrón o púrpura oscuro (Timko et al., 2007). La subespecie o cultivar del grupo *Sesquipedalis* (más común en Asia) tienen vainas verdes muy largas (40 - 100 cm) que son a menudo las que más se usan como judías verdes; los otros grupos tienen vainas estándar (10 - 25 cm). Las semillas difieren en tamaño y color, que van desde blanco, crema, verde, beige, rojo, marrón o negro y puede ser en forma de riñón, ovoide, globosa o romboidal y son característica por

la presencia de un ojo, como resultado de las diferentes pigmentaciones que rodean el hilum (IBPGR, 1983).

3.3. VIABILIDAD DE POLEN

La viabilidad del polen se refiere a la capacidad de los granos de polen para realizar su función de transportar los gametos al saco embrionario después de una polinización compatible (Marak y Wani, 2018). Los estudios relacionados con la calidad del polen son de gran importancia en investigaciones relacionadas con la reproducción sexual, y especialmente en las condiciones del trópico cálido y húmedo. Son indispensables en la implementación exitosa de programas de mejoramiento genético y conservación, al igual que permiten mejorar la eficiencia de los cruzamientos en la reproducción y asegurar una abundante producción de semillas (Dafni y Firmage, 2000; Pozzobon et al., 2015).

Las fallas en la formación y desarrollo del polen son una causa primaria de inviabilidad de especies o de cultivares. En este caso, la inviabilidad del polen puede deberse a gametos no reducidos (de tamaño más grande), o que no tienen un número cromosómico balanceado (de menor tamaño), que no permiten una meiosis regular. Las causas no genéticas que afectan negativamente al polen incluyen la temperatura, la humedad, la fertilidad del suelo, las enfermedades, las plagas y la edad (Delph et al., 1997; Razzaq et al., 2019).

La viabilidad de los granos de polen se puede determinar mediante métodos directos como la inducción de *in vitro* (Dane y Ekici, 2011; Cuchiara et al., 2012; Imani et al., 2011; Machado et al., 2014) e *in vivo* (Dane y Ekici, 2011; Rezaie et al., 2011) germinación o métodos indirectos basados en parámetros citológicos como la tinción (Ćalić et al., 2013; Munhoz et al., 2008), como: el uso de diacetato de fluoresceína (FDA) (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1970), colorante fluorocromático (FCR) (Van der Walt y Littlejohn, 1996), azul de algodón lactofenol

(LPCB) (Bellusci et al., 2010), cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) (Mattson et al., 1947; Sorkheh et al., 2011; Abdelgadir et al., 2012), o tinción con azul de tiazolilo (MTT) (Khatun y Flowers, 1995) y la tinción de Alexander (Alexander, 1969).

Entre los métodos más utilizados para evaluar la calidad del polen cabe destacar: a) técnicas de tinción para observar el contenido citoplasmático o integridad de la membrana citoplasmática como el carmín acético, orceína acética, etc., b) test enzimáticos como la bencidina, sales de tetrazolio, etc., c) métodos combinados que permiten determinar la integridad de la membrana plasmática y la presencia de actividad enzimática para lo cual se usa la reacción fluorocromática mediante diacetato de fluoresceína y d) test de germinabilidad (Rejón et al., 2010). Los tres primeros son específicos para evaluar viabilidad y el último indica la capacidad de germinación del polen (Rejón et al., 2010; Tuinstra y Wedel, 2000), por lo que la elección de un método u otro dependerá de la especie objeto de estudio, de la correlación entre viabilidad y germinabilidad y de los objetivos finales del trabajo que se va a realizar.

La prueba de tinción con sales de tetrazolio, pertenece al grupo de las pruebas citológicas, cuya característica es entregar una indicación colorimétrica de la actividad metabólica de los granos de polen luego de su rehidratación. Esta prueba permite indicar la presencia de enzimas funcionales como peroxidasa, esterasa y deshidrogenasa (Iborra et al., 1992; Neto et al., 2006; Munhoz et al., 2008). Shivanna y Tandon (2014) y Vieitez (1952) acotan que en general las soluciones neutras de tetrazolium incoloras son reducidas tomando color rojo debido a la formación de trifenil formazán reducido, en presencia de ciertos sistemas enzimáticos contenidos en las células vivas; el formazano se acumula en el citoplasma del polen y le da un color rojizo al polen. La actividad enzimática presente en el grano de polen está asociada a la capacidad de germinación del polen. Varios autores han argumentado que la prueba con sal de tetrazolium es

una estimación confiable de la viabilidad del polen y proporciona resultados cercanos a los obtenidos en las pruebas de germinación *in vitro* (Huang et al., 2004; Munhoz et al., 2008; Gowthami et al., 2019).

Como indicadores de la viabilidad del polen, a menudo se prefieren las pruebas de tinción porque son más rápidas y fáciles en comparación con la germinación del polen, pero tienden a sobreestimar la viabilidad y la germinación real de los granos de polen (Gaaliche et al., 2013). La idoneidad de la prueba de viabilidad depende de la especie, ya que se han reportado diferencias para las técnicas de tinción óptimas (Riano y Dafni, 2000; Abdelgadir et al., 2012).

Según Souza (2002), los índices de viabilidad del polen superiores al 70% se consideran altos; entre el 31 y el 69% se consideran medios, mientras que los índices inferiores al 30% se consideran bajos. La baja viabilidad del polen puede indicar problemas reproductivos en las plantas, incluida la infertilidad, y posibles problemas meióticos que dan como resultado diferentes grados de esterilidad (Hister y Tedesco, 2016).

En resumen, la viabilidad del polen es importante en los programas de mejoramiento porque la eficiencia de la autofertilización y la hibridación depende de un alto porcentaje de pólenes viables y, por lo tanto, aumentan las posibilidades de éxito en los cruces (Techio et al., 2006).

3.4. RECEPTIVIDAD ESTIGMATICA

La receptividad floral juega un papel crucial en la dinámica de la polinización, el éxito reproductivo y, en consecuencia, la producción de frutos. El estigma es la primera superficie del pistilo en entrar en contacto con el grano de polen, y su adherencia a la superficie es seguida de hidratación y germinación. Luego, el crecimiento del tubo polínico continúa a través del estigma, estilo y finalmente

ovario, donde ocurre la fecundación del óvulo (Hiscock y Allen, 2008; Losada y Herrero, 2012).

La superficie receptiva del estigma puede contener proteínas extracelulares en forma de película (en caso de estigma seco) o una mezcla heterogénea de biomoléculas en forma de exudados en caso de estigma húmedo (Shakya y Bhatla, 2018). En los estigmas de "tipo húmedo", la superficie se caracteriza por exudados que son una mezcla compleja de polisacáridos, proteínas y lípidos. En los estigmas de "tipo seco", las papilas están cubiertas por una película, una cutícula y una pared celular proteínica. El girasol tiene un tipo de estigma semiseco en el que hay exudados en la base de las papilas (Shakya y Bhatla, 2010). La superficie en el tipo de estigma húmedo, como en *Nicotiana* y *Lilium*, es incapaz de discriminar entre granos de pólenes compatibles e incompatibles. Así, el polen de cualquier especie que caiga sobre la superficie del estigma se adhiere a los exudados secretados durante la fase receptiva. Sin embargo, en plantas que poseen un estigma de tipo seco, como *Arabidopsis*, la adhesión del polen es un proceso muy específico de la especie. Los componentes de exina median en la adhesión del polen a las papilas estigmáticas. Esta adhesión es altamente específica de la especie ya que la fuerza de adhesión es mucho más fuerte en la polinización intraespecífica en comparación con la polinización interespecífica. Se cree que los lípidos y las proteínas presentes en la interfase permiten cambios en las propiedades de las papilas subyacentes que conducen al transporte de agua e iones de las papilas estigmáticas, lo que da como resultado la hidratación del polen (Shakya y Bhatla, 2018).

La morfología del estigma en las angiospermas es muy diversa, y varios estudios han descrito características estigmáticas anatómicas (Sigrist y Sazima, 2004; Spinelli et al., 2005; Carmo-Oliveira y Morretes, 2009; Sage et al., 2009). Entre las familias estudiadas en cuanto a la morfología del estigma, cabe destacar las leguminosas por su riqueza de especies (unas 19.000) y gran diversidad floral

(Lewis et al., 2005). El estigma de sus representantes ha sido clasificado como húmedo (Heslop-Harrison y Shivanna, 1977) o semiseco (Basso-Alves et al., 2011), sin reportes de estigma de tipo seco. Recientemente Costa et al. (2014), sostienen que el estigma debe clasificarse en seco, semiseco y húmedo y propusieron estandarizar la clasificación del estigma de la siguiente manera: estigma seco si no hay exudado en la antesétesis o antesis; estigma húmedo si hay exudado que fluye libremente en la antesétesis o antesis; y estigma semiseco tienen caracteres intermedios entre el tipo de estigma húmedo y seco. Como el estigma seco, poseen una cutícula superficial que, sin embargo, no es continua en la base de las papilas y, como el estigma húmedo en la madurez, poseen una pequeña cantidad de secreciones que contienen lípidos, carbohidratos y proteínas (Hiscock et al., 2002; Sharma y Bhatla, 2013). Por lo tanto, para una clasificación precisa del estigma debemos tener en cuenta la morfología, la fase floral y los exudados. De acuerdo a esta clasificación el género *Vigna* presentan estigmas semisecos (Costa et al., 2014).

La interacción polen-pistilo es un proceso fundamental en la biología reproductiva de las angiospermas. El contacto físico entre el gametofito masculino (polen) y la superficie receptiva del pistilo (estigma) y la guía posterior del tejido estilar y del tubo polínico hacia el saco embrionario (gametofito femenino) implica una serie compleja de interacciones celulares y moleculares (Shakya y Bhatla, 2018). La superficie ornamentada del polen y el estigma, y las biomoléculas asociadas con ellos, son cruciales para sus diversos caracteres y funciones (Edlund et al., 2004). La ruptura de la capa de la cutícula se asocia con la producción de exudado de las células epidérmicas que se acumula en los espacios intercelulares del tejido estigmático debajo de la cutícula de las células epidérmicas (Yi et al., 2006).

Las células del estigma encuentran diversas comunicaciones de célula a célula entre el esporofito femenino y el esporofito masculino (polen). La receptividad se define como la capacidad del estigma de capturar el polen por adhesión, dejarlo

hidratar y en consecuencia germinar formando un tubo polínico (Sánchez et al., 2004). Para permitir la germinación exitosa del polen, se requieren una serie de biomoléculas y minerales (Sharma y Bhatla, 2014) que participan en el reconocimiento de especies, la adhesión del polen, la hidratación del polen, la autoincompatibilidad, el crecimiento del tubo polínico y la defensa de patógenos (Allen et al., 2011). Hiscock et al. (2002), las esterasas no específicas tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces cruzados de los polisacáridos de la pared celular y, por lo tanto, son importantes en el establecimiento y reorganización de las paredes celulares. Desempeñan un papel en la interacción huésped-patógeno y en el metabolismo de los ácidos grasos (Bikovà et al., 1999). La peroxidasa de clase III secretada hace que la descomposición del peróxido de hidrógeno forme un intermedio altamente oxidante que oxida una variedad de sustratos reductores orgánicos e inorgánicos en el estigma maduro (McInnis et al., 2006). Las peroxidasas juegan un papel en la respuesta al estrés oxidativo, lignificaciones, entrecruzamiento de componentes de la pared celular y defensa contra el ataque de patógenos. Las peroxidasas de clase III también pueden conducir a la formación de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS), (Cosio y Dunand, 2009) que pueden desempeñar un papel en las vías de transducción de señales que conducen a la germinación del polen/crecimiento del tubo polínico (McInnis et al., 2006). Se ha detectado peroxidasa en el extracto de estigma de muchas especies (Galen y Plowright, 1987). Muchos investigadores han evaluado la receptividad del estigma sobre la base de la presencia de algunas enzimas, particularmente esterasas y peroxidasas en la superficie del estigma (Dafni et al., 2005).

3.5. CONSERVACIÓN DE POLEN

La longevidad o viabilidad del polen se define como el polen almacenado que conserva su viabilidad después de la conservación a largo plazo (Vaknin y Disikowitch, 2000). La facilidad de almacenamiento y envío de polen y el potencial

para su uso inmediato brindan a los investigadores mayores opciones al diseñar sus programas de reproducción. Se han desarrollado métodos para la recolección de polen, desecación, pruebas de viabilidad y evaluación de la longevidad para muchas especies de interés, y han revelado la importancia crítica para aumentar la longevidad mediante el uso de polen de alta calidad desecándolo lo suficientemente rápido y posteriormente almacenándolo a temperaturas muy bajas (Volk, 2011). Varios informes han demostrado que el polen almacenado a bajas temperaturas fue eficaz para la conservación a largo plazo, como en *Arabidopsis* (Daher et al., 2009), bromelias (Parton et al., 2002; De Souza et al., 2014), pecanas (Peng et al., 2015), mango (Dutta et al., 2013) y lirio (Wang et al., 2004) entre otras.

El almacenamiento a largo plazo de los granos de polen es un medio útil para la conservación del acervo genético y para superar el aislamiento temporal y espacial de las especies parentales en los programas de reproducción. Hanna y Towill (1995), informan que es posible almacenar el polen de muchas especies a temperaturas entre 4 °C y -20 °C a corto plazo. Lo que puede ser adecuado para su uso en programas de mejoramiento. La viabilidad a largo plazo se puede mantener almacenando el polen a temperaturas de -80 °C o con nitrógeno líquido (-196 °C). La criopreservación es un método eficaz de almacenamiento de polen a largo plazo. En estas condiciones, todos los procesos metabólicos de los sistemas biológicos, incluido el polen, se detienen virtualmente, lo que permite el mantenimiento de la viabilidad (Bhat et al., 2012).

Aunque el almacenamiento a baja temperatura es una forma eficaz de mantener la viabilidad de muchas especies, la conservación a largo plazo puede provocar una disminución de la viabilidad y la germinabilidad de algunas especies. Por ejemplo, el polen almacenado en el congelador a -20°C y -30°C mostró una buena germinación, pero el tiempo de almacenamiento progresivo provocó la disminución gradual del porcentaje de germinación en *Pisum sativum* L. (Perveen, 2007).

Los principales factores que influyen en la vida útil del polen incluyen principalmente factores genéticos (variedad) (Mesnoua et al., 2018; Maryam et al., 2017). Además, la edad del polen, el estado fisiológico de la flor y el contenido de humedad del polen también afectan la viabilidad del polen durante el almacenamiento (Rosell et al., 2006; Soares et al., 2008). Se ha informado que la longevidad del polen aumenta cuando se almacena a bajas temperaturas y bajo contenido de humedad (Akond et al., 2012; Dutta et al., 2013; Mortazavi et al. 2010). Para el polen tolerante a la desecación, es fundamental que el polen se seque a un contenido de humedad objetivo poco después de la cosecha (Volk, 2011). Las anteras o los granos de polen también se pueden secar sobre gel de sílice a temperatura ambiente (Parton et al., 2002). Martínez-Gómez et al. (2002) desecaron con éxito el polen de almendras con gel de sílice durante 48 horas a 22 °C para un almacenamiento a largo plazo.

El secado del polen debe ser realizado con cuidado, no permitiendo que la temperatura exceda 28 °C (Argerich y Gaviola, 1995). El polen muy seco puede reducir su capacidad germinativa por perder agua de constitución; algunas técnicas de eliminación de la humedad de los granos de polen son: la liofilización (Akihama et al., 1978) y la utilización de sustancias higroscópicas, como la sílice gel (Pereira et al., 2002), solución de cloruro de sodio (Ferreira et al., 2010), u otras, siempre que estén acondicionadas en recipientes que proporcionen la condición de vacío (desecador).

3.6. MÉTODOS DE HIBRIDACIÓN EN FRIJOL CAUPI

La hibridación se define como la fusión entre gametos genéticamente diferentes, lo que da como resultado individuos híbridos heterocigotos para uno o más loci. A partir de la hibridación, el objetivo de mejorar las especies autógamas es obtener individuos homocigotos para sucesivas generaciones de autofertilización. En la población segregante, se seleccionan individuos con las características deseables

de ambos padres. Las cepas provenientes de estos individuos son evaluadas en pruebas comparativas de productividad, lanzándose como cultivares las superiores comprobadas (Borém y Miranda, 2013).

Las flores del frijol caupí son perfectas y cleistógamas; así, cuando se abren a primera hora de la mañana, generalmente ya están auto polinizadas (Kheradnam y Niknejad, 1971). De este modo, la emasculación antes de la apertura de las anteras es imprescindible para la obtención de cruces controlados. Sin embargo, las flores del frijol caupí son relativamente grandes y tienen la quilla y el estigma rectos, lo que facilita mucho el manejo de estos órganos en la hibridación, más precisamente en la emasculación (Freire Filho et al., 2014).

Hay al menos cuatro métodos usados en la hibridación del frijol caupí, los cuales han sido presentados por diferentes autores. Estos métodos difieren en cuanto a la técnica y el momento de la emasculación del botón floral, en cuanto a la recolección y utilización del polen y en cuanto al momento de la polinización (Freire Filho et al., 2014). Son los siguientes:

- En el método 1, según Kheradnam y Niknejad (1971); Zary y Miller Júnior (1982), se utiliza polen de flores recogidas por la mañana; los botones se emasculan y polinizan la misma mañana.
- En el método 2, según Rachie et al. (1975) y Zary y Miller Júnior (1982), se utiliza polen de flores recogidas por la mañana (flor abierta) y almacenadas en refrigerador hasta su utilización en horas de la tarde. Al final de la tarde, los botones florales se emasculan y se polinizan.
- En el método 3, según Sen y Bhowal (1961), Ebong (1972), Rachie et al. (1975) y Blackhurst y Miller Jr (1980), se utilizan botones florales emasculados al final de la tarde del día anterior a su antesis natural; el polen se recoge de flores en

antesis al inicio de la mañana del día siguiente y se realiza la polinización en los botones emasculados.

- En el método 4, se utiliza polen de flores recogidas por la tarde (flores que abrieron por la mañana y cerraron la tarde), los botones florales se emasculan y se polinizan en la misma tarde.

Kumar et al. (1976) relatan que la emasculación, para ser efectiva, debe ser hecha 20 horas antes de la apertura de la flor, sin embargo, emasculaciones realizadas hasta 14 horas antes de la polinización han sido eficientes. Así mismo, Blackhurst y Miller Junior (1980) mencionan que el estigma, es receptivo un día antes de la antesis y hasta el mediodía del día de la antesis, dependiendo de la temperatura y la humedad relativa del aire.

Albuquerque et al. (2000), la falta de fecundación de los óvulos que se demoran en alcanzar la madurez, probablemente tenga relación con la degeneración del gametofito masculino (capaz de hacer crecer el tubo polínico) que tiene vida limitada. También sugieren que este problema se produce debido a una falta de sincronía entre el tiempo necesario para que el saco embrionario termine su crecimiento y la vida útil del tubo de polen, a las mismas temperaturas.

3.6.1. **Emasculación.** En el frijol caupí ocurre protoginia y cleistogamia. De esta manera, en la tarde que antecede a la apertura del botón floral, aunque el polen no esté maduro, el estigma ya está receptivo, y, a la mañana siguiente, cuando las flores abran, ya estarán polinizadas (Kheradnam y Ninejad, 1971). La edad de la yema apropiada para la emasculación está indicada por la aparición de la corola justo encima del cáliz. Las anteras inmaduras se pueden quitar fácilmente en esta etapa con un par de pinzas rectas o curvas con puntas bien finas (Poonia et al., 2018). Es importante que se escojan botones florales bien formados y bien desarrollados, que se manipulan sin que el estigma y el estilete sufran daños y sin

que haya comprometimiento de la fijación al racimo. Kheradnam y Niknejad (1971) y Ebong (1972) presentaron una técnica que consistía en abrir el botón floral por la parte ventral, haciéndose luego una abertura en la quilla para la remoción de los estambres y polinización. Rachie et al. (1975) presentaron una técnica que consistía en un corte drástico del tercio final del botón floral, posibilitando la exposición completa del estigma y de los estambres, que eran removidos. Esta misma técnica, en versión revisada, fue presentada por Myers (1993) y por Teófilo et al., (2001). Con esta técnica, la polinización se facilita bastante, pero el botón floral sufre un fuerte estrés, debido al corte de los pétalos y la total exposición del estigma, antes de la polinización y, principalmente, después de ella.

La técnica de emasculación de Kheradnam y Niknejad (1971) y Ebong (1972) fue perfeccionada en el centro experimental de Embrapa en Brasil (Freire Filho et al., 2005), el cual también hizo la apertura del botón floral por la parte ventral con un ligero corte longitudinal, pero sin la remoción de partes de los pétalos. Con esta técnica, después de la emasculación y la polinización, el estandarte y las alas vuelven a la posición original, recobrando el estigma y, consecuentemente, evitando su exposición (Freire Filho et al., 2014).

3.6.2. Preparación de la flor masculina. En cualquiera de los métodos a ser utilizados deben ser elegidos, para el suministro de polen, flores abiertas bien formadas y bien túrgidas, en las cuales las anteras ya liberaron el polen sobre el estigma. Para obtener la exposición del estigma de la flor dadora del polen, hay al menos dos maneras: forzando el estandarte hacia atrás y comprimir la quilla sobre la base de la flor, lo que hará la exposición del estigma a través de la abertura de la parte superior de la quilla; en el caso de los pétalos de la flor, y en ese caso, es necesario ser bastante cuidado para no desperdiciar el polen (Freire Filho et al., 2014).

3.6.3. Hibridación artificial. Para que el proceso de la polinización ocurra, la transferencia del polen al estigma debe suceder durante el periodo en que el estigma se encuentre receptivo, en caso contrario, el polen no puede adherirse y no puede germinar (Kearns e Inouye, 1993).

Dependiendo del método a utilizar, la polinización se puede hacer por la mañana, después de la recolección del polen (flor abierta), o el polen puede ser conservado en refrigerador y la polinización hecha por la tarde, 8 a 10 horas después de la recolección del polen (flor abierta). Para efectuar la polinización, se frota ligeramente el estigma de la flor donadora, recubierto de polen, sobre el estigma de la flor receptora, emasculada. Con esta operación, el polen de la flor donante se deposita sobre el estigma de la flor receptora, y está hecha la polinización. Según Poonia et al. (2018), la polinización se realiza frotando suavemente las anteras maduras contra el estigma de las flores femeninas o emasculadas. Ehlers y Hall (1997), informa que se debe tener cuidado en el momento de la emasculación, cuidando que las anteras no se rompan, lo que podría resultar en autopolinización ya que el estigma es receptivo en este momento. Las flores emasculadas se dejan sin cubrir y se etiquetan para su fácil identificación a la mañana siguiente. La polinización se logra tomando flores abiertas del progenitor masculino deseado y cepillando el polen de las anteras y el estilo del progenitor masculino sobre la flor emasculada. Se deben elegir las flores que están derramando abundante polen. Las polinizaciones realizadas después de las 10:00 am son menos exitosas que las polinizaciones realizadas entre las 7:00 -10:00 am.

La tasa de pegamento del cruce depende de muchos factores; Kheradnam y Niknejad (1971) llamaron la atención que, para el éxito de la hibridación, deben evaluarse el horario de la emasculación, la viabilidad del polen y el método de polinización. Ebong (1972) mencionó la habilidad del operador, el horario de la emasculación y el horario de la polinización de los botones florales. Rachie et al. (1975) citaron, como factores importantes, los genotipos, las condiciones

ambientales y la técnica de manipulación. Ebong (1972) también hizo las siguientes sugerencias para mejorar la eficiencia de la hibridación: a) el operador debe ser bien entrenado; b) polinizar, como máximo, dos flores por pedúnculo en los dos primeros pares de botones de la inflorescencia; c) emascular botones que se abrirán en las próximas 12 a 16 horas; d) el polen maduro debe colocarse en el botón floral en un máximo de 12 a 16 horas después de la emasculación.

3.6.4. Identificación de los cruces. Después de la polinización, se coloca un marbete, un hilo de lana o fino hilo de metal en el botón floral polinizado. En dicho marbete, el cruce debe ser identificado, escribiendo, primero, el nombre o el código del parental femenino y, a continuación, el del parental masculino. Es importante también que se coloque la fecha de la polinización, para que se pueda hacer una previsión de la cosecha de la vaina y, si es necesario, una identificación del polinizador. Las vainas obtenidas de los cruces deben ser cosechadas con las respectivas etiquetas y guardadas individualmente. Se resalta que las vainas de los cruces recíprocos siempre se registran como cruces diferentes, para que se pueda saber el origen del citoplasma transmitido a la descendencia. Si, después de la realización de los cruces, se detecta alguna mezcla genética en algún parental, las vainas obtenidas de los cruces con ese parental que puedan ser identificadas, deben ser eliminadas; aquellas no identificadas de inmediato deben ser trabajadas separadamente, para que sean eliminadas tan pronto como sean identificadas (Freire Filho et al., 2014).

3.7. EFECTOS DEL AMBIENTE EN LA POLINIZACIÓN

Desde las últimas décadas, el aumento de la temperatura (anual) en todo el mundo ha sido muy claro y se prevé que la mayoría de los países se verán amenazados por un aumento anual de la temperatura de 1.8 - 4°C a fines de este siglo (Hasanuzzaman et al., 2013). Varios investigadores han documentado que la etapa reproductiva es más sensible al estrés por calor, lo que lleva a una

disminución de la fertilización que da como resultado el aborto de las flores y la reducción de la formación de granos (Wahid et al., 2007; Devasirvatham et al., 2013; Bhandari et al., 2016; Bheemanahalli et al., 2019; Kumar et al., 2017). Otro factor que influye de la germinación del polen y el crecimiento de los tubos es la humedad relativa. Se ha demostrado que la humedad es muy importante para la etapa de germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico (Güçlü y Koyuncu, 2017). Estudios anteriores han destacado que la viabilidad del polen se reduce significativamente al aumentar la temperatura y la humedad del aire (Aronne et al., 2014).

Para la formación de semillas, los granos de polen deben interactuar con un estigma receptivo, seguido del crecimiento del tubo polínico y llegar a los óvulos para la fertilización y el desarrollo del embrión y el endospermo (Barnabás et al., 2008). Algunos de estos eventos pueden verse afectados por las condiciones ambientales adversas que frecuentemente encuentran las plantas de cultivo (Driedonks et al., 2016). La alta temperatura puede detener la fertilización al inhibir el desarrollo de gametófitos machos (Jain et al., 2007) y femeninos (Snider et al., 2009). Singh et al. (2010), advierte que un efecto combinado de la radiación UVB y la temperatura posiblemente planteará un problema grave para el caupí y, muy probablemente, para muchos cultivos de verano en las condiciones climáticas futuras.

Las condiciones ambientales adversas afectan todas las etapas del desarrollo del gametofito masculino (Mesihovic et al., 2016). Los tejidos reproductivos y sus funciones son muy sensibles al estrés por calor y unos pocos grados de elevación de la temperatura durante la floración pueden ocasionar la pérdida de ciclos de cultivo de granos (Wheeler et al., 2000; Hatfield et al., 2011; Asseng et al., 2011). La etapa de desarrollo de las yemas florales más sensible a las altas temperaturas ocurre de siete a nueve días antes de la antesis, es decir, después de la meiosis, e implica la degeneración prematura del tejido tapetal y la falta de desarrollo

endotelial (Ahmed et al., 1992). La fertilización reducida es un problema común asociado con el calor debido a la interrupción de la meiosis y la fertilización en diversas especies, como el garbanzo, el caupí y la cebada (Kaushal et al., 2013; Jagadish et al., 2014; Bac-Molenaar et al., 2015; Driedonks et al., 2016). Estudios realizados por Sato et al. (2006), Li et al. (2012), Kaushal et al. (2013), Annisa et al. (2013), afirman que, durante la reproducción, un corto período de estrés por calor puede reducir significativamente el número de brotes florales y aumentar el aborto con flores, aunque existe una variación en la sensibilidad dentro y entre las especies de plantas y sus genotipos.

A nivel celular, el estrés por calor conduce a daño de la membrana, desnaturalización de proteínas, inactivación de enzimas en mitocondrias y cloroplastos, síntesis de carbohidratos y proteínas alterada, degradación de proteínas, metabolismo de carbono alterado y síntesis de nuevas proteínas relacionadas con la defensa (Hasanuzzaman et al., 2013). La reducción de la eficiencia de fertilización debido al estrés por calor se ha atribuido al aumento del estrés oxidativo, la reducción de carbohidratos, la concentración de ATP en el gineceo y la disminución de la fotosíntesis de las hojas en el frijol mungo (Suzuki et al., 2001) y garbanzo (Kumar et al., 2013). Durante el desarrollo del polen, las altas temperaturas limitan la fertilización y el desarrollo de semillas (Porch y Jahn, 2001), al reducir el número de granos de polen maduros disponibles para la polinización (Erickson y Markhart, 2002; Sato et al., 2002), así mismo reduce la viabilidad y germinabilidad de los granos de polen disponibles (Sato et al., 2006; Jain et al., 2007). De igual forma las concentraciones de hormonas como las auxinas (Teale et al. 2006) y el ácido abscísico (Todaka et al., 2012), puede alterar la función reproductiva.

Estudios realizados bajo condiciones de estrés revelan que el estrés térmico (> 30 °C) desde la meiosis temprana hasta la maduración del polen, reducen la viabilidad de los granos de polen en el garbanzo, lo que resulta en una falla de

fertilización que reduce el conjunto de semillas (Saini y Aspinall, 1981; Kaushal et al., 2016). Así mismo altera la morfología de la antera y limita la dehiscencia de las mismas en la anthesis (Dupuis y Dumas, 1990), también afecta la acumulación de carbohidratos, reduciendo el desarrollo de anteras y granos de polen, lo que también explica una escasa viabilidad del polen en la anthesis (Porch y Jahn, 2001; Kaushal et al., 2013). Gross y Kigel (1994) informaron que altas temperaturas de 27/32 °C en la esporogénesis reducen la viabilidad del polen y el rendimiento en genotipos de frijol sensibles al calor, debido a fallas en la dehiscencia de anteras, esterilidad del polen, ocasionando bajo número de vainas y de semillas. Así mismo, temperaturas >30 °C reducen la receptividad estigmática y la germinación del polen estigmático (Gross y Kigel, 1994; Harsant et al., 2013), y el crecimiento posterior del polen dentro del estigma y el estilo (Snider et al., 2011; Song et al., 2015) y la penetración de óvulos (Saini et al., 1983). Mutters et al. (1989b), en estudios sobre el fotoperiodo y altas temperaturas en el desarrollo floral, encontraron que en ambiente controlado las altas temperaturas nocturnas pueden ser más dañinas para el caupí en días largos que en días cortos.

La exposición de la soja a altas temperaturas durante la etapa de polinización tiene efectos negativos sobre el crecimiento y la viabilidad del polen, con disminuciones en la producción de polen (34%), la germinación del polen (56%) y el alargamiento del tubo polínico (33%), lo que lleva a un rendimiento reducido (Hatfield et al., 2011). Altas temperaturas de 38/28 °C durante la floración redujeron la germinación *in vitro* del polen, los granos de polen se deformaron, con una exina más gruesa y una capa de tapetum desintegrado (Djanaguiraman et al., 2013). Investigaciones realizadas por Devasirvatham et al. (2012a), señalan que generalmente, el garbanzo se adapta a las altas temperaturas mediante un mecanismo de escape. Sin embargo, el estrés por calor durante el desarrollo reproductivo puede causar una pérdida significativa de rendimiento. Los efectos más importantes en la fase reproductiva que afectan la formación de vainas, semillas y rendimiento son: tiempo de floración, deterioro y asincronía del

desarrollo de los órganos florales masculinos y femeninos. De igual manera Devasirvatham et al. (2013), concluye que el estrés térmico al final de la temporada produjo más anomalías estructurales en anteras y granos de polen, como cambios en el número de lóbulos de anteras, engrosamiento de la pared de la epidermis de anteras y esterilidad del polen en genotipos sensibles. Las temperaturas de 35/20 y 40/25 °C antes y después de la antesis redujeron la viabilidad del polen, la producción de polen por flor y el porcentaje de germinación del polen en garbanzo (Devasirvatham et al., 2012b), en caupí, la reducción en la formación de vainas, se asoció con una baja viabilidad del polen y una menor dehiscencia de anteras (Mutters et al., 1989a; Ahmed et al., 1992), particularmente cuando se experimentaron altas temperaturas en la microsporogénesis (Warrag y Hall, 1984). Estudios realizados por Singh et al. (2010), manifiestan que altas temperaturas causaron efectos dañinos sobre los rasgos reproductivos, particularmente la producción viable de polen y el rendimiento de semillas en frijol caupí. El calor reduce significativamente el rendimiento de grano de caupí cuando ocurren altas temperaturas (> 20 °C) a altas horas de la noche. Esto se debe a que la producción de flores y la viabilidad del polen se ven afectadas por las altas temperaturas (Hall, 2004). Este autor mostró que cada 1 °C por encima de un umbral de 16 °C durante la noche conduce a una reducción del 4-14% en el rendimiento de grano.

La estructura y la composición de la pared del polen regulan el reconocimiento del polen, la hidratación y la adhesión al estigma y se han observado modificaciones inducidas por altas temperaturas en la morfología de la pared del polen en frijol común (Porch y Jahn, 2001), en caupí (Ahmed et al., 1992) y trigo (Prasad y Djanaguiraman, 2014).

En arroz, la fertilidad de las espiguillas a altas temperaturas del aire disminuyó aún más con el aumento de la humedad (Nishiyama y Satake, 1981; Matsui et al., 1997), lo que sugiere que la humedad modifica el impacto de la temperatura en la

fertilidad de las espiguillas. Abeysiriwardena et al. (2002) también informaron que la esterilidad de grano casi completa en el arroz se podía inducir a una temperatura del aire de 35 °C día / 30°C noche cuando se combinaba con 85 a 90% de humedad relativa (HR). Por tanto, a mayor humedad relativa (HR) en la etapa de floración y al aumentar la temperatura afecta negativamente a la fertilidad de las espiguillas (Yan et al., 2010). Pushpavalli (2015), investigando el estrés por humedad relativa en garbanzo (*Cicer arietinum*); informa que la viabilidad del polen no se vio afectada, los genotipos evaluados mostraron un 98-100% de polen viable cuando se tiñeron con la tinción de Alexander; de manera similar, la receptividad del estigma y el crecimiento del tubo polínico no se vieron afectados, incluso cuando la humedad relativa fue solo del 20%.

Las partes de plantas masculinas y femeninas se coordinan para asegurar la deposición de polen cuando el estigma se vuelve receptivo, y esto implica posicionamiento apropiado de anteras cerca del estigma para capturar el polen después de la dehiscencia (Sage et al., 2015). La germinación exitosa del polen sobre el estigma y el crecimiento del tubo polínico hacia el gametofito femenino para liberar esperma depende de las interacciones de célula a célula entre el grano/tubo polínico y los tejidos transmisores (estigma, estilo y ovario) (Sage et al., 2009; Chae y Lord, 2011). El estrés térmico altera esta coordinación al cambiar el posicionamiento estructural de las anteras relacionadas con el estigma, el momento de dehiscencia de las anteras y la maduración y receptividad del estigma/estilo debido a la alteración en la división y elongación celular (Giorno et al., 2013; Sage et al., 2015). Estos cambios en última instancia evitan la deposición de polen sobre el estigma y alteran el proceso de fertilización.

Se ha observado que la germinación del polen comienza a disminuir a 30 °C (tomate: (Vasil, 1987), cucurbita (*Cucurbita pepo*): (Johannsson y Stephenson, 1998), algodón: (Kakani et al., 2005). La germinación del polen se alteró en tomate bajo estrés por calor (Sato et al., 2000). Por tanto, la viabilidad del grano de polen

tiende a disminuir con el tiempo en respuesta a diversos factores ambientales (Figueredo, 2013).

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de la temperatura y humedad relativa sobre la viabilidad del polen de frijol caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.) en Montería-Córdoba.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Evaluar la viabilidad del polen colectado a diferentes horas del día en dos semestres.
- 2 Evaluar la receptividad estigmática en dos ambientes en diferentes horas del día.
- 3 Evaluar dos métodos de hibridación en dos ambientes a diferentes horas del día.
- 4 Determinar el efecto de la conservación sobre la viabilidad de polen.

5. HIPOTESIS

El incremento de la temperatura ambiental y humedad relativa, afectan la viabilidad del polen en frijol caupí y con ello, reducen el potencial de rendimiento de las plantas.

6. PERFIL Y ALCANCE

La presente investigación consta de 5 capítulos, en los cuales se consigna la siguiente información:

El primer capítulo, se presenta información pertinente a la temática principal relacionada con la investigación desarrollada.

El segundo capítulo, hace relación a la viabilidad del polen de frijol caupí en diferentes horas del día. Se presentan los resultados y discusión, referentes a porcentaje de polen viable e inviable utilizando dos pruebas o tests para su detección.

El tercer capítulo consta de la evaluación de la receptividad del estigma en botones florales en preantesis, mediante la detección de la enzima peroxidasa con el peróxido de hidrogeno.

En el cuarto capítulo, contiene los resultados concernientes a la evaluación de dos métodos de hibridación en dos ambientes, basándose en el porcentaje de cruzamientos efectivos.

El quinto capítulo, hace referencia al efecto del tiempo de almacenamiento de polen sobre la viabilidad, determinada esta con dos tests.

Con la presente investigación se generan conocimientos más acertados de aspectos sobre la biología floral del frijol caupí; determinando así el porcentaje de polen viable en diferentes horas del día, permitiendo con esto que el fitomejorador tome decisiones acertadas en la colecta de polen; así mismo, se determina la hora de mayor receptividad del estigma, que es fundamental para ser usado en

programas de mejoramiento genético de la especie a partir de cruzamientos controlados.

Los resultados de este estudio contribuyen con información preliminar sobre estrategias para apoyar la conservación y mejoramiento genético de frijol caupí, con ganancias sustanciales en ambas áreas.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abdelgadir, H. A., Johnson, S. D., y Van Staden, J. (2012). Pollen viability, pollen germination and pollen tube growth in the biofuel seed crop *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). *South African Journal of Botany*, 79, 132-139.
- Abeyesiriwardena, D. D. Z., Ohba, K., Maruyama, A. (2002). Influence of temperature and relative humidity on grain sterility in rice. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 30(1-2), 33-41.
- Aguirre, P. (2009). Caracterización nutricional del grano de Caupi *Vigna unguiculata* L. en ratas [Tesis maestría en Ciencias Agrarias]. *Palmira (Colombia): Universidad nacional de Colombia, escuela de posgrados*, 21-54.
- Ahdoot, S., y Pacheco, S. E. (2015). Global climate change and children's health. *Pediatrics*, 136(5), e1468-e1484.
- Ahmed, F. E., Hall, A. E., y DeMason, D. A. (1992). Heat injury during floral development in cowpea (*Vigna unguiculata*, Fabaceae). *American Journal of Botany*, 79(7), 784-791.
- Akihama, T., Omura, M., Kozaki, I. (1978). Further investigation of freezer-drying for deciduous fruit tree pollen. In: AKIHAMA, T.; NAKAJIMA, K. (Ed.). Long term preservation of favorable germplasm in arboreal crops. Fujimoto: Fruit tree research station. p. 1-7.
- Akond, A. M., Pounders, C. T., Blythe, E. K., y Wang, X. (2012). Longevity of crapemyrtle pollen stored at different temperatures. *Scientia horticultrae*, 139, 53-57.
- Alexander, M. P. (1969). Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain technology*, 44(3), 117-122.
- Allen, A. M., Thorogood, C. J., Hegarty, M. J., Lexer, C., y Hiscock, S. J. (2011). Pollen–pistil interactions and self-incompatibility in the Asteraceae: new insights from studies of *Senecio squalidus* (Oxford ragwort). *Annals of Botany*, 108(4), 687-698.

- Albán, M. (2012). Manual del cultivo de frijol caupí. [http://www.swisscontact.org/fileadmin/user_upload/COUNTRIES/Peru/Documents/Publications/CAU PI.pdf](http://www.swisscontact.org/fileadmin/user_upload/COUNTRIES/Peru/Documents/Publications/CAU_PI.pdf) [Consultado: 22 de noviembre de 2018].
- Albuquerque, N., Burgos, L., Egea, J. (2000). Consequences to fertilization of the developmental stage of apricot ovules at anthesis. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75(6), 662-666.
- Alghali, A. M. (1991). Studies on cowpea farming practices in Nigeria, with emphasis on insect pest control. *International Journal of Pest Management*, 37(1), 71-74.
- Alidu, M. S. (2018). Genetic Variability for Flowering Time, Maturity and Drought Tolerance in Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]: A Review Paper. *Journal of Agriculture and Ecology Research International*, 1-18.
- Annisa, Chen, S., Turner, N. C., Cowling, W. A. (2013). Genetic variation for heat tolerance during the reproductive phase in *Brassica rapa*. *J. Agron. Crop Sci.* 199, 424-435.
- Araméndiz, H., Cardona, C. y Combatt, E. (2016). Contenido nutricional de líneas de frijol caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.) seleccionadas de una población criolla. *Revista Inf. Tecnológica* 27(2):53-60.
- Aronne, G., Buonanno, M., y De Micco, V. (2014). Reproducing under a warming climate: long winter flowering and extended flower longevity in the only Mediterranean and maritime *Primula*. *Plant Biology*, 17(2), 535-544.
- Argerich, C.A.; Gaviola, J.C. (1995). Production de semilla de tomate. 1ed., Argentina: INTA-EEA la Consulta, Fascículo 6, 81p.
- Asseng, S., Foster, I. A. N., Turner, T. C. (2011). The impact of temperature variability on wheat yields. *Glob. Change Biol.* 17, 997-1012.
- Azevedo, C.V.G., Ribeiro, T., Silva, D., Carbonell, S. E Chiorato, A. (2015). Adaptabilidade, estabilidade e resistência a patógenos em genótipos de feijoeiro. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 50(10), 912-922.

- Bac-Molenaar, J. A., Fradin, E. F., Becker, F. F., Rienstra, J. A., van der Schoot, J., Vreugdenhil, D., Keurentjes, J. J. (2015). Genome-wide association mapping of fertility reduction upon heat stress reveals developmental stage-specific QTLs in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 27(7), 1857-1874.
- Barnabás, B., Jäger, K., y Fehér, A. (2008). The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, cell & environment*, 31(1), 11-38.
- Basso-Alves, J. P., Agostini, K., y de Pádua Teixeira, S. (2011). Pollen and stigma morphology of some Phaseoleae species (Leguminosae) with different pollinators. *Plant Biology*, 13(4), 602-610.
- Bellusci, F., Musacchio, A., Stabile, R., y Pellegrino, G. (2010). Differences in pollen viability in relation to different deceptive pollination strategies in Mediterranean orchids. *Annals of botany*, 106(5), 769-774.
- Bernardello, G., Anderson, G. J., Stuessy, T. F., y Crawford, D. J. (2001). A survey of floral traits, breeding systems, floral visitors, and pollination systems of the angiosperms of the Juan Fernández Islands (Chile). *The Botanical Review*, 67(3), 255-308.
- Bhat, Z. A., Dhillon, W. S., Shafi, R. H. S., Rather, J. A., Mir, A. H., Shafi, W., ... & Wani, T. A. (2012). Influence of storage temperature on viability and in vitro germination capacity of pear (*Pyrus* spp.) pollen. *Journal of Agricultural Science*, 4(11), 128.
- Bheemanahalli, R., Sunoj, V. J., Saripalli, G., Prasad, P. V., Balyan, H. S., Gupta, P. K., Grant, N. y Jagadish, S. K. (2019). Quantifying the impact of heat stress on pollen germination, seed set, and grain filling in spring wheat. *Crop Science*, 59(2), 684-696.
- Bitá, C., y Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in plant science*, 4, 273.
- Bindumadhava, H., Nair, R. M., Nayyar, H., Riley, J. J., y Easdown, W. (2017). Mungbean production under a changing climate-insights from growth physiology. *Mysore Journal of Agricultural Sciences*, 51(1), 21-26.

- Blackhurst, H. T., y Miller, J. C. (1980). Cowpea. *Hybridization of crop plants*, (hybridizationof). Madson: *American Society of Agronomy*, 327-337.
- Boukar, O., Belko, N., Chamarthi, S., Togola, A., Batiemo, J., Owusu, E., Haruna, M., Diallo, S., Umar, M.L. y Olufajo, O. (2018). Cowpea (*Vigna unguiculata*): genetics, genomics and breeding. *Plant Breed.* 1-10
- Boukar, O., Fatokun, C. A., Huynh, B. L., Roberts, P. A., y Close, T. J. (2016). Genomic tools in cowpea breeding programs: status and perspectives. *Frontiers in plant science*, 7, 757.
- Boukar, O., Bhattacharjee, R., Fatokun, C., Kumar, P. L., y Gueye, B. (2013). Genetic and Genomic Resources of Grain Legume Improvement: 6. Cowpea. Elsevier Inc. Chapters.
- Boukar, O., Massawe, F., Muranaka, S., Franco, J., Maziya-Dixon, B., Singh, B., y Fatokun, C. (2011). Evaluation of cowpea germplasm lines for protein and mineral concentrations in grains. *Plant Genetic Resources*, 9(4), 515-522.
- Borém, A.E. y Miranda, G.V. (2013). Melhoramento de plantas. 6 ed. Viçosa: UFV. 523p.
- Ćalić, D., Devrnja, N., Kostić, I., y Kostić, M. (2013). Pollen morphology, viability, and germination of *Prunus domestica* cv. Požegača. *Scientia Horticulturae*, 155, 118-122.
- Carmo-Oliveira, R., y Morretes, B. L. D. (2009). Stigmatic surface in the Vochysiaceae: reproductive and taxonomic implications. *Acta Botanica Brasílica*, 23(3), 780-785.
- Carvalho, M., Lino-Neto, T., Rosa, E., y Carnide, V. (2017). Cowpea: a legume crop for a challenging environment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(13), 4273-4284.
- Chae, K., Lord, E. M., (2011). Pollen tube growth and guidance: roles of small, secreted proteins. *Ann. Bot.* 108, 627–636.

- Challinor, A. J., Wheeler, T. R., Craufurd, P. Q., Ferro, C. A. T., Stephenson, D. B. (2007). Adaptation of crops to climate change through genotypic responses to mean and extreme temperatures. *Agriculture, ecosystems & environment*, 119(1-2), 190-204.
- Cheng, A. (2018). Shaping a sustainable food future by rediscovering long-forgotten ancient grains. *Plant Science*, 269, 136-142.
- Cosio, C., y Dunand, C. (2009). Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of experimental botany*, 60(2), 391-408.
- Costa, M. F. B., Paulino, J. V., Marinho, C. R., Leite, V. G., Pedersoli, G. D., y Teixeira, S. P. (2014). Stigma diversity in tropical legumes with considerations on stigma classification. *The Botanical Review*, 80(1), 1-29.
- Coulibaly S., Pasquet R. S., Papa R, Gepts P. (2002). AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L. Walp. Reveals extensive gene flow between wild and domesticated types. *Theor. Appl. Genet.* 104: 358-366.
- Cuchiara, C. C., Silva, S. D. D. A., y Bobrowski, V. L. (2012). Conservação de grãos de pólen de mamoneira a baixas temperaturas. *Revista Ceres*, 59(1), 82-87.
- Dafni A, D Firmage. (2000). Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution* 222: 113-132.
- Dafni, A., Kevan, P. G., y Husband, B. C. (2005). Practical pollination biology. *Practical pollination biology*. Enviroquest, Ltd, Cambridge, Ontario, Canada. 590p.
- Daher, F. B., Chebli, Y., y Geitmann, A. (2009). Optimization of conditions for germination of cold-stored *Arabidopsis thaliana* pollen. *Plant cell reports*, 28(3), 347-357.
- Dane, F., y Ekici, N. (2011). Pollen tube growth of *Paeonia tenuifolia* L. (Paeoniaceae) in vitro and in vivo. *Bangladesh Journal of Botany*, 40(1), 93-95.

- DaMatta, F.M., Grandis, A., Arenque, B.C., y Buckeridge, M.S. (2010). Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. *Food Research International* 43, 1814-1823.
- De Souza, E. H., Souza, F. V. D., Rossi, M. L., Brancalleao, N., da Silva Ledo, C. A., y Martinelli, A. P. (2014). Viability, storage and ultrastructure analysis of *Aechmea bicolor* (Bromeliaceae) pollen grains, an endemic species to the Atlantic forest. *Euphytica*, 204(1), 13-28.
- Delph, L. F., M. H. Johannsson y A. G. Stephenson. (1997). How environmental factors affect pollen performance: ecological and evolutionary perspectives. *Ecology* 78(6), 1623-1639.
- Devasirvatham, V., Tan, D. K. Y., Gaur, P. M., Raju, T. N., y Trethowan, R. M. (2012a). High temperature tolerance in chickpea and its implications for plant improvement. *Crop and Pasture Science*, 63(5), 419-428.
- Devasirvatham, V., Gaur, P. M., Mallikarjuna, N., Tokachichu, R. N., Trethowan, R. M., y Tan, D. K. (2012b). Effect of high temperature on the reproductive development of chickpea genotypes under controlled environments. *Functional Plant Biology*, 39(12), 1009-1018.
- Devasirvatham, V., Gaur, P. M., Mallikarjuna, N., Raju, T. N., Trethowan, R. M., Tan, D. K. (2013). Reproductive biology of chickpea response to heat stress in the field is associated with the performance in controlled environments. *Field Crops Research*, 142, 9-19.
- Djanaguiraman, M., Prasad, P. V., Boyle, D. L., y Schapaugh, W. T. (2013). Soybean pollen anatomy, viability and pod set under high temperature stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 199(3), 171-177.
- Devi, C. B., Kushwaha, A., y Kumar, A. (2015). Sprouting characteristics and associated changes in nutritional composition of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Journal of food science and technology*, 52(10), 6821-6827.
- Driedonks, N., Rieu, I., y Vriezen, W. H. (2016). Breeding for plant heat tolerance at vegetative and reproductive stages. *Plant reproduction*, 29(1-2), 67-79.

- Dupuis, I., y Dumas, C. (1990). Influence of temperature stress on in vitro fertilization and heat shock protein synthesis in maize (*Zea mays* L.) reproductive tissues. *Plant physiology*, 94(2), 665-670.
- Dutta, S. K., Srivastav, M., Chaudhary, R., Lal, K., Patil, P., Singh, S. K., y Singh, A. K. (2013). Low temperature storage of mango (*Mangifera indica* L.) pollen. *Scientia Horticulturae*, 161, 193-197.
- Easterling, D. R., Horton, B., Jones, P. D., Peterson, T. C., Karl, T. R., Parker, D. E., y Folland, C. K. (1997). Maximum and minimum temperature trends for the globe. *Science*, 277(5324), 364-367.
- Ebong, U. U. (1972). Optimum time for artificial pollination in cowpeas, *Vigna sinensis* Endl. *Samaru Agricultural Newsletter*, Zaria, 14(2), 31-35.
- Edlund, A. F., Swanson, R., y Preuss, D. (2004). Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *The Plant Cell*, 16(suppl 1), S84-S97.
- Ehlers, J. y A. Hall. (1997). Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops Research* 53(1-3): 187-204.
- Erickson, A. N., y Markhart, A. H. (2002). Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. *Plant Cell Environ.* 25, 123-130.
- Fall, L., Diouf, D., Fall, M. A., Abaye, F., Gueye, M. (2003). Genetic diversity in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Varieties determined by ARA and RADP techniques. *Afr J Biotechnol*, 2 (2): 48-50.
- Fatokun C. A., y Ng Q. (2007). Outcrossing in cowpea. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 5:334-338.
- Ferreira, C. A., Von Pinho, É. V. D. R., Alvim, P. D. O., De Andrade, V. I. N. Í. C. I. U. S., Silva, T. T. D. A., y Cardoso, D. L. (2010). Conservação e determinação da viabilidade de grão de pólen de milho. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 6(02).

- Fery, R. L. (2002). New opportunities in Vigna. *Trends in new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, VA, 424-428.
- Freire Filho, F. R., Ribeiro, V. Q., Barreto, P. D., y Santos, A. D. (2005). Melhoramento genético. *Feijão-caupi: avanços tecnológicos*. Brasília: *Embrapa Informação Tecnológica*, 1, 29-92.
- Freire Filho, F. R., Ribeiro, V. Q., Cardoso, M. J., dos Santos, A. A., Nogueira, M. D. S., Vieira, P. D. M., ... Y Silva, K. (2014). Cruzamentos de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp.] realizados na Embrapa Meio-Norte, no período de 1982 a 2012. *Embrapa Meio-Norte-Documentos (INFOTECA-E)*.
- Galen, C., y Plowright, R. C. (1987). Testing the accuracy of using peroxidase activity to indicate stigma receptivity. *Canadian Journal of Botany*, 65(1), 107-111.
- Gaaliche, B., Majdoub, A., Trad, M., Y Mars, M. (2013). Assessment of pollen viability, germination, and tube growth in eight Tunisian caprifig (*Ficus carica* L.) cultivars. *ISRN Agronomy*, 2013. 4p.
- Giorno, F., Wolters-Arts, M., Mariani, C., Rieu, I. (2013). Ensuring reproduction at high temperatures: the heat stress response during anther and pollen development. *Plants*, 2(3), 489-506.
- Gowthami, R., Srivastava, V., Singh, A. P., y Singh, H. (2019). 9. Cryopreservation of Pollen. *Laboratory Manual for Eighth International Training Course on*, 51.
- Gross, Y., Kigel, J. (1994). Differential sensitivity to high temperature of stages in the reproductive development of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Res.* 36, 201-212.
- Güçlü, S. F., y Koyuncu, F. (2017). Effects of relative humidity on in vitro pollen germination and tube growth in sweet cherries (*Prunus Avium* L.). *Sci Papers Ser B Hortic*, 61, 15-20.
- Hall, A. E. (2004). Comparative ecophysiology of cowpea, common bean and peanut. In: *Physiology and biotechnology integration for plant breeding*. CRC Press.271-324.

- Hanna W. W, Towill L. E. (1995). Long-term pollen storage. *Plant Breeding Reviews* 13:179-207.
- Harsant, J., Pavlovic, L., Chiu, G., Sultmanis, S., Sage, T. L., (2013). High temperatura stress and its effect on pollen development and morphological components of harvest index in the C3 model grass *Brachypodium distachyon*. *J. Exp. Bot.* 64, 2971-2983.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M., Roychowdhury, R., y Fujita, M. (2013). Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences*, 14(5), 9643-9684.
- Hatfield, J. L., Boote, K. J., Kimball, B. A., Ziska, L. H., Izaurralde, R. C., Ort, D., Thomson, A., Wolfe, D. (2011). Climate impacts on agriculture: Implications for cropproduction. *Agron. J.* 103, 351-370.
- Heredia, P., Del Castillo, S., Bejarano, P., y Gordillo, M. (2007). Información nutricional para tres regiones de Colombia Costa Atlántica. Nariño, Cauca y Valle (CIAT). 245p.
- Heslop-Harrison, J., y Heslop-Harrison, Y. (1970). Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain technology*, 45(3), 115-120.
- Heslop-Harrison, Y., y Shivanna, K. R. (1977). The receptive surface of the angiosperm stigma. *Annals of botany*, 41(6), 1233-1258.
- Hinojosa, L., Matanguihan, J. B., y Murphy, K. M. (2019). Effect of high temperature on pollen morphology, plant growth and seed yield in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Agronomy and Crop Science*, 205(1), 33-45.
- Hiscock, S. J., Bown, D., Gurr, S. J., y Dickinson, H. G. (2002). Serine esterases are required for pollen tube penetration of the stigma in Brassica. *Sexual Plant Reproduction*, 15(2), 65-74.
- Hiscock, S. J., Hoedemaekers, K., Friedman, W. E., y Dickinson, H. G. (2002). The stigma surface and pollen-stigma interactions in *Senecio squalidus*

- L.(Asteraceae) following cross (compatible) and self (incompatible) pollinations. *International Journal of Plant Sciences*, 163(1), 1-16.
- Hiscock, S. J., y Allen, A. M. (2008). Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus. *New Phytologist*, 179(2), 286-317.
- Hister, C. A. L., y Tedesco, S. B. (2016). Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) através de distintos métodos de coloração. *Revista brasileira de plantas medicinais*, 18(1), 135-141.
- Huang, Z., Zhu, J., Mu, X., y Lin, J. (2004). Pollen Dispersion, Pollen Viability and Pistil Receptivity in *Leymus chinensis*. *Annals of Botany*, 93, 295-301.
- Huynh, B. L., Close, T. J., Roberts, P. A., Hu, Z., Wanamaker, S., Lucas, M. R., y Ehlers, J. D. (2013). Gene pools and the genetic architecture of domesticated cowpea. *The Plant Genome*, 6(3).
- Iborra, J. L., Guardiola, J., Montaner, S., Canovas, M. And Manjon, A. (1992). 2, 3, 5 Triphenyl tetrazolium chloride as a viable assay for immobilized plant cells. *Biotechnology Techniques*, 6(4):319-322.
- Ige, O. E., Olotuah, O. F., Akerele, V. (2011). Floral biology and pollination ecology of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Modern Applied Science*, 5(4), 74.
- Imani, A., Barzegar, K., Piripireivatlou, S., y Masomi, S. H. (2011). Storage of apple pollen and in vitro germination. *African Journal of Agricultural Research*, 6(3), 624-629.
- International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR). (1983). Descriptors for cowpea. IBPGR Executive Secretariat. Rome, Italy. 30 p.
- Jagadish, K. S., Craufurd, P., Shi, W., y Oane, R. (2014). A phenotypic marker for quantifying heat stress impact during microsporogenesis in rice (*Oryza sativa* L.). *Functional Plant Biology*, 41(1), 48-55.
- Jain, M., Prasad, P. V., Boote, K. J., Hartwell, A. L., y Chourey, P. S. (2007). Effects of season-long high temperature growth conditions on sugar-to-

- starch metabolism in developing microspores of grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Planta*, 227(1), 67-79.
- Jiang, Y., Lahlali, R., Karunakaran, C., Kumar, S., Davis, A. R., and Bueckert, R. A. (2015). Seed set, pollen morphology and pollen surface composition response to heat stress in field pea. *Plant Cell Environ.* 38, 2387-2397.
- Johannsson, M. H., Stephenson, A. G. (1998). Effects of temperatura during microsporogenesis on pollen performance in *Cucurbita pepo* L. (cucurbitaceae). *Int. J. PlantSci.* 159, 616-626.
- Jones, P. D., y A. Moberg. (2003). Hemispheric and large-scale surface air temperature variations: an extensive revision and an update to 2001. *J. Climate* 16:206-223.
- Kakani, V. G., Reddy, K. R., Koti, S., Wallace, T. P., Prasad, P. V., Reddy, V. R., Zhao, D. (2005). Differences *in vitro* pollen germination and pollen tubegrowth of cotton cultivars in response to high temperature. *Ann. Bot.* 96, 59-67.
- Kaushal, N., Awasthi, R., Gupta, K., Gaur, P., Siddique, K. H. M., Nayyar, H. (2013). Heat-stress induced reproductive failures in chickpea (*Cicer arietinum* L.) are associated with impaired sucrose metabolism in leaves and anthers. *Funct.Plant Biol.* 40, 1334-1349.
- Kaushal, N., Bhandari, K., Siddique, K. H. M., Nayyar, H. (2016). Food crops face rising temperatures: An overview of responses, adaptive mechanisms, and approaches to improve heat tolerance. *Cogent Food and Agriculture*, 2(1), 42p.
- Kearns, C. A., y Inouye, D. W. (1993). Techniques for pollination biologists. University press of Colorado. Niwot, Colorado. 80544, EE. UU., 583p.
- Khatun, S., y Flowers, T. J. (1995). The estimation of pollen viability in rice. *Journal of Experimental Botany*, 46(1), 151-154.
- Kheradnam, M., y Niknejad, M. (1971). Crossing technique in cowpeas. *Iran Agricultural Research*, 1(1), 57-58.

- Kumar, P.; Prakash, R.; Haque, M. F. (1976). Floral biology of cowpea (*Vigna sinensis* L.). *Tropical Grain Legume Bulletin*, Ibadan, v. 6, p. 9-11.
- Kumar, P., Pal, M., Joshi, R., Sairam, R. K. (2013). Yield, growth and physiological responses of mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] genotypes to waterlogging at vegetative stage. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(2), 209-220.
- Kumar, R. R., Goswami, S., Shamim, M., Mishra, U., Jain, M., Singh, K., Dubey, K. Singh, G. P., y Rai G.K. (2017). Biochemical defense response: characterizing the plasticity of source and sink in spring wheat under terminal heat stress. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1603.
- Ladeinde, T. A. O., y Bliss, F. A. (1977). Identification of the bud stage for pollinating without emasculation in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Nigerian J Sci*, 11, 183-194.
- Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B., y Lock, M. (2005). Legumes of the World., (Royal Botanic Gardens, Kew: London, UK). *Bol. Soc.Bot. Méx.* 77: 75-77.
- Li, Z., Palmer, W. M., Martin, A. P., Wang, R., Rainsford, F., Jin, Y., Patrick, J. W., Yang, Y., Ruan, Y. L. (2012). High invertase activity in tomato reproductive organs correlates with enhanced sucrose import into, and heat tolerance of Young fruit. *J. Exp. Bot.* 63, 1155-1166.
- Litzenberger S. C. (1991). Guía para Cultivos en los Trópicos y los Sub -Trópicos. AID. México/Buenos Aires. Pág.73-76.
- Lohani, N., Singh, M. B., y Bhalla, P. L. (2020). High temperature susceptibility of sexual reproduction in crop plants. *Journal of Experimental Botany*, 71(2), 555-568.
- Long, S. P., y D. R. Ort. (2010). More than taking the heat: crops and global change. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13:241-248.
- Losada, J. M., y Herrero, M. (2012). Arabinogalactan-protein secretion is associated with the acquisition of stigmatic receptivity in the apple flower. *Annals of Botany*, 110(3), 573-584.

- Machado, C. D. A., Moura, C. R. F., Lemos, E. E. P. D., Ramos, S. R. R., Ribeiro, F. E., y Lédo, A. D. S. (2014). Pollen grain viability of coconut accessions at low temperatures. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 36(2), 227-232.
- Marak, M. K., y Wani, A. M. (2018). Pollen morphology and viability in *Gliricidia sepium*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(5), 19-22.
- Maréchal, R., Masherpa, J.M. y Stainier, F. (1978). Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. *Boissiera* 28: 1-273.
- Martínez-Gómez, P., Gradziel, T. M., Ortega, E., y Dicenta, F. (2002). Low temperature storage of almond pollen. *HortScience*, 37(4), 691-692.
- Maryam, M.J. Jaskani and S.A. Naqvi. 2017. Storage and viability assessment of date palm pollen. *Methods Mol. Biol.*, 1638: 3-13.
- Matsui, T., O. S. Namuco, L. H. Ziska, T. Horie, (1997): Effect of high temperature and CO₂ concentration on spikelet sterility in indica rice. *Field Crops Res.* 51, 213-219.
- Mattson, A. M., Jensen, C. O., y Dutcher, R. A. (1947). Triphenyltetrazolium chloride as a dye for vital tissues. *Science*, 106(2752), 294-295.
- Menssen, M., Linde, M., Omondi, E. O., Abukutsa-Onyango, M., Dinssa, F. F., y Winkelmann, T. (2017). Genetic and morphological diversity of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) entries from East Africa. *Scientia horticultrae*, 226, 268-276.
- Mesihovic, A., Iannacone, R., Firon, N., y Fragkostefanakis, S. (2016). Heat stress regimes for the investigation of pollen thermotolerance in crop plants. *Plant reproduction*, 29(1-2), 93-105.
- Mesnoui, M., Roumani, M., y Salem, A. (2018). The effect of pollen storage temperatures on pollen viability, fruit set and fruit quality of six date palm cultivars. *Scientia Horticulturae*, 236, 279-283.

- Monterroso, V. A. y Wien, H. C., (1990). Flower and pod abscission due to heat stress in beans. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 115: 631-634.
- Mortazavi, S.M.H., Arzani, K., Moini, A. (2010). Optimizing storage and in vitro germination of date palm (*Phoenix dactylifera*) pollen. *J. Agric. Sci. Technol.* 12, 181–189.
- Munhoz, M., Luz, C. F. P. D., Meissner Filho, P. E., Barth, O. M., y Reinert, F. (2008). Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. *Brazilian Journal of Botany*, 31(2), 209-214.
- Murillo, A. B. D., J. L. Troyo., H.L. García., H. M Landa y J.A. Larrinaga. (2000). El frijol Yarimón leguminosa tolerante a la sequía y salinidad. Programa de salinidad en zonas áridas. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. *PYTON Int J Exp Bot* 67:71 - 84 (8)
- Mutters R. G., Ferreira L. G. R., Hall A. E. (1989a). Proline content of the anthers and pollen of heat-tolerant and heat-sensitive cowpea subjected to different temperatures. *Crop Science* 29: 1497 - 1500.
- Mutters, R. G., Hall, A. E., y Patel, P. N. (1989b). Photoperiod and light quality effects on cowpea floral development at high temperatures. *Crop science*, 29(6), 1501-1505.
- McInnis, S. M., Emery, D. C., Porter, R., Desikan, R., Hancock, J. T., y Hiscock, S. J. (2006). The role of stigma peroxidases in flowering plants: insights from further characterization of a stigma-specific peroxidase (SSP) from *Senecio squalidus* (Asteraceae). *Journal of Experimental Botany*, 57(8), 1835-1846.
- Myers, G. O. (1993). Croisement manuel du niébé. Ibadan: IITA. 19 p. (Guide de recherche de IITA, n. 42).
- Neto, O. D. S., Karsburg, I. V., y Yoshitome, M. Y. (2006). Viabilidade e germinabilidade polínica de populações de Jurubeba (*Solanum paniculatum* L.). *Revista de Ciências Agro-Ambientais, Alta Floresta*, 4(1), 67-74.
- Ng N. Q y Padulosi S. (1988). Cowpea genepool distribution and crop improvement, in *Crop Genetic Resources of Africa*, ed. by Ng Q, Perrino P

and Attere FHZ. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, 2,161-174

Ng, N. Q., Marechal, R. (1985). Cowpea taxonomy, origin and germplasm. In: Cowpea Research, Production and Utilization. Singh, S.R and K.O. Rachie (eds). John Wiley and Sons, Chichester, pp. 11-12.

Nishiyama, I., y T. Satake. (1981): High temperature damage in the rice plant. Jpn. J. Trop. Agric. 26, 19-25.

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). (2016). "Cowpea (*Vigna unguiculata*)", in *Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment, Volume 6: OECD Consensus Documents*, OECD Publishing, Paris, pp 211-241.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2011). In: P. Conforti (Ed.), *Looking Ahead in World Food and Agriculture: Perspectives to 2050*. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy www.fao.org/docrep/014/i2280e/i2280e.pdf [Consultado: 20 de septiembre de 201720]

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2016). *The State of Food and Agriculture Climate Change, Agriculture and Food Security*. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy. www.fao.org/publications/sofa/2016/en/ [Consultado: 22 de septiembre de 201720]

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2017). *Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de Frijol voluble*. <http://www.fao.org/3/a-a1359s/a1359s02.pdf>. [Consultado: 22 de noviembre de 2017]

Pachauri, R. K., Allen, M. R., Barros, V. R., Broome, J., Cramer, W., Christ, R., y Dubash, N. K. (2014). *Climate change 2014: synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (p. 151). IPCC.

- Parton, E., Vervaeke, I., Delen, R., Vandenbussche, B., Deroose, R., y De Proft, M. (2002). Viability and storage of bromeliad pollen. *Euphytica*, 125(2), 155-161.
- Parvin, K., Nahar, K., Bhuiyan, T. F., & Hasanuzzaman, M. (2020). Fabaceae Plants Response and Tolerance to High Temperature Stress. In *The Plant Family Fabaceae* (pp. 337-371). Springer, Singapore.
- Pasquet, R. S., y Padulosi, S. (2012). Genus *Vigna* and cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) taxonomy: Current status and prospects. In O. Boukar, S. Coulibaly, C. A. Fatokun, K. Lopez, & M. Tamò (Eds.), *Innovative research along the cowpea value chain. Proceedings of the fifth world cowpea conference on improving livelihoods in the cowpea value chain through advancement in science, held in Saly, Senegal, 27 September - 1 October 2010* (pp. 66-87). Ibadan, Nigeria: IITA.
- Peng, H. Z., Jin, Q. Y., Ye, H. L., y Zhu, T. J. (2015). A novel in vitro germination method revealed the influence of environmental variance on the pecan pollen viability. *Scientia Horticulturae*, 181, 43-51.
- Pereira, R. C., Davide Chamma, L., Ramalho Patto, M. A., y Andrade Bolognani, H. (2002). Alternativas para aumentar a eficiência dos cruzamentos em programas de melhoramento de *Eucalyptus*. *Cerne*, 8(2).
- Perveen, A. (2007). Pollen germination capacity, viability and Maintenance of *Pisium sativum* L papilionaceae. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 2(2), 79-81.
- Phansak, P. P., Taylor, P. W. J. y Mongkolporn, O. (2005). Genetic diversity in yard long bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) and related *Vigna species* using sequence tagged microsatellite site analysis. *Sci. Horticul.* 106(1):137-146.
- Poonia, A., Phogat, D. S., y Phougat, D. (2018). Cowpea breeding: status and perspectives. *Advances in environment and agriculture biotechnology*. 50 – 56.
- Pozzobon, M. T., Bianchetti, L. D. B., Santos, S. D., de Carvalho, S. I. C., Reifschneider, F. J. B., y Ribeiro, C. D. C. (2015). Meiotic behavior in

- accessions of *Capsicum chinense* Jacq. from the Embrapa Germplasm Bank, Brazil. *Revista Brasileira de Biociências*, 13(2), 96-100.
- Porch, T. G., Jahn, M. (2001). Effects of high-temperature stress on microsporogenesis in heat-sensitive and heat-tolerant genotypes of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Environ.* 24, 723-731.
- Powell, N., Ji, X., Ravash, R., Edlington, J., y Dolferus, R. (2012). Yield stability for cereals in a changing climate. *Functional Plant Biology*, 39(7), 539-552.
- Pushpavalli, R. (2015). *Physiological and genetic deciphering of water, salinity and relative humidity stress in chickpea (Cicer arietinum L.)* (Doctoral dissertation, Bharathidasan University, Tiruchirappalli, Tamil Nadu). 199p.
- Prasad, P.V.V., Djanaguiraman, M. (2014). Response of floret fertility and individual grain weight of wheat to high temperature stress: sensitive stages and thresholds for temperature and duration. *Funct. Plant Biol.* 41, 1261-1269
- Rachie, K. O., Rawal, K. M., Franckowiak, J. D. (1975). A rapid method for hand crossing cowpeas. Ibadan: IITA. 5 p. (IITA. Technical Bulletin, 2).
- Rawal, V., Charrondiere, R., Xipsiti, M. y Grande, F. 2019. Pulses: Nutritional Benefits and Consumption Patterns. In: Rawal, V. and Navarro, D.K eds. *The Global Economy of Pulses*. Rome. FAO. pp 9-19.
- Razzaq, M. K., Rauf, S., Khurshid, M., Iqbal, S., Javaid, A. B., Farzand, A., y Gai, J. (2019). Pollen viability an index of abiotic stresses tolerance and methods for the improved pollen viability. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 32(4), 609.
- Reguera, M., Peleg, Z., Blumwald, E. (2012). Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops. *Biocim. Biophys. Acta* 1819, 186-194.
- Rejón, J., Suárez, C., Alché, J., Castro, A., y Rodríguez-García, M. (2010). Evaluación de diferentes métodos para estimar la calidad del polen en distintos cultivares de olivo (*Olea europea* L.). *Polen*, 20, 61-72.

- Rezaie, S. F., Hajilou, J., y Nahandi, F. Z. (2011). Pollen germination and pistil performance in several Iranian peach cultivars. *International Journal of AgriScience*, 1(3), 170-177.
- Riano, R. T., y Dafni, A. (2000). A new procedure to asses pollen viability. *Sexual Plant Reproduction*, 12(4), 241-244.
- Ribeiro, G. S., Ferreira, A. F., De Lyra Neves, C. M., das Mercecirc, S., De Oliveira, C., Alves, E. M., Sousa, F.S., Sodré, G.S., y De Carvalho, C. A. L. (2013). Aspects of the floral biology and pollen properties of *Vigna unguiculata* L. Walp (Fabaceae). *African Journal of Plant Science*, 7(5), 149-154.
- Rizzardo R. A. G. (2007). O papel de *Apis mellifera* L. como polinizador da mamoneira (*Ricinis communis* L.): avalia o da eficiência de poliniza o das abelhas e incremento de produtividade da cultura. 78 f. Disserta o (Mestrado em Zootecnia III) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Rocha, F. D., Mousinho, S., Freire Filho, F. R., Silva, A. D. S., y Bezerra, A. D. C. (2001). Aspectos da biologia floral do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Reunião Nacional de Pesquisa de Pesquisa de Caupi*, 5, 27-29.
- Rosell, P., Sa co, V. G., y Herrero, M. (2006). Pollen germination as affected by pollen age in cherimoya. *Scientia horticulturae*, 109(1), 97-100.
- Ruelland, E., y Zachowski, A. (2010). How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany*, 69(3), 225-232.
- Sage, T. L., Bagha, S., Lundsgaard-Nielsen, V., Branch, H. A., Sultmanis, S., y Sage, R. F. (2015). The effect of high temperature stress on male and female reproduction in plants. *Field Crops Research*, 182, 30-42.
- Sage, T. L., Hristova-Sarkovsi, K., Koehl, V., Lyew, J., Pontieri, V., Bernhardt, P., Weston, P., Bagha, S., y Chiu, G. (2009). Transmitting tissue architecture in basal angiosperms: implications for transmitting tissue origins. *American Journal of Botany*, 96(1), 183-206.

- Saini, H. S., Sedgley, M., Aspinall, D. (1983). Effect of heat stress during floral development on pollen tube growth and ovary anatomy in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Aust. J. Plant Physiol.* 10, 137-144.
- Saini, H. S., y Aspinall, D. (1981). Effect of water deficit on sporogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Annals of Botany*, 48(5), 623-633.
- Sanchez, A. M., Bosch, M., Bots, M., Nieuwland, J., Feron, R., y Mariani, C. (2004). Pistil factors controlling pollination. *The Plant Cell*, 16(suppl 1), S98-S106.
- Sato, S., Peet, M. M., Thomas, J. F. (2000). Physiological factors limit fruit set of tomato (*Lycopersicon esculentum* mill.) under chronic, mild heat stress. *Plant Cell Environ.* 23, 719-726.
- Sato, S., Peet, M. M., Thomas, J. F. (2002). Determining critical pre- and post-anthesis periods and physiological processes in *Lycopersicon esculentum* Mill. exposed to moderately elevated temperatures. *Journal of Experimental Botany*, 53(371), 1187-1195.
- Sato, S., Kamiyama, M., Iwata, T., Makita, N., Furukawa, H., y Ikeda, H. (2006). Moderate increase of mean daily temperature adversely affects fruit set of *Lycopersicon esculentum* by disrupting specific physiological processes in male reproductive development. *Annals of Botany*, 97(5), 731-738.
- Sen, N. K., Bhowal, J. G. (1961). Genetics of *V. Sinensis* (L.) Savi. *Genetica* 32, 247-266.
- Semedo, J. N., W. P. Rodrigues, M. Q. Martins, L. D. Martins, I. P. Pais, A. P. Rodrigues, A. E. Leitão, F. L. Partelli, E. Campostrini, M. A. Tomaz, F. H. Reboredo, P. Scotti-Campos, A. I. Ribeiro Barros, F. C. Lidon, F. M. Damatta y J. Alho. (2018). Coffee responses to drought, warming and high [CO₂] in a context of future climate change scenarios. In *Theory and practice of climate adaptation* (pp. 465-477). Springer, Cham.
- Shakya, R., y Bhatla, S. C. (2010). A comparative analysis of the distribution and composition of lipidic constituents and associated enzymes in pollen and stigma of sunflower. *Sexual plant reproduction*, 23(2), 163-172.

- Shakya, R., y Bhatla, S. C. (2018). Pollination, Fertilization and Seed Development. In *Plant Physiology, Development and Metabolism* (pp. 821-856). Springer, Singapore.
- Sharma, B., y Bhatla, S. C. (2013). Structural analysis of stigma development in relation with pollen-stigma interaction in sunflower. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 208(7), 420-429.
- Shivanna, K. R., y Tandon, R. (2014). Pollen Biology. In *Reproductive Ecology of Flowering Plants: A Manual* (pp. 35-50). Springer, New Delhi.
- Shivanna, K. R. (2020). The Pistil: Structure in Relation to Its Function. In *Reproductive Ecology of Flowering Plants: Patterns and Processes* (pp. 41-50). Springer, Singapore.
- Sigrist, M. R., y Sazima, M. (2004). Pollination and reproductive biology of twelve species of neotropical Malpighiaceae: stigma morphology and its implications for the breeding system. *Annals of Botany*, 94(1), 33-41.
- Singh, B. B. (2014). Future Prospects of Cowpea. *Cowpea: The Food Legume of the 21st Century*, (cowpeathefoodle), 145-157.
- Singh, S. K., Kakani, V. G., Surabhi, G. K., y Reddy, K. R. (2010). Cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) genotypes response to multiple abiotic stresses. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 100(3), 135-146.
- Singh, B. (Ed.). (2020). *Cowpea: the food legume of the 21st century* (Vol. 164). John Wiley & Sons. 192p.
- Smýkal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M. W., y Vymyslický, T. (2015). Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 43-104.
- Snider, J. L., Oosterhuis, D. M., Skulman, B. W., Kawakami, E. M. (2009). Heat stress-induced limitations to reproductive success in *Gossypium hirsutum*. *Physiologia plantarum*, 137(2), 125-138.

- Snider, J.L., Oosterhuis, D.M., Kawakami, E.M. (2011). Diurnal pollen tube growth rate is slowed by high temperature in field-grown *Gossypium hirsutum* pistils. *J. Plant Physiol.* 168, 441-448.
- Soares, T. L., Silva, S. O., Costa, M. A. P. C., Santos-Serejo, J. A., Souza, A. D. S., Lino, L. S. M., ... y Jesus, O. N. (2008). In vitro germination and viability of pollen grains of banana diploids. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 8(2), 111-118.
- Song, G., Wang, M., Zeng, B., Zhang, J., Jiang, C., Hu, Q., Geng, G., Tang, C. (2015). Anther response to high-temperature stress during development and pollen thermo tolerance heterosis as revealed by pollen tube growth and in vitro pollen vigor analysis in upland cotton. *Planta* 241, 1271-1285.
- Sorkheh, K., Shiran, B., Rouhi, V., y Khodambashi, M. (2011). Influence of temperature on the in vitro pollen germination and pollen tube growth of various native Iranian almonds (*Prunus L. spp.*) species. *Trees*, 25(5), 809-822.
- Souza, M. D., Pereira, T. N. S., y Martins, E. R. (2002). Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener*). *Ciência e agrotecnologia*, 26(6), 1209-1217.
- Souza V.C y Lorenizi H. (2008). Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação de famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. ed.; Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 704p.
- Spinelli, F., Ciampolini, F., Cresti, M., Geider, K., y Costa, G. (2005). Influence of stigmatic morphology on flower colonization by *Erwinia amylovora* and *Pantoea agglomerans*. *European journal of plant pathology*, 113(4), 395-405.
- Suzuki, K., Tsukaguchi, T., Takeda, H., y Egawa, Y. (2001). Decrease of pollen stainability of green bean at high temperatures and relationship to heat tolerance. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126(5), 571-574.

- Suso, M. J., Bebeli, P. J., y Palmer, R. G. (2015). Reproductive biology of grain legumes. In *Grain Legumes* (pp. 365-399). Springer, New York, NY.
- Teale, W. D., Paponov, I. A., Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), 847.
- Teófilo, E. M., Paiva, J. B., y Medeiros Filho, S. (2001). Polinização artificial em feijão caupi. (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, 25(1), 220-223.
- Timko, M. P., Ehlers, J. D., y Roberts, P. A. (2007). Cowpea. In *Pulses, sugar and tuber crops* (pp. 49-67). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Todaka, D., Nakashima, K., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). Toward understanding standing transcriptional regulatory networks in abiotic stress responses and tolerance in rice. *Rice* 5, 1-9.
- Tuinstra, M.R., Wedel, J. (2000). Estimation of pollen viability in grain sorghum. *Crop Science*. 40:968-970.
- Vaknin, Y., y Eisikowitch, D. (2000). Effects of short-term storage on germinability of pistachio pollen. *Plant breeding*, 119(4), 347-350.
- Van der Walt I. D, Littlejohn G. M. (1996). Storage and viability testing of *Protea* pollen. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121:804-809.
- Van Der Walt, I. D., y Littlejohn, G. M. (1996). Storage and viability testing of *Protea* pollen. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(5), 804-809.
- Vasil, I.K. (1987). Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereals and grass crops. *J. PlantPhysiol.* 128, 193-218.
- Viéitez Cortizo, E. (1952). El uso del cloruro 2, 3, 5-trifeniltetrazolium para determinar la vitalidad del polen.

- Volk, G. M. (2011). Collecting pollen for genetic resources conservation. *Collecting plant genetic diversity: technical guidelines*, 1-10.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., y Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and experimental botany*, 61(3), 199-223.
- Wang, M. L., Hsu, C. M., Chang, L. C., Wang, C. S., Su, T. H., Huang, Y. J. J., ... y Jauh, G. Y. (2004). Gene expression profiles of cold-stored and fresh pollen to investigate pollen germination and growth. *Plant and cell physiology*, 45(10), 1519-1528.
- Warrag, M. O. A., y Hall, A. E. (1984). Reproductive responses of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) to heat stress. II. Responses to night air temperature. *Field Crops Research*, 8, 17-33.
- Massawe, F., Mayes, S., y Cheng, A. (2016). Crop diversity: an unexploited treasure trove for food security. *Trends in plant science*, 21(5), 365-368.
- Westphall, E. (1974). Pulses in Ethiopia: their taxonomy and agricultural significance. *Field Crop Abstracts* 24:213-232.
- Wheeler, T. R., Craufurd, P. Q., Ellis, R. H., Porter, J. R., Vara Prasad, P. V. (2000). Temperature variability and the annual yield of crops. *Agric. Ecosyst. Environ.*82, 159-167.
- Xiong, H., Shi, A., Mou, B., Qin, J., Motes, D., Lu, W., y Wu, D. (2016). Genetic diversity and population structure of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *PLoS One*, 11(8).
- Yan, C., Ding, Y., Wang, Q., Liu, Z., Li, G., Muhammad, I., y Wang, S. (2010). The impact of relative humidity, genotypes and fertilizer application rates on panicle, leaf temperature, fertility and seed setting of rice. *Journal of Agricultural Science*, 148, 329-339.
- Yi, W., Law, S. E., Mccoy, D., y Wetzstein, H. Y. (2006). Stigma development and receptivity in almond (*Prunus dulcis*). *Annals of Botany*, 97(1), 57-63.

Zary, K. W., Miller Junior, J. C. (1982). Comparison of two methods of hand-crossing *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Hort Science, Alexandria*, 17(2): 246-248.

**CAPITULO II: VIABILIDAD DEL POLEN DE CULTIVARES DE FRIJOL CAUPI
(*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) COLECTADO EN DOS EPOCAS A
DIFERENTES HORAS DEL DIA EN MONTERIA-CORDOBA**

**CHAPTER II: VIABILITY OF THE POLLEN FROM CAUPI BEAN CULTIVARS
(*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) COLLECTED IN TWO TIMES AT DIFFERENT
HOURS OF THE DAY IN MONTERIA-CORDOBA**

RESUMEN

El caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.), sigue siendo uno de los principales alimentos básicos y fuente económica de proteínas para millones de habitantes en muchas regiones del mundo con altos índices de pobreza. La presente investigación se realizó en la Universidad de Córdoba, el objeto de estudio fue evaluar la viabilidad de los granos de polen de tres cultivares de frijol caupí colectado a diferentes horas del día, durante los semestres A y B de 2019, para esto se sembraron 8 surcos de 10m de largo con espaciamentos de 1,2m entre surco y 0,6m entre plantas para cada cultivar. Se colectaron flores en antesis en tres y cuatro momentos diferentes (6:00am - 10:00am semestre A y 6:00am - 12:00m semestre B), cada dos horas; tomando registros de temperatura y humedad relativa al momento de cada muestreo, por 5 días con un día de por medio. Las evaluaciones de porcentaje de polen viable e inviable se realizaron usando test con acetocarmín al 1% y sal de tetrazolio al 3,0% mas 20% de sacarosa. Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x3x4 (2 test, 3 genotipos y 4 horas de colecta de polen). El polen colectado en diferentes horas del día en los genotipos evaluados acusó respuesta diferencial en los semestres A y B de 2019, el cultivar que presentó mayor porcentaje de polen viable promedio fue Caupicor 50 (93,89% y 94,61%), seguido por cultivares BRS Milenium con 91,04% y 88,36% respectivamente, L-019 con 91,86% y Missouri con 85,42%.

Palabras clave: genotipos, antesis, biología floral.

ABSTRACT

Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) Continues to be one of the main staple foods and an economic source of protein for millions of inhabitants in many regions of the world with high rates of poverty. The present research was carried out at the University of Córdoba, the object of study was to evaluate the viability of the pollen grains of three cowpea bean cultivars collected at different times of the day, during semesters A and B of 2019, for this, 8 were planted 10m long rows with 1.2m spacing between rows and 0.6m between plants for each cultivar. Flowers were collected in anthesis at three and four different times (6:00 - 10:00 am semester A and 6:00 am - 12:00m semester B), every two hours; taking records of temperature and relative humidity at the time of each sampling, for 5 days. The evaluations of the percentage of viable and non-viable pollen were carried out using tests with acetocarmine at 1% and tetrazolium salt at 3.0% plus 20% sucrose. A completely randomized design with a 2x3x4 factorial arrangement (2 tests, 3 genotypes and 4 hours of pollen collection) was used. The pollen collected at different times of the day in the genotypes evaluated showed a differential response in semesters A and B of 2019, the cultivar that presented the highest percentage of average viable pollen was Caupicor 50 (93.89% and 94.61%), followed by BRS Milenium cultivars with 91.04% and 88.36% respectively, L-019 with 91.86% and Missouri with 85.42%.

Keywords: genotypes, anthesis, flower biology.

1. INTRODUCCIÓN

La viabilidad del polen y la receptividad del estigma en el momento de la polinización son requisitos críticos para el inicio eficaz de la interacción polen-pistilo (Shivanna, 2020). El polen es principalmente el vehículo de transporte del gameto masculino, además de ser la fuente más importante de proteínas para visitantes florales y polinizadores (Agostini et al., 2014). Sin embargo, también contiene azúcares, lípidos y fósforo, entre otras sustancias importantes para la supervivencia de los visitantes florales (Willmer, 2011). La calidad del polen expresada por la viabilidad es extremadamente importante para el éxito reproductivo sexual de las especies de plantas, ya que no pueden elegir directamente a sus parejas reproductoras (Oliveira y Maruyama, 2014), y cuanto mayor es la viabilidad, la longevidad y la germinación del polen, mayor es la variabilidad genética de una especie (Akoroda, 1983).

El estudio de viabilidad del polen se usa en el mejoramiento de plantas de varias especies debido a la facilidad, rapidez, bajo costo y confiabilidad de la técnica. El genotipo de un individuo proviene de un gameto masculino y uno femenino; por tanto, entre más viable el polen, la probabilidad de obtener diferentes combinaciones de alelos y variabilidad genética es mayor (Souza et al., 2002). El conocimiento de la tasa de germinación y la viabilidad del polen son importantes para planificar programas de mejoramiento genético dirigidos a producir híbridos (Souza et al., 2017). Estudios han demostrado que la tolerancia de una planta a altas temperaturas se pueden registrar diferentes parámetros (Wahid et al., 2007), como la termoestabilidad de la membrana celular, la actividad fotosintética, la viabilidad del polen y el cuajado. Los genotipos tolerantes a altas temperaturas mantienen un mayor nivel de viabilidad del polen mayor que los genotipos sensibles (Dane et al., 1991).

La viabilidad del polen es la capacidad del polen para realizar su función de entregar gametos masculinos funcionales en el estigma receptivo compatible (Shivanna, 2020), para completar los eventos posteriores a la polinización y efectuar la fertilización (Shivanna y Rangaswamy, 1992). La viabilidad del polen se puede determinar mediante diversas técnicas. Estos pueden agruparse en métodos directos como la germinación *in vitro* (Parton et al., 2002; Kumari et al., 2015; Souza et al., 2015) y la germinación *in vivo* (Souza et al., 2015), o métodos indirectos basados en parámetros como como tinción citológica (Kumari et al., 2015; Souza et al., 2015).

Según Techio et al. (2006), no hay una descripción de una prueba universal de la viabilidad del polen que use una tintura específica. Dada la conexión directa con la eficiencia de la fecundación y su contribución a los estudios taxonómicos, ecológicos y palinológicos es importante verificar la viabilidad del polen. Estos estudios también proveen información para su aplicación práctica en la conservación y mejoramiento de plantas (Auler, 2004).

La presente investigación tiene como objetivo de evaluar la viabilidad de los granos de polen de tres cultivares de frijol caupí colectado a diferentes horas del día, durante los dos semestres de 2019 en Montería, Córdoba.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1. LOCALIZACIÓN

La investigación se llevó a cabo en la granja experimental de la Facultad de Ciencias Agrícolas, de la Universidad de Córdoba, en Montería - Córdoba, cuyas coordenadas geográficas son 8° 45' N y 75° 53' W, una altitud de 15 m.s.n.m. Su clasificación climatológica corresponde a bosque seco tropical, con temperatura media de 27,4 °C, precipitación por año de 1346 mm, humedad relativa de 85% y brillo solar de 2108 horas solar anual (Palencia et al., 2006).

2.2. VARIABLES E INDICADORES

2.2.1. Variables dependientes. Corresponden a las variables que han sido definidas para llevar a cabo la investigación:

- Porcentaje de polen viable (PPV) (%)
- Porcentaje de polen inviable (PPI) (%)

2.2.2. Variables independientes. Corresponden a los cultivares evaluados:

- Semestre A: Caupicor 50, L-019 y BRS Milenium
- Semestre B: Caupicor 50, Missouri y BRS Milenium

2.3. PROCEDIMIENTO

La presente investigación se desarrolló en dos épocas: primer semestre (abril y mayo) y segundo semestre (noviembre y diciembre) de 2019; se sembraron parcelas de ocho (8) surcos de 10,0m de largo, con 1,2m entre surco y 0,6m entre

plantas para cada uno de los cultivares a evaluar; en cada genotipo se sembraron dos surcos con intervalos de 3 días hasta completar los 8 surcos.

Una vez en floración los genotipos considerados, se colectaron flores en antesis para la extracción del polen de 6:00 – 10:00am en el semestre A y de 6:00am – 12:00m en el semestre B, cada dos horas y se evaluó la viabilidad utilizando los siguientes métodos: test con acetocarmin y sal de tetrazolium, se colectaron muestras durante 5 días con un día de por medio; se tomaron registros de temperatura y humedad relativa para cada hora de colecta, utilizando un termo higrómetro.

2.3.1. Viabilidad con acetocarmín. Se llevo a cabo utilizando acetocarmín al 1,0% (p/v) (preparado con indigocarmin) (Lyra et al., 2011), y consistio en recolectar tres (3) flores en recién antesis en tes (3) plantas por cada genotipo para los tres y cuatro momentos considerados en cada semestre. Las flores en recién antesis se transportaron al laboratorio de Fitomejoramiento de la Facultad de Ciencias Agrícolas, en bolsas de papel. Para la extracción del polen inicialmente se eliminaron los pétalos de cada flor y se depositaron en cajas de petri esterilizadas y previamente identificadas; seguidamente se extrajo el polen realizando vibraciones en las anteras con una aguja de disección y posteriormente se procedió a realizar el montaje en portaobjetos previamente identificados, colocando una a dos gotas de acetocarmín y seguidamente se colocó la muestra de granos de polen y el cubre objeto; se esperó un minuto, después se contaron más de 80 granos al azar por portaobjetos usando un microscopio óptico marca Leica (Modelo D500) utilizando el objetivo de 4X y una técnica de exploración de portaobjetos. Los granos de polen que se tornaron de color azul se consideraron viables y los granos no coloreados como no viables.

2.3.2. Viabilidad con sal de tetrazolium. Este método nos permite determinar la viabilidad del polen y la longevidad del polen a lo largo del desarrollo de la flor.

Se recolectaron tres (3) flores en recién anthesis en tres (3) plantas por cada genotipo para los tres y cuatro momentos considerados en cada semestre. Para la extracción de los granos de polen se siguió el mismo procedimiento que se usó con el método de acetocarmin. El montaje se hizo en portaobjetos previamente identificados, colocando una a dos gotas de 2,3,5-trifenil tetrazolio cloruro a una concentración 3,0% (p/v) más sacarosa al 20% (p/v) (Singh et al., 2010), seguidamente se colocó la muestra de granos de polen y se procedió a colocar el cubreobjeto; las muestras se pusieron a incubar a 30°C por 60 minutos en ausencia de luz, posteriormente se contaron mínimo de 80 granos al azar por portaobjetos usando un microscopio óptico marca Leica (Modelo DM500), utilizando el objetivo de 4X y una técnica de exploración de portaobjetos. Los granos de polen que se tornaron de color rojo o violeta se consideraron viables y los que no se colorearon son no viables (Shivanna y Rangaswamy, 1992).

Para el test con acetocarmin y tetrazolium en los genotipos evaluados, se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x3x4 (2 test, 3 genotipos y 4 horas de colecta de polen) para cada día de evaluación (5 días), con tres repeticiones (3 plantas); tomando como variable de respuesta el porcentaje de polen viable y no viables.

2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron análisis de varianza y pruebas de separación de medias según Tukey para las variables en estudio. Además, se realizaron análisis de correlación de Spearman para las variables respuesta con la temperatura y humedad relativa, utilizando el paquete estadístico de SAS, versión 9.4.

Para los análisis de las variables porcentaje polen viables (PPV) y porcentaje polen inviables (PPI); se hicieron transformaciones estadísticas para cada

muestreo, dado que no se cumplieron los supuestos estadísticos, como se describe a continuación:

- Para la variable PPV, se utilizó estadística no paramétrica según el método de Kruskal-Wallis (1952): transformación por rangos en los dos semestres, excepto para la segunda y tercera evaluación en el segundo semestre de 2019 (Datos Originales).
- PPI, se usó transformación logarítmica $\text{Log}(Y+0,5)$, para los dos semestres de 2019.
- Las tablas de pruebas de media contienen los datos originales, y la significancia corresponde al análisis tenido en cuenta, de acuerdo a lo descrito anteriormente.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

El alto rendimiento de los cultivos también depende de la viabilidad del polen y tiene una importancia primordial en el programa de hibridación (Patel y Mankad, 2014). Conocer la viabilidad del polen en frijol caupí, es un aspecto importante en la biología reproductiva de dicha especie, los cuales son indispensables para ser utilizados en las polinizaciones, y poder aumentar la posibilidad de éxito de la fecundación.

Los resultados del análisis de varianza del estudio sobre la viabilidad de polen de *V. unguiculata* a diferentes horas del día, usando acetocarmin y sal de tetrazolio en los tres genotipos se muestran en la tabla 1 y 2. En las diferentes evaluaciones acusaron diferencias estadísticas para los test utilizados en la variable porcentaje de polen viable (PPV) y para porcentaje de polen inviable (PPI), excepto en la evaluación cuatro para PPI en el semestre 2019A y para PPV y PPI en la evaluación uno en el semestre 2019B; lo anterior denota que cada test presenta diferentes modos de acción para determinar la viabilidad de polen, Coelho et al. (2012) plantea que las diferencias entre los test de evaluación obedecen al modo de acción de cada método en la estructura citológica de los granos de polen.

El análisis de varianza en los dos semestres de 2019 muestra que los coeficientes de variación para las variables de respuesta PPV y PPI oscilaron entre 43,14% a 57,90% y 45,46% a 53,36% para el primer semestre y entre 4,84% a 44,89% y 53,63% a 68,41% en el segundo semestre (Tabla 1 y 2). Estos resultados divergen con respecto a lo reportado por Arenas de Souza et al. (2014), utilizando tres métodos (Orceina acética, lugol y acetocarmin) para viabilidad del polen entre individuos de *Tabebuia impetiginosa* y *Tabebuia chrysotricha*, el coeficiente de variación para acetocarmin oscilo entre 5,03% y 11,66% y puede ello, estar sustentado en los efectos ambientales, como el tamaño de muestra usada.

Tabla 1. Cuadrados medios del análisis de varianza para porcentaje de polen viable (PPV) y polen inviable (PPI), colectado a diferentes horas del día en tres cultivares de frijol caupí. Montería, 2019A

FUENTE DE VARIACION	G.L	EVALUACION 1		EVALUACION 2		EVALUACION 3		EVALUACION 4		EVALUACION 5	
		PPV	PPI	PPV	PPI	PPV	PPI	PPV	PPI	PPV	PPI
TEST	1	2507,85**	15,93**	1722,68**	8,19**	2440,16**	8,52**	1350,00*	2,39ns	2041,18**	7,42**
HORA	2	128,76ns	0,53ns	217,68ns	0,88ns	683,18*	1,40ns	353,29ns	1,80ns	88,29ns	0,13ns
GENOTIPO	2	154,68ns	0,62ns	1022,88**	3,22*	1105,18**	2,89**	111,5ns	0,75ns	14,76ns	6,4x10 ⁻³ ns
TEST*HORA	2	1205,69**	6,01**	179,61ns	0,90ns	145,54ns	0,26ns	89,34ns	0,69ns	172,67ns	0,83ns
TEST*GENOTIPO	2	310,31ns	1,39ns	15,57ns	0,46ns	20,84ns	0,02ns	17,34ns	0,12ns	118,17ns	0,17ns
HORA*GENOTIPO	4	215,92ns	1,76*	261,84ns	1,04ns	293,48ns	1,02ns	731,72*	2,72*	88,61ns	0,21ns
TEST*HORA*GENOTIPO	4	263,51ns	2,30*	283,16ns	2,11*	104,22ns	0,54ns	151,3ns	0,50ns	198,30ns	0,32ns
ERROR	36	140,75	0,65	175,83	0,68	143,31	0,51	196,59	0,75	253,57	0,88
TOTAL	53										
\bar{X}		27,50	1,76	27,50	1,82	27,50	1,37	27,50	1,51	27,50	1,82
C.V. (%)		43,14	45,91	48,21	45,46	43,50	52,23	50,98	53,36	57,90	51,48
R²		0,61	0,67	0,51	0,56	0,60	0,56	0,459	0,44	0,30	0,27

*: significativo con $p \leq 0,05$; **: altamente significativo con $p \leq 0,001$; ns: no significativo con $p \leq 0,05$; G.L: Grados de libertad; CV: coeficiente de variación.

Tabla 2. Cuadrados medios del análisis de varianza para porcentaje polen viable (PPV) e inviable (PPI) en tres cultivares de frijol caupí. Montería, 2019B

FUENTE DE VARIACION	G.L.	EVALUACION 1		EVALUACION 2		EVALUACION 3		EVALUACION 4		EVALUACION 5	
		PPV	PPI								
TEST	1	280,05ns	3,00ns	329,38**	12,13**	235,80**	4,29*	7140,12**	26,34**	5635,68**	25,19**
HORA	3	246,16ns	1,86ns	32,82ns	0,55ns	129,17**	1,20ns	1210,39**	5,24**	2448,80**	13,43**
GENOTIPO	2	6575,01**	29,03**	223,81*	7,83**	1245,70**	27,25**	851,44ns	3,71*	1450,69**	3,81*
TEST*HORA	3	1256,03**	7,01**	29,14ns	0,99ns	86,29**	2,71*	215,50ns	1,52ns	478,13ns	4,06**
TEST*GENOTIPO	2	201,92ns	1,74ns	12,29ns	0,50ns	100,54**	1,30ns	539,26ns	1,21ns	8,19ns	0,02ns
HORA*GENOTIPO	6	369,30ns	1,78ns	60,70ns	0,88ns	106,60**	2,03*	180,17ns	1,28ns	223,96ns	0,91ns
TEST*HORA*GENOTIPO	6	426,60*	2,74*	39,57ns	1,15ns	17,04ns	0,46ns	468,66ns	2,01ns	192,46ns	0,62ns
ERROR	48	162,36	0,96	44,09	1,07	19,77	0,67	268,50	0,93	233,64	0,85
TOTAL	71										
\bar{X}		36.50	1,61	92,86	1,51	91,85	1,52	36,50	1,47	36,50	1,72
C.V. (%)		34.91	60,59	7,15	68,41	4,84	54,09	44,89	65,58	41,87	53,63
R²		0.74	0,71	0,42	0,47	0,81	0,73	0,58	0,63	0,63	0,69

*: significativo con $p \leq 0,05$; **: altamente significativo con $p \leq 0,001$; ns: no significativo con $p \leq 0,05$; G.L: Grados de libertad; CV: coeficiente de variación.

Schimitt et al. (2015), evaluaron la viabilidad del polen en tres poblaciones de *B. orellana* con los colorantes acetocarmín, lugol y reactivo de Alexander, reportando coeficientes de variación de 6,87% para porcentaje de polen viable. De igual manera contrastan con Damasio et al. (2016), quienes evaluaron la viabilidad polínica del tulipan africano, con las pruebas de germinación, tetrazolium (0.30 y 0.075%) y rosa de bengala, registrando un coeficiente de variación de 4,54% para porcentaje de viabilidad.

De acuerdo con los promedios consignados en la tabla 3 y 4, en la tinción con acetocarmin se registró un alto índice de granos de polen coloreados, presentándose los mayores promedios para porcentaje de polen viable, oscilando entre 94,08% y 96,73% para 2019A y entre 93,10% y 96,35% para 2019B; estos resultados concuerdan con los reportados por Nameirakpam y Khanna (2018), en estudios de cruzamientos de *V. unguiculata*, reportando valores entre 90,35% y 96,79% de viabilidad con la prueba de acetocarmin. Así mismo son similares a los reportados por Crespo et al. (2018), en frijol tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray.) donde los valores obtenidos de viabilidad de polen con acetocarmin fueron superiores al 90,0%; Marak y Wani (2018), encontraron porcentaje máximo de viabilidad de polen de 87,50%, en *Gliricidia sepium* (fabaceae). Así mismo, Tondonba et al. (2018), con la misma prueba reporta valores en caupí de 84,03% y 94,06% de polen viable.

La prueba con la sal de tetrazolio indicó la presencia de 85,20% a 93,26% de polen viable en las evaluaciones para el primer semestre y 76,78% al 90,72% en el segundo semestre a través de la tinción roja de los granos de polen (Tabla 3 y 4). Los resultados anteriores concuerdan con los reportados por Munhoz et al. (2008) en estudio de la viabilidad del polen de papaya donde utilizaron varios test y los porcentajes más bajos los obtuvieron con la sal de tetrazolio. Varios autores sostienen que la prueba con tetrazolio es una estimación confiable de la viabilidad del polen, que se acerca a la proporcionada por las pruebas de germinación *in*

vitro (Bolat y Pirlak, 1999; Huang et al., 2004). Shekari et al. (2016), encontraron que el coeficiente de correlación de Pearson mostró que la viabilidad del polen con tetrazolio tuvo una correlación positiva significativa con la germinación del polen. La prueba con acetocarmin, aunque es una técnica muy atractiva debido a su simplicidad y velocidad, sobrestima fuertemente la viabilidad del polen en comparación con los resultados obtenidos con la prueba de tetrazolio (Rodríguez y Dafni, 2000). Esto podría atribuirse al hecho de que estos ensayos con acetocarmin prueban principalmente la integridad del plasmalema de la célula del polen (De Jesús et al., 2018a), mientras que la sal de tetrazolium determina la actividad enzimática de las deshidrogenasas (un grupo importante de enzimas en el ciclo respiratorio) en el citoplasma del polen (Shivanna y Tandon, 2014). Así mismo Capitani et al. (2018), en estudio de diferentes colorantes para viabilidad de polen en *Bauhinia forficata* (Fabaceae), que, debido a la capacidad de detectar la actividad enzimática involucrada en el proceso de respiración, se recomienda el de la sal de tetrazolium para determinar la viabilidad del polen en dicha especie. De acuerdo con Shekari et al. (2016), en trabajos realizados en *Leonurus cardiaca* observaron diferencias significativas entre la sal de tetrazolium y el acetocarmin.

Tabla 3. Promedios para porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) de frijol caupí, mediante el uso de acetocarmin y sal de tetrazolio. 2019A

TEST	EVAL 1		EVAL 2		EVAL 3		EVAL 4		EVAL 5	
	PPV	PPI	PPV	PPI	PPV	PPI	PPV	PPI	PPV	PPI
AC	94,08a	5,92b	94,91a	5,09b	96,73a	3,27b	95,49a	4,51a	94,36a	5,64b
TZ	87,21b	12,79a	85,20b	14,81a	93,26b	6,75a	92,16b	7,84a	89,25b	10,75a

Literales diferentes entre filas indican diferencia estadística entre medias ($P < 0,05$) según Tukey. AC: Acetocarmin; TZ: tetrazolium; EVAL: Evaluación.

Aunque los métodos de tinción ofrecen la posibilidad de distinguir el polen fresco abortado y no abortado, a menudo no logran discriminar diferentes niveles de viabilidad (Ge et al., 2011).

Tabla 4. Promedios para porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) de frijol caupí, mediante el uso de acetocarmin y sal de tetrazolio. 2019B

TEST	EVAL 1		EVAL 2		EVAL 3		EVAL 4		EVAL 5	
	PPV	PPI	PPV	PPI	PPV	PPI	PPV	PPI	PPV	PPI
AC	93,10a	6,90a	95,00a	4,99b	93,66a	6,33b	96,35a	3,64b	95,47a	4,52b
TZ	79,28a	20,71a	90,72b	9,27a	90,05b	9,95a	84,20b	15,80a	76,78b	23,21a

Literales diferentes entre filas indican diferencia estadística entre medias ($P < 0,05$) según Tukey. AC: Acetocarmin; TZ: tetrazolium; EVAL: Evaluación.

Estudios realizados por Kumary et al. (2017), utilizando varias pruebas para viabilidad de polen en *Humboldtia Vahliana* Wight. (Fabaceae), reportan 84,66% y 85,76% de viabilidad con acetocarmin y tetrazolio respectivamente; así mismo De Jesús et al. (2018b), al evaluar la viabilidad de polen de nueve genotipos de *P. lunatus* con cuatro tipos diferentes de colorantes, encontraron una viabilidad superior al 80% utilizando acetocarmín, orceína, lugol y fucsina; Mohammed et al. (2020), utilizando acetorceina al 1%, reporta un 97,7% de viabilidad en tres variedades de *Vigna unguiculata*. Sin embargo, muchos autores citan la tendencia de las pruebas colorimétricas a sobreestimar la viabilidad del polen de algunas especies, sugiriendo que se combinen con otros métodos de determinación, como las pruebas de germinación *in vitro* y estabilidad meiótica, entre otros, con el objetivo de eliminar lo intrínseco (Munhoz et al., 2008; Arenas et al., 2014; Nascimento et al., 2015; Davide et al., 2009). Hister y Tedesco (2016), manifiestan que es importante probar varios tipos de tintes, con el fin de encontrar el más apropiado para cada especie estudiada, ya que no existe en la literatura una prueba de viabilidad general que utilice solo un determinado tinte. Se ha demostrado que tinciones como Alexander's, acetocarmin, aniline blue y X-gal son identificadores exitosos de viabilidad para relativamente pocas especies o bajo condiciones especializadas (Rodríguez-Riano y Dafni, 2000).

Para las diferentes horas del día de colecta de las estructuras florales en antesis, el porcentaje de viabilidad no se vio afectado significativamente por los tiempos de recolección, solo se observaron diferencias estadísticas en la evaluación tres para PPV en el primer semestre de 2019, indicando con esto que bajo las condiciones variantes de temperatura promedio (27,3°C– 34,7°C) y humedad relativa (91,6% - 60%) entre las 6:00am y 10:00am (Anexo 1), para ese periodo, las horas evaluadas no afectaron la viabilidad del polen; caso contrario se registró en las evaluaciones de 2019B, donde se precisan diferencias estadísticas en las evaluaciones tres, cuatro y cinco para PPV y PPI, excepto para PPI en la evaluación tres (Tabla 2); donde hubo registros de temperatura de 42,0°C (eval 3), 44,0 °C (eval 4) y 32,8 °C (eval 5) (Anexo 2), por tanto bajo las condiciones de evaluación para dicho semestre, en donde se registraron variaciones promedios de temperatura (27,3°C – 39,3°C) y humedad relativa (85,2 – 45,4%) entre las 6:00am y 12:00m (Anexo 2), la hora de colecta del polen afecta diferencialmente la viabilidad del polen. Según Ribeiro et al. (2013), el polen de frijol caupí puede permanecer viable durante aproximadamente 42 horas después de la antesis, dependiendo de la temperatura del aire y la humedad relativa; lo cual es un factor clave para el éxito de las hibridaciones que incluye la capacidad de la planta donante para producir polen viable y la duración de la viabilidad (Ting et al., 2014). La temperatura superior a óptima disminuye la viabilidad del polen, afectando la microsporogenesis, la retención de polen en las anteras y la germinación del polen, cuando la temperatura fue mayor o igual a 32 °C en varias especies de cultivos (Razzaq et al., 2019).

Los promedios para las diferentes evaluaciones, en general se registran los mayores valores para PPV en la colecta realizada a las 6:00am, a excepción de la evaluación cuatro para 2019A (Tabla 5) durante esta hora la temperatura media no supera los 28°C (Anexo 1) y las respuestas reproductivas de las plantas no se ven afectadas significativamente; para las evaluaciones realizadas en 2019B, los promedios superiores para PPV se registran a las 6:00am en la evaluación uno y

tres, así mismo en la evaluación dos y cuatro se presentó a las 10:00am; en tanto que la evaluación quinta el mayor promedio para PPV se registró a las 8:00am (Tabla 6), la variación en los promedios puede obedecer a muestras de flores con polen inmaduro o por causa de los efectos fluctuantes de temperatura y humedad relativa durante la evolución para este semestre, registrándose temperaturas que oscilaron entre 25,0°C a 44,0°C (Anexo 2), que inciden en la viabilidad del polen. Temperaturas superiores a 30°C disminuyen la concentración de azúcares solubles en las paredes de las anteras de los granos de polen en desarrollo y maduros de caupí y soja (Suzuki et al., 2001), en tomate revelan que el contacto continuo de la planta a alta temperatura (32/26 °C) redujo la concentración de almidón y también disminuyó los azúcares solubles en los granos de polen y las paredes de las anteras (Pressman et al., 2002). Estudios realizados en *Vigna radiata* por Kaur et al. (2015), revelan que los granos de polen se volvieron menos viables y menos vigorosos en las plantas con estrés por calor, lo que comprometió su capacidad para fertilizar los óvulos y resultó en el aborto de las flores; así mismo Firon et al. (2012), reportan que el polen es específicamente susceptible a baja humedad relativa.

Tabla 5. Promedios para porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) de frijol caupí, colectado a diferentes horas de día. 2019A

HORA COL.	EVAL 1		EVAL 2		EVAL 3		EVAL 4		EVAL 5	
	PPV	PPI	PPV	PPI	PPV	PPI	PPV	PP1	PPV	PPI
6 am	91,68a	8,32a	94,63a	5,37a	96,73a	3,27a	94,34a	5,66a	91,67a	8,33a
8 am	89,13a	10,87a	89,75a	10,26a	95,02ab	4,98a	92,28a	7,72a	92,07a	7,93a
10 am	91,14a	8,86a	85,78a	14,22a	93,23b	6,77a	94,84a	5,16a	91,67a	8,33a

Literales diferentes entre fila indican diferencia estadística entre medias ($P < 0,05$) según Tukey.

Los resultados de la presente investigación concuerdan con estudios realizados en *Vigna unguiculata* sub sp. *sesquipedalis* por Merin et al. (2019), encontrando que

la viabilidad del polen más alta se observó durante las 7:30am; coincidiendo con el inicio de la anthesis en las condiciones de estudio, según observaciones en campo.

Es importante resaltar que durante las cinco evaluaciones que fueron equivalentes a nueve días en total (iniciando con el 50% de floración en todos los genotipos), el porcentaje de polen viable con la prueba de acetocarmin fue superior al 93,0%; entre tanto con la prueba de tetrazolio fue superior a 76,0% en las dos épocas evaluadas (Tabla 3 y 4); por lo que ambos registros resultan interesantes para realizar hibridación artificial.

Tabla 6. Promedios para porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) de frijol caupí, colectado a diferentes horas de día. 2019B

HORA COL.	EVAL 1		EVAL 2		EVAL 3		EVAL 4		EVAL 5	
	PPV	PPI	PPV	PPI	PPV	PPI	PPV	PP1	PPV	PPI
6 am	93,87a	6,12a	92,50a	7,50a	95,19a	4,81a	95,41ab	4,58ab	61,77b	38,22a
8 am	84,06a	15,93a	93,89a	6,10a	92,17ab	7,82a	93,37ab	6,62ab	95,04a	4,95b
10 am	90,52a	9,47a	93,96a	6,03a	91,38ab	8,61a	97,07a	2,92b	94,78a	5,21b
12 m	76,30a	23,69a	91,11a	8,88a	88,68b	11,31a	75,23b	24,76a	92,91a	7,08b

Literales diferentes entre fila indican diferencia estadística entre medias ($P < 0,05$) según Tukey.

Los estudios que evalúan el porcentaje de viabilidad del polen en diferentes momentos durante el desarrollo de la flor son importantes en los procesos de hibridación artificial (Costa et al., 2009), ya que revelan el mejor momento para recolectar los granos de polen. Sin embargo, en este estudio se observó que para *Vigna unguiculata*, los granos de polen se pueden recolectar en cualquier momento, ya que la viabilidad del polen fue superior al 70% en todo momento, durante las evaluaciones.

Para el factor genotipo, solo las evaluaciones dos y tres, manifiestan diferencias estadísticas para PPV y PPI en el experimento evaluado en 2019A (Tabla 1). En

las evaluaciones para 2019B, se registran diferencias estadísticas, excepto para PPV en la evaluación cuatro (Tabla 2); el efecto diferencial puede obedecer a las características propias del polen de cada genotipo ante las condiciones que prevalecieron en temperatura y humedad relativa en las diferentes horas del día, que pudieron incidir en la viabilidad del polen (Anexo 1 y 2). Según Zanotto et al. (2009), la viabilidad del grano de polen puede variar ampliamente dentro de la misma especie con diferentes genotipos y ser indicativa de diferencias genotípicas e igualmente dentro de un mismo genotipo, dependiendo del estado de desarrollo de la flor, pequeña, mediana o grande. Estudios realizados por Singh et al. (2010), en frijol caupí encontraron que altas temperaturas causaron una disminución significativa en la producción de polen en un 31%, lo que compromete la producción de semillas.

De acuerdo con los promedios de las evaluaciones realizadas en 2019A, se observó poca variación para PPV entre los genotipos, lo que concuerda con lo reportado por Rangkham y Khanna (2018), en evaluaciones de diferentes accesiones de caupí. Sin embargo, se destacan los promedios superiores para PPV en la evaluación dos para el genotipo Caupicor 50 y en la evaluación tres para L-019; lo anterior contrasta con el resto de las evaluaciones donde existe igualdad estadística en los promedios para PPV (Tabla 7).

Tabla 7. Promedios para porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) en tres genotipos de frijol caupí. 2019A

GENO- TIPO	EVAL 1		EVAL 2		EVAL 3		EVAL 4		EVAL 5	
	PPV	PPI	PPV	PPI	PPV	PPI	PPV	PPI	PPV	PPI
CAUP.50	90,77a	9,23a	95,61a	4,39b	95,13b	4,88ab	95,37a	4,63a	92,57a	7,43a
BRS M.	90,42a	9,58a	89,37b	10,63a	92,81b	7,19a	92,02a	7,98a	90,60a	9,40a
L-019	90,76a	9,24a	85,18b	14,83a	97,05a	2,95b	94,07a	5,93a	92,23a	7,77a

Literales diferentes entre filas indican diferencia estadística entre medias ($P < 0,05$) según Tukey. Caup.50: Caupicor 50; BRS M.: BRS Milenium

Es importante resaltar que los genotipos Caupicor 50 y L-019, provienen de una población criolla de la región, y por ende es posible que fuertes variaciones de temperatura y humedad relativa no generen efectos adversos a la viabilidad de polen, por su adaptación a las condiciones del estudio.

Las evaluaciones realizadas en el segundo semestre de 2019, se destaca el genotipo Caupicor 50 con los mayores promedios para PPV, en comparación con los genotipos BRS Milenium y Missouri (Tabla 8), lo cual puede obedecer a que este cultivar proviene de la población que se siembra en la región y no es afectado por la variación de la temperatura y la humedad relativa registradas durante la investigación (Anexo 2). Sin embargo, Shivanna y Rangaswamy (1992), informa que, en el período de floración, los cambios ambientales y las diferencias genotípicas pueden contribuir a la variación en la tasa de viabilidad del polen. Willmer (2011), sustenta que muchos factores afectan la viabilidad del polen en condiciones naturales; el grano de polen en su formación tiende a almacenar carbohidratos como granos de almidón, cuando el almidón se hidroliza y los niveles de azúcar aumentan, los granos de polen se vuelven más resistentes a la ganancia y pérdida de agua. Estudios realizados por Jiang et al. (2019), donde sometieron a dos cultivares de *Pisum sativum* (Fabaceae) a estrés por altas temperatura y encontraron que después de 4 días a 35 °C, la viabilidad del polen en los botones florales disminuyó en el cultivar "CDC Golden", pero no en "CDC Sage".

La esterilidad del polen por estrés por sequía se ha investigado a nivel molecular, mostrando que los genotipos susceptibles tenían una alta expresión de genes de anteras carentes de carbono, mientras que los genotipos tolerantes mostraron una alta expresión de genes de transportador de azúcar y de invertasa de la pared celular (Li et al., 2015); es posible que genotipo Caupicor 50 este provisto mayormente de genes transportadores de azúcar en comparación con los demás cultivares en estudio.

Tabla 8. Promedio de cinco evaluaciones para porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) en tres genotipos de frijol caupí. 2019B

GENO- TIPO	EVAL 1		EVAL 2		EVAL 3		EVAL 4		EVAL 5	
	PPV	PPI	PPV	PPI	PPV	PPI	PPV	PPI	PPV	PPI
CAUP.50	98,52a	1,47b	94,55a	5,45b	97,65a	2,35c	95,03a	4,96b	87,30a	12,69b
BRS M	77,37b	22,62a	94,70a	5,29b	94,13b	5,86b	91,51ab	8,48ab	84,07ab	15,92ab
MISSO	82,68b	17,32a	89,34b	10,65a	83,79c	16,20a	84,27b	15,72a	87,00b	12,99a

Literales diferentes entre filas indican diferencia estadística entre medias ($P < 0,05$) según Tukey. CAUP. 50: Caupicor 50; BRS M: BRS Milenium; MISSO: Missouri

En las plantas que se autopolinizan como el frijol caupí, el polen no tiene que transportarse muy lejos para polinizar y, por lo tanto, no necesita sufrir una deshidratación severa en la madurez. Estas plantas producen granos de polen recalcitrantes que se dispersan con un alto contenido relativo de agua (30 - 70%) (Pacini y Dolferus, 2016). Los granos de polen recalcitrantes son sensibles a la deshidratación y, por lo general, tienen una vida muy corta y son muy sensibles a la variación de la humedad relativa del aire (Franchi et al., 2011). Sin embargo, investigaciones demuestran que la prolina desempeña un papel en la protección del polen del daño inducido por el calor en la germinación. En el caupí, el polen sano tiene grandes cantidades de prolina y justo antes de la antesis, la prolina constituye el 55% de aminoácidos en las anteras y los granos de polen (Razzaq et al., 2019).

Es importante resaltar que existen varios factores tanto ambientales como las características propias de cada genotipo, que hacen que se reflejen en la calidad del polen; por tanto, como se mencionó anteriormente la viabilidad del polen de los diferentes genotipos en semestre A de 2019, tan solo experimento variación estadística en dos evaluaciones, lo cual obedece, que para esta evaluación se consideraron dos genotipos (Caupicor 50 y L-019) originados producto de la selección de una población que se cultiva en la región por muchos años y el porcentaje de polen viable es poco afectado por las condiciones predominantes;

en tanto que, para el semestre B, se incluyó el genotipo Missouri (recién introducido de EE.UU), en reemplazo de L-019, por lo que junto al BRS Milenium, que también es introducido, los cambios o variaciones de temperatura y humedad relativa afectan negativamente la viabilidad del polen.

El análisis de varianza para la interacción de los test evaluados con las diferentes horas de colecta, muestra diferencias significativas en la evaluación uno para las dos variables en consideración (PPV y PPI) en 2019A (Tabla 1), en tanto que las evaluaciones realizadas para el segundo semestre de 2019, las evaluaciones uno y tres muestran diferencias estadísticas para PPV y PPI, así mismo en la evaluación cinco para PPI (Tabla 2); indicando con ello que la clasificación de los test, cambio en función de la hora de colecta del polen en dichas evaluaciones, por tanto, para PPV en el semestre A el acetocarmin fue superior a las 6:00 y 10:00 am (Tabla 9) y para el semestre B fue superior la prueba con tetrazolio a las 6:00 am en la evaluación uno; la prueba con acetocarmin presento el promedio más alto a las 12:00 m en la evaluación uno y a las 8:00 am, 10:00 am y 12:00 m en la evaluación tres, asimismo en la evaluación cinco fue superior a las 6:00, 8:00 y 10:00 am (Tabla 10).

De acuerdo con los resultados obtenidos de la interacción test con la hora de colecta, en las evaluaciones uno, tres y cinco para el segundo semestre, se observan promedios para PPV que oscilaron entre a 91,25% a 98,02% con la prueba de acetocarmin (Tabla 10), resultados que concuerdan con los obtenidos por Bispo et al. (2020) en *Erythrina fusca* (Fabaceae), donde la la viabilidad media del polen encontrada con el reactivo carmín acético fue del 98,54%. Resultados diferentes se registra con la prueba de tetrazolium, donde el PPV se obtuvieron valores más bajos a través de las horas con respecto al acetocarmin; asimismo, se observa que con el test de tetrazolio para PPI, se observa una tendencia a aumentar con el transcurrir de las horas, exceptuando el promedio de la 6:00 am

en la evaluación cinco (Tablas 10), lo anterior podría atribuirse a los efectos de las altas temperatura registradas en dichas evaluaciones (Anexo 2). Estudios han reportado que el estrés por calor degenera la capa tapetal en las anteras, lo que da como resultado la indehiscencia de las anteras, el fracaso de las anteras para abrirse (dehiscencia) y liberar polen maduro (Warrag y Hall, 1984; Ahmed et al., 1992). Según Arenas et al. (2016), los granos de polen recién formados tienen mayor viabilidad que el polen maduro.

Tabla 9. Promedios de la interacción test por hora de colecta de polen para su viabilidad en tres genotipos de frijol caupí. 2019A

TEST	EVALUACIÓN 1					
	PPV			PPI		
	6:00	8:00	10:00	6:00	8:00	10:00
AC	96,04a	96,21a	89,98a	3,95b	3,78b	10,01a
TZ	87,31b	82,04b	92,28a	12,68a	17,95a	7,71a

Literales diferentes entre filas indican diferencia estadística entre medias ($P < 0,05$) según Tukey.
AC: Acetocarmin; TZ: Tetrazolium

Tabla 10. Promedios de la interacción test por hora de colecta de polen para su viabilidad en tres genotipos de frijol caupí. 2019B

TEST	EVALUACIÓN 1				EVALUACIÓN 3				EVALUACIÓN 5			
	PPV				PPV				PPV			
	6:00	8:00	10:00	12:00	6:00	8:00	10:00	12:00	6:00	8:00	10:00	12:00
AC	91,25b	93,65a	91,68a	95,80a	93,73a	94,87a	94,21a	91,85a	92,91a	98,02a	96,48a	94,47a
TZ	96,48a	74,47a	89,36a	56,81b	96,65a	89,46b	88,56b	85,51b	30,63b	92,06b	93,07b	91,34a
TEST	PPI				PPI				PPI			
	6:00	8:00	10:00	12:00	6:00	8:00	10:00	12:00	6:00	8:00	10:00	12:00
	AC	8,74a	6,34a	8,32a	4,20b	6,27a	5,12b	5,78a	8,14b	7,08b	1,97a	3,51b
TZ	3,51b	25,52a	10,63a	43,18a	3,34a	10,53a	11,43a	14,48a	69,36a	7,93b	6,92a	8,65a

Literales diferentes entre filas indican diferencia estadística entre medias ($P < 0,05$) según Tukey. AC: Acetocarmin; TZ: Tetrazolium

En la interacción hora de colecta por genotipo hubo diferencias estadísticas en la evaluación uno para porcentaje de polen inviable (PPI) y en la evaluación cuatro para PPV y PPI, correspondientes al primer semestre de 2019 (Tabla 1); en el segundo semestre se registró interacción significativa en la evaluación tres (Tabla 2), lo anterior indica que en dichas evaluaciones el promedio para PPV y PPI en las diferentes horas de colecta está en función de los genotipos. En el semestre A, se registró promedios superiores a las 6:00am con el genotipo L-019 para PPV (Tabla 11); para el segundo semestre de 2019, el genotipo Missouri, registró promedios superiores a las 6:00am para PPV (Tabla 12).

Los resultados para el primer semestre muestran que los genotipos registraron porcentajes de polen viable superior al 80% en todas las horas de colecta (Tabla 11). Por consiguiente, Gaaliche et al. (2013), informan que, si la viabilidad del polen de los genotipos es alta, pueden considerarse buenos polinizadores; ya que, para asegurar el éxito en las hibridaciones controladas, el polen debe mostrar esencialmente una alta tasa de viabilidad y germinación (Brito et al., 2010).

Tabla 11. Promedio de la interacción hora por genotipo para su viabilidad en tres genotipos de frijol caupí. 2019A

EVALUACIÓN 4						
HORA	PPV			PPI		
	CAUP.50	L-019	BRS M	CAUP.50	L-019	BRS M
6:00am	93,95a	98,61a	90,45a	6,05a	1,38b	9,55a
8:00am	96,05a	88,00b	92,78a	3,95a	12,00a	7,21a
10:00am	96,10a	95,60b	92,83a	3,90a	4,40a	7,16a

Literales diferentes entre filas indican diferencia estadística entre medias ($P < 0,05$) según Tukey.

Para las evaluaciones de 2019B, al analizar los promedios se observa que el Caupicor 50 obtuvo los promedios más altos en la evaluación tres (Tabla 12). En contraste el genotipo Missouri presenta los valores más bajos en todas las horas

de evaluación para PPV, en comparación con demás genotipos (Tabla 12), lo que podría explicarse por su origen de Norte América y es posible que las condiciones de temperatura y humedad relativa ejerzan un efecto negativo en la viabilidad de polen, lo que repercute en el rendimiento de semilla. Varios autores han informado que, durante la etapa de reproducción, un breve período de estrés por calor puede reducir significativamente el número de yemas florales y aumentar el aborto de las flores, aunque existen variaciones en la sensibilidad dentro y entre las especies de plantas y sus genotipos (Sato et al., 2006; Li et al., 2012; Kaushal et al., 2013; Annisa et al., 2013). Estudios han demostrado que el calor reduce significativamente el rendimiento de grano de caupí cuando ocurren altas temperaturas (> 20 °C) a altas horas de la noche. Esto se debe a que la producción de flores y la viabilidad del polen se ven afectadas por las altas temperaturas (Hall, 2004). Este autor mostró que cada 1 °C por encima de un umbral de 16 °C durante la noche conduce a una reducción del 4 al 14% en el rendimiento de grano.

Tabla 12. Promedio de la interacción hora por genotipo para su viabilidad en tres genotipos de frijol caupí. 2019B

HORA	EVALUACIÓN 3					
	PPV			PPI		
	BRS M	CAUP. 50	MISSOURI	BRS M	CAUP. 50	MISSOURI
6:00am	94,01a	98,08a	93,48a	6,00a	1,91a	6,51b
8:00am	96,23a	96,03a	84,25b	3,76a	3,96a	15,75ab
10:00am	93,40a	99,63a	81,13b	6,60a	0,36b	18,86a
12:00m	92,90a	96,85a	76,30c	7,10a	3,15a	23,70a

Literales diferentes entre filas indican diferencia estadística entre medias ($P < 0,05$) según Tukey.

Cuando interactúan los tres factores (test, hora y genotipo) solo se presentaron diferencias estadísticas en la evaluación uno y dos para la variable PPI, correspondiente al primer semestre de 2019 (Tabla 1). En los resultados del análisis de varianza para el segundo semestre del 2019, se registró interacción

significativa en la evaluación uno para PPV y PPI (Tabla 2). Por tanto, los promedios para las dos pruebas o test cambian su clasificación en función de la hora de colecta y de los genotipos. De acuerdo con la prueba de medias, el test con acetocarmin es superior a las 12:00 m para el genotipo BRS Milenium y el tetrazolio a las 6:00 am para el genotipo Missouri, para PPV (Tabla 13).

Tabla 13. Promedio de la interacción test por hora y genotipo para la viabilidad de polen en tres genotipos de frijol caupí. 2019B

TEST	EVALUACIÓN 1				EVALUACIÓN 1		
	HORA	PPV			PPI		
		BRS MIL	CAUP. 50	MISSOURI	BRS MIL	CAUP. 50	MISSOURI
AC	6:00am	83,40a	98,20a	92,16b	16,60a	1,80a	7,83a
TZ		92,80a	99,03a	97,63a	7,20a	0,96a	2,36b
AC	8:00am	92,50a	99,33a	89,13a	7,50a	0,66a	10,86a
TZ		54,16a	98,73a	70,53a	45,83a	1,26a	29,46a
AC	10:00am	93,73a	99,43a	81,90a	6,26a	0,56a	18,13a
TZ		95,80a	98,50a	73,80a	4,20a	1,50a	26,20a
AC	12:00m	99,20a	98,20a	90,00a	0,80a	1,80b	10,00a
TZ		7,40b	96,73a	66,30a	92,60a	3,26a	33,70a

Literales diferentes entre filas indican diferencia estadística entre medias ($P < 0.05$) según Tukey. AC: Acetocarmin; TZ: Tetrazolium

Los resultados muestran que para PPV en dicha evaluación, en los dos test y las diferentes horas de colecta, el genotipo Caupicor 50 presenta los valores más altos que variaron entre 96,73% a 99,43%; los genotipos BRS Milenium y Missouri obtuvieron los promedios más altos para PPI con 92,6% y 33,7% a las 12:00 m respectivamente (Tabla 13). Por lo anterior, es posible que los genotipos con promedios más bajos para PPV sean más sensibles a los cambios de los factores de temperatura y humedad relativa. Rieu et al. (2017), acotan que, bajo estrés por calor leve, el contenido de sucrosa se reduce en las microesporas jóvenes y la acumulación de almidón en el polen binucleado es menor. En consecuencia, el contenido de azúcar soluble también es menor en la antesis (Firon et al., 2006; Sato et al., 2006; Jain et al., 2007). Por tanto, la relación entre el contenido de

carbohidratos y la viabilidad del polen está respaldada por los hallazgos de que los genotipos más tolerantes eran más capaces de mantener los niveles de almidón y azúcar de polen que los genotipos sensibles (Pressman et al., 2002; Firon et al., 2006).

Para los tres genotipos de *V. unguiculata* considerados para cada semestre en esta investigación los coeficientes estimados de correlación para porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) están registrados en la tabla 14. Así mismo, los valores medios, mínimo (MIN), máximo (MAX) y desviación estándar (S) de las variables de estudio están consignados en la tabla 15. En el análisis de correlación, se consideró una muestra de 270 datos para el semestre A y 360 datos para el semestre B, alusivos a las variables dependientes e independientes, como se aprecia en la tabla 15.

Tabla 14. Coeficientes de correlación Spearman para porcentaje de polen viable e inviable con respecto a la temperatura y la humedad relativa.

FACTORES	SEMESTRE A 2019		SEMESTRE B 2019	
	PPV	PPI	PPV	PPI
TEMPERATURA (°C)	-0,15*	0,15*	-0,03ns	0,03ns
HUMEDAD R. (%)	0,16**	-0,16**	0,02ns	-0,02ns

PPV: porcentaje de polen viable; PPI; porcentaje de polen inviable

Se observa que los valores promedios de temperatura y humedad relativa durante el desarrollo de esta investigación, para el semestre A y B, registran diferencias importantes (Tabla 15); en el primer semestre la temperatura (T) y la humedad relativa (HR) oscilo entre 26,8°C - 38,6°C y 47% – 94%, en tanto que para el segundo semestre oscilaron en 25°C – 44°C y 29% – 90%; estas variaciones pudieron incidir en los valores promedios obtenidos con los test de acetocarmin y tetrazolium para porcentaje de polen viable (PPV) en inviable (PPI) de lo cultivares estudiados. De Jesús et al. (2018b), resalta que los cambios moderados de

temperatura pueden reducir la cantidad de polen y su viabilidad, lo que puede causar problemas durante la fertilización. En casos más graves, puede resultar en una esterilidad completa del grano de polen o la inhibición de la dehiscencia de las anteras y, en consecuencia, la ausencia de fructificación (Hedhly, 2011).

En el análisis de correlación de Spearman, la temperatura presentó correlación significativa y negativa para PPV ($r=-0.14^*$) e igualmente positiva para PPI ($r=0.14^*$), para el semestre A, más no para el semestre B, pero la misma tendencia (Tabla 14), indicando que para PPV, un aumento de la temperatura influye directamente en la reducción de la viabilidad de los granos de polen, por lo tanto; el porcentaje de polen inviable tiende a aumentar y ello, es coherente, con lo manifestado por Prasad et al. (2006), por la degeneración del tapetum, que representa la capa de células de las anteras que rodean a las células madre de la microspora (Porch y Jahn, 2001) y/o disminución del metabolismo de los carbohidratos (Datta et al., 2001) y en las paredes de las anteras y los granos de polen (Echer et al., 2014). Así mismo Baltazar y Schoper (2002) señalaron que a medida que aumentaba la temperatura, la humedad relativa disminuía, resultaba en una disminución de la viabilidad del polen.

Tabla 15. Promedios, valores mínimos y máximos para las variables de estudio, en los semestres A y B de 2019.

VARIABLE	SEMESTRE A 2019					SEMESTRE B 2019				
	N	MEDIA	S	MIN	MAX	N	MEDIA	S	MIN	MAX
TEMP (°C)	270	31,09	3,58	26,8	38,6	360	32,79	5,43	25,0	44,0
HR (%)	270	75,60	14,99	47,0	94,0	360	68,95	19,53	29,0	90,0
PPV (%)	270	92,26	9,00	25,0	100,0	360	89,46	17,76	0,0	100,0
PPI (%)	270	7,73	9,00	0,0	75,0	360	10,53	17,76	0,0	100,0

TEMP: temperatura; HR: humedad relativa; PPV: porcentaje de polen viable; PPI; porcentaje de polen inviable; N: número total de datos; S: desviación estándar; MIN: valor mínimo; MAX: valor máximo.

Estudios relacionados en *Phaseolus vulgaris* (Prasad et al., 2002), maní (*Arachis hypogaea*) (Prasad et al., 2003) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) (Sato et al., 2000) mostraron deterioro del polen a altas temperaturas; los resultados de la presente investigación, contrastan con los reportados por Patriyawaty et al. (2018), Khattak et al. (2009), Kaur et al. (2015) y Sharma et al. (2016), en *Vigna radiata*, quienes encontraron una reducción hasta del 74% del polen viable e incremento del aborto de botones florales y vainas. Así mismo Ernest et al. (2017), afirman que la reducción en la productividad del frijol se debe en parte a la reducción de la cantidad de granos de polen liberados durante la fertilización, debido al estrés por altas temperaturas.

Es importante resaltar que la respuesta de las plantas al estrés por temperatura, depende en gran medida del genotipo (Koubouris et al., 2009); como se mencionaba anteriormente los valores obtenidos en las pruebas de viabilidad de los genotipos demuestran que estos poseen cierta resistencia a las condiciones adversas que se presentan en la región de estudio, esta respuesta genotípica diferencial a la temperatura durante la fase reproductiva podría ser importante en términos del tiempo necesario para que una especie y/o cultivar, se adapte a los rápidos cambios de temperatura (Hedhly et al., 2004). Investigaciones realizadas sobre la inducción a estrés por calor (42 °C) durante 2 - 4 horas resultó en la reducción de la viabilidad del polen de habas (*Vicia faba*) (Kumar et al., 2016).

Se ha demostrado que la temperatura elevada afecta negativamente la germinación del polen (Flores-Rentería et al., 2018). El desarrollo de polen después de la exposición al estrés por calor incluye el aborto de las microesporas, así como el fracaso en etapas posteriores, lo que lleva a una reducción en el número de granos de polen en anthesis y la proporción de granos polen maduro viables y capaces de germinar (Mesihovic et al., 2016). Así mismo, la estructura del retículo endoplásmico de la capa de tapete se ve afectada por las altas temperaturas diurnas y nocturnas de (33/25°C), lo que provoca la degeneración

temprana del polen en el frijol común (Omae et al., 2012). En investigaciones de genotipos de *Phaseolus vulgaris* sensible al calor y uno tolerante al calor se sometió a un estrés térmico leve durante el desarrollo, la viabilidad del polen del genotipo sensible disminuyó del 80% a menos del 10% después de 10 días de tratamiento térmico. Sin embargo, el genotipo tolerante al calor todavía producía un 60% de polen viable incluso después de 24 días de estrés (Porch y Jahn, 2001). Dafni y Firmage (2000), afirman que, el polen una vez liberado de la antera está inevitablemente sujeto a tensiones ambientales, y su viabilidad se ve afectada negativamente. Estudios han demostrado que el estrés por alta temperatura durante los períodos de esporogénesis causa anomalías en la pared de la exina del polen, daño de la membrana y degradación de las células tapetales que conducen a la esterilidad del polen en *Sorghum bicolor* L. (Djanaguiraman et al., 2014), *Triticum aestivum* L. (Prasad y Djanaguiraman, 2014) y *Glycine max* L. (Djanaguiraman et al., 2013).

Las investigaciones revelan que las variaciones de temperatura y la humedad relativa por debajo o supra óptimas afectan negativamente la calidad del polen y por ende el proceso de fecundación, lo que se vería reflejado en la formación de un bajo número de semillas por vainas, como sustentan (Thakur et al., 2010), las bajas temperaturas a menudo provocan el aborto de las flores, el polen y la infertilidad de los óvulos, la degradación de la fertilización, el llenado deficiente de las semillas, la disminución de la formación de las semillas, lo que finalmente reduce el rendimiento de grano. Estudios realizados en tomate, encontraron que una reducción moderada de 1,0°C a 1,5°C en la temperatura media diaria junto con el aumento de la HR (humedad relativa) del 50% al 70% durante el día mejoró la viabilidad del grano de polen (Harel et al. 2014). Investigaciones realizadas en arroz, resaltan que el rendimiento de granos de los cultivares híbridos se redujo drásticamente probablemente debido a la menor cantidad de formación de espiguillas en la panícula, causado por estrés por baja temperatura y humedad

relativa durante las fases vegetativa y reproductiva, produciendo un mayor porcentaje de granos de polen no viables (Sarwar et al., 2017).

4. CONCLUSIONES

El porcentaje promedio de polen viable colectado a diferentes horas del día en *Vigna unguiculata*, en los dos semestres de estudio, la prueba de acetocarmin fue siempre superior a la prueba de tetrazolium, con registros de 95,11% y 94,72%.

El polen colectado a diferentes horas del día en los genotipos evaluados, acusó respuesta diferencial en los semestres A y B de 2019; el cultivar que presentó mayor porcentaje de polen viable promedio fue Caupicor 50 (93,89% y 94,61%). En tanto que el menor promedio lo registró Missouri con 85,42%.

Todos los genotipos mostraron altos porcentajes de viabilidad de polen y se pueden usar en programas de mejoramiento que contemplen hibridaciones controladas.

En el primer semestre de 2019, la temperatura acusó correlación significativa negativa para PPV y positiva para PPI; mientras que para la humedad relativa, se encontró correlación significativa positiva para PPV y negativa para PPI; esto indica que, a mayor temperatura y menor humedad relativa, la viabilidad del polen disminuye; en tanto que para el segundo semestre no existió correlación.

El mayor porcentaje de polen inviable se presentó de manera general durante los días de evaluación, en los muestreos de las 10:00am para el primer semestre y a las 12:00m en el segundo semestre de 2019; puesto que la temperatura tiende a ser más alta a medida que transcurre el día.

5. BIBLIOGRAFIA

- Agostini, K., Lopes, A. V., y Machado, I. C. (2014). Recursos florais. *Biologia da polinização*, 1, 130-150.
- Ahmed F. E., Hall A. E., DeMason. (1992). Heat injury during floral development in cowpea (*Vigna unguiculata*, Fabaceae). *American Journal of Botany* 79: 784 - 791.
- Akoroda, M. O. (1983). Floral biology in relation to hand pollination of white yam. *Euphytica*, 32(3), 831-838.
- Annisa, Chen, S., Turner, N. C., Cowling, W. A. (2013). Genetic variation for heat tolerance during the reproductive phase in *Brassica rapa*. *J. Agron. Crop Sci.* 199, 424-435.
- Arenas-de-Souza, M. D., da Silveira, G. F., y de Souza, M. (2014). Estimativa da viabilidade polínica em indivíduos de *Tabebuia impetiginosa* e *Tabebuia chryso-tricha* (mart. Ex. Dc.) Standl. (Bignoniaceae) através de métodos citoquímicos. *ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer-Goiânia*, 10(18), 3865-3871.
- Arenas-De-Souza, M. D., Rossi, A. A. B., Varella, T. L., Silveira, G. F. D., y Souza, S. A. (2016). Stigmatic receptivity and pollen viability of *Theobroma subincanum* Mart.: fruit species from the amazon region. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38(4).
- Auler N., M. F. (2004). Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Baccharis trimera* (Less) DC. (Carqueja) no Sul do Brasil. PhD thesis. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. 108 p.
- Baltazar, B. M., y Schoper, J. B. (2002). Crop-to-crop gene flow: dispersal of transgenes in maize during field tests and commercialization. In *7th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms* (pp. 10-16).

- Bispo, R. B., Rossi, A. A. B., Zórtea, K. É. M., de Pedri, E. C. M., Sander, N. L., y da Silva, C. J. (2020). Morfologia, viabilidade polínica e índice meiótico em *Erythrina fusca* Lour. *MAGISTRA*, 31, 479-489.
- Bolat, İ., y Pirlak, L. (1999). An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 23(4), 383-388.
- Brito, A. C., Souza, J. D., Rebouças, T. N. H., y Amaral, C. L. F. (2010). Propriedades do pólen e do estigma de *Ocimum basilicum* L. (cultivar Maria Bonita) para aumentar a eficiência de cruzamentos em programas de melhoramento. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 12(2), 208-214.
- Capitani, L. C., Rovedder, A. P. M., Silva Júnior, J. C. C. D., y Peccatti, A. (2018). Pollen Viability and Autogamy Fitness in *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). *Floresta e Ambiente*, 25(3).
- Coelho, A. P., Morais, K. P., Laughinghouse IV, H. D., Giacomini, S. J., y Tedesco, S. B. (2012). Pollen grain viability in accessions of *Crotalaria juncea* L. (Fabaceae). *Agrociencia*, 46(5), 481-487.
- Costa, R. S., Môro, F. V., y Oliveira, J. C. D. (2009). Influência do momento de coleta sobre a viabilidade de grão de pólen em maracacujá-doce (*Passiflora alata* Curtis). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 956-961.
- Crespo-Muñoz, S., Rivera-Peña, M., Rosero-Alpala, D. A., Muñoz-Florez, J. E., Rao, I. M., y Muñoz-Florez, L. C. (2018). Pollen viability of Tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray.) mutant lines under water stress conditions and inoculation with rhizobia. *Acta Agronómica*, 67(2), 319-325.
- Dafni, A. 1992. *Pollination Ecology: A Practical Approach*. University Press. New York. 250 p.
- Dafni, A., y Firmage, D. (2000). Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. In *Pollen and pollination* (pp. 113-132). Springer, Vienna.

- Damasio, J. F., Dos Santos, B. N. V., Macedo, W. A., Mello, V. S., Karsburg, I. V., Leite, D. M., y dos Santos, L. C. B. (2016). Viabilidade polínica de tulipa africana. *XII Curso De Inverno De Genética – Fcav/Unesp*. Ciência & Tecnologia: Fatec-JB, Jaboticabal, v. 8, n.1. Número especial 2.
- Dane, F., Hunter, A. G., y Chambliss, O. L. (1991). Fruit set, pollen fertility, and combining ability of selected tomato genotypes under high-temperature field conditions. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116(5), 906-910.
- Datta, R., Chourey, P. S., Pring, D. R., y Tang, H. V. (2001). Gene-expression analysis of sucrose-starch metabolism during pollen maturation in cytoplasmic male-sterile and fertile lines of sorghum. *Sexual Plant Reproduction*, 14(3), 127-134.
- Davide, L. M. C., Pereira, R. C., Abreu, G. B., De Souza, J. C., y Von Pinho, É. V. D. R. (2009). Viabilidade de pólen de milho em diferentes períodos de armazenamento em baixa temperatura. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 8(02).
- De Jesus, L. D. G. A., Tavares, L. R., da Costa Gomes, M. F., Dos Santos Valente, S. E., Gomes, R. L. F., De Alemida Lopes, A. C., y Costa, M. F. (2018a). Eficiência de testes colorimétricos para determinação da viabilidade do pólen em acessos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L). *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, 8(1).
- De Jesus, L. D. G. A., Silva, R. N. O., Da Costa Gomes, M. F., Dos Santos Valente, S. E., Gomes, R. L. F., De Almeida Lopes, A. C., y Costa, M. F. (2018b). Efficiency of colorimetric tests to determine pollen viability in peppers. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)*, 8(2), 77-82.
- Djanaguiraman, M., Prasad, P. V., Boyle, D. L., y Schapaugh, W. T. (2013). Soybean pollen anatomy, viability and pod set under high temperature stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 199(3), 171-177.
- Djanaguiraman, M., Prasad, P. V., Murugan, M., Perumal, R., y Reddy, U. K. (2014). Physiological differences among sorghum (*Sorghum bicolor* L.

- Moench) genotypes under high temperature stress. *Environmental and Experimental Botany*, 100, 43-54.
- Echer, F. R., Oosterhuis, D. M., Loka, D. A., y Rosolem, C. A. (2014). High night temperatures during the floral bud stage increase the abscission of reproductive structures in cotton. *Journal of agronomy and crop science*, 200(3), 191-198.
- Ernest, E. G., Wisser, R. J., y Johnson, G. C. (2017). Physiological Effects of Heat Stress on Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) and Development of Heat Tolerance Screening Techniques. Publications from USDA-ARS / UNL Faculty. 1669.
- Firon, N., Nepi, M., y Pacini, E. (2012). Water status and associated processes mark critical stages in pollen development and functioning. *Annals of Botany*, 109, 1201-1213.
- Firon, N., Shaked, R., Peet, M. M., Pharr, D. M., Zamski, E., Rosenfeld, K., ... y Pressman, E. (2006). Pollen grains of heat tolerant tomato cultivars retain higher carbohydrate concentration under heat stress conditions. *Scientia Horticulturae*, 109(3), 212-217.
- Flores-Rentería, L., Whipple, A. V., Benally, G. J., Patterson, A., Canyon, B., y Gehring, C. A. (2018). Higher temperature at lower elevation sites fails to promote acclimation or adaptation to heat stress during pollen germination. *Frontiers in plant science*, 9, 536.
- Franchi, G. G., Piotto, B., Nepi, M., Baskin, C. C., Baskin, J. M., y Pacini, E. (2011). Pollen and seed desiccation tolerance in relation to degree of developmental arrest, dispersal, and survival. *Journal of Experimental Botany*, 62(15), 5267-5281
- Gaaliche, B., Majdoub, A., Trad, M., y Mars, M. (2013). Assessment of pollen viability, germination, and tube growth in eight Tunisian caprifig (*Ficus carica* L.) cultivars. *ISRN Agronomy*, 2013.
- Ge, Y., Fu, C., Bhandari, H., Bouton, J., Brummer, E. C., y Wang, Z. Y. (2011). Pollen viability and longevity of switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Crop Science*, 51(6), 2698-2705.

- Hall, A. E. (2004). Comparative ecophysiology of cowpea, common bean and peanut. In: *Physiology and biotechnology integration for plant breeding*. CRC Press.271-324.
- Harel, D., Fadida, H., Slepoy, A., Gantz, S., y Shilo, K. (2014). The effect of mean daily temperature and relative humidity on pollen, fruit set and yield of tomato grown in commercial protected cultivation. *Agronomy*, 4(1), 167-177.
- Hedhly, A. (2011). Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. *Environmental and Experimental Botany*, 74, 9-16.
- Hedhly, A., Hormaza, J. I., y Herrero, M. (2004). Effect of temperature on pollen tube kinetics and dynamics in sweet cherry, *Prunus avium* (Rosaceae). *American journal of botany*, 91(4), 558-564.
- Hister, C. A. L., y Tedesco, S. B. (2016). Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) através de distintos métodos de coloração. *Revista brasileira de plantas medicinais*, 18(1), 135-141.
- Huang, Z., Zhu, J., Mu, X., y Lin, J. (2004). Pollen Dispersion, Pollen Viability and Pistil Receptivity in *Leymus chinensis*. *Annals of Botany*, 93, 295-301.
- Jain, M., Prasad, P. V., Boote, K. J., Hartwell, A. L., y Chourey, P. S. (2007). Effects of season-long high temperature growth conditions on sugar-to-starch metabolism in developing microspores of grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Planta*, 227(1), 67-79.
- Jiang, Y., Lahlali, R., Karunakaran, C., Warkentin, T. D., Davis, A. R., y Bueckert, R. A. (2019). Pollen, ovules, and pollination in pea: Success, failure, and resilience in heat. *Plant, cell & environment*, 42(1), 354-372.
- Kaushal, N., Awasthi, R., Gupta, K., Gaur, P., Siddique, K. H. M., Nayyar, H. (2013). Heat-stress induced reproductive failures in chickpea (*Cicer arietinum* L.) are associated with impaired sucrose metabolism in leaves and anthers. *Funct.Plant Biol.* 40, 1334-1349.
- Kaur, R., Bains, T. S., Bindumadhava, H., y Nayyar, H. (2015). Responses of mungbean (*Vigna radiata* L.) genotypes to heat stress: Effects on

- reproductive biology, leaf function and yield traits. *Scientia Horticulturae*, 197, 527-541.
- Khattak, G. S. S., Saeed, I., y Muhammad, T. (2009). Flowers' shedding under high temperature in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Pak. J. Bot*, 41(1), 35-39.
- Koubouris, G. C., Metzidakis, I. T., y Vasilakakis, M. D. (2009). Impact of temperature on olive (*Olea europaea* L.) pollen performance in relation to relative humidity and genotype. *Environmental and Experimental Botany*, 67(1), 209-214.
- Kruskal, W. H., y Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American statistical Association*, 47(260), 583-621.
- Kumar, R., Singh, A. K., Lavania, D., Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H., y Grover, A. (2016). Expression analysis of ClpB/Hsp100 gene in faba bean (*Vicia faba* L.) plants in response to heat stress. *Saudi journal of biological sciences*, 23(2), 243-247.
- Kumari, A., Papenfus, H. B., Kulkarni, M. G., Pošta, M., y Van Staden, J. (2015). Effect of smoke derivatives on in vitro pollen germination and pollen tube elongation of species from different plant families. *Plant Biology*, 17(4), 825-830.
- Kumary, K. D., Sreekala, A. K., y Varghese, A. (2017). Pollination Biology Of *Humboldtia Vahlia* Wight. (Fabaceae)-An Endemic Tree Of Southern Western Ghats. *Journal Of Palynology Vol*, 53, 13-23.
- Li, Z., Palmer, W. M., Martin, A. P., Wang, R., Rainsford, F., Jin, Y., ... y Ruan, Y. L. (2012). High invertase activity in tomato reproductive organs correlates with enhanced sucrose import into, and heat tolerance of, young fruit. *Journal of experimental botany*, 63(3), 1155-1166.
- Li, X., Lawas, L. M., Malo, R., Glaubitz, U., Erban, A., Mauleon, R., y Jagadish, K. S. (2015). Metabolic and transcriptomic signatures of rice floral organs reveal sugar starvation as a factor in reproductive failure under heat and drought stress. *Plant, Cell & Environment*, 38(10), 2171-2192.

- Lyra D. H., Sampaio L. S., Pereira D.A., Silva A.P., Amaral C. L.F. (2011). Pollen viability and germination in *Jatropha mollissima* (Euphorbiaceae): Species with potential for biofuel production. *Afr. J. Biotechnol.* 10(3):368-374.
- Marak, M. K., y Wani, A. M. (2018). Pollen morphology and viability in *Gliricidia sepium*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(5), 19-22.
- Merin, E. G., Sarada, S., y Celine, V. A. (2019). Pod set and pollen viability studies in yard long bean (*Vigna unguiculata* sub sp. sesquipedalis). *Journal of Horticultural Sciences*, 14(2), 169-172.
- Mesihovic, A., Iannacone, R., Firon, N., y Fragkostefanakis, S. (2016). Heat stress regimes for the investigation of pollen thermotolerance in crop plants. *Plant reproduction*, 29(1-2), 93-105.
- Mohammed, A. S., Adamu, A. K., Mu'azu, S., Nafiu, M. I., y Nura, S. (2020). Effect of Crossability in Improving Some Selected Cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp) Varieties. *International Journal Of Science for Global Sustainability*, 6(2).
- Munhoz, M., Luz, C. F. P. D., Meissner Filho, P. E., Barth, O. M., y Reinert, F. (2008). Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. *Brazilian Journal of Botany*, 31(2), 209-214.
- Nameirakpam, B., y Khanna, V. K. (2018). Studies on Crossability and Genetic Diversity in Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources*, 13(1), 08-16.
- Nascimento, L. S., Benevenuti, A. S., Leite, D. M., da Silva, D. D., Moura, E. A., Miranda, D., y Karsburg, I. V. (2015). Estimativa da Viabilidade Polínica e Índice Meiótico de " *Delonix Regia*". *Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde*, 41, 83-88.
- Oliveira, P. E., y Maruyama, P. K. (2014). Sistemas reprodutivos. Biologia da polinização. *Rio de Janeiro: Projeto Cultural*, 71-92.
- Omae, H., Kumar, A., y Shono, M. (2012). Adaptation to high temperature and water deficit in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during the reproductive period. *Journal of Botany*, 2012.

- Pacini, E., y Dolferus, R. (2016). The trials and tribulations of the plant male gametophyte-Understanding reproductive stage stress tolerance. In *Abiotic and Biotic Stress in Plants-Recent Advances and Future Perspectives*. IntechOpen.
- Palencia, G., Mercado, T., y Combatt, E. (2006). Estudio agroclimático del departamento de Córdoba. Editorial Gráficas el Caribe, Montería. 126 p.
- Parton, E., Vervaeke, I., Delen, R., Vandenbussche, B., Deroose, R., y De Proft, M. (2002). Viability and storage of bromeliad pollen. *Euphytica*, 125(2), 155-161.
- Patel, R. G., y Mankad, A. U. (2014). In vitro pollen germination-A review. *International Journal of Science and Research*, 3(5), 304-307.
- Patriyawaty, N. R., Rachaputi, R. C., George, D., y Douglas, C. (2018). Genotypic variability for tolerance to high temperature stress at reproductive phase in Mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. *Scientia Horticulturae*, 227, 132-141.
- Porch, T. G., y Jahn, M. (2001). Effects of high-temperature stress on microsporogenesis in heat-sensitive and heat-tolerant genotypes of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Environ.* 24, 723-731.
- Prasad, P. V., Boote, K. J., Allen Jr, L. H., y Thomas, J. M. (2002). Effects of elevated temperature and carbon dioxide on seed-set and yield of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Global Change Biology*, 8(8), 710-721.
- Prasad, P. V., Boote, K. J., Hartwell Allen Jr, L., y Thomas, J. M. (2003). Super-optimal temperatures are detrimental to peanut (*Arachis hypogaea* L.) reproductive processes and yield at both ambient and elevated carbon dioxide. *Global Change Biology*, 9(12), 1775-1787.
- Prasad, P. V., Boote, K. J., y Allen Jr, L. H. (2006). Adverse high temperature effects on pollen viability, seed-set, seed yield and harvest index of grain-sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] are more severe at elevated carbon dioxide due to higher tissue temperatures. *Agricultural and forest meteorology*, 139(3-4), 237-251.

- Prasad, P.V.V., y Djanaguiraman, M. (2014). Response of floret fertility and individual grain weight of wheat to high temperature stress: sensitive stages and thresholds for temperature and duration. *Funct. Plant Biol.* 41, 1261-1269
- Pressman, E., Peet, M. M., y Pharr, D. M. (2002). The effect of heat stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in the developing anthers. *Annals of Botany*, 90(5), 631-636.
- Rangkhom, T., y Khanna, V. K. (2018). Studies on Hybridization and Genetic Diversity in Cowpea (*Vigna unguiculata* L). *Open Acc J Oncol Med* 2 (1). 104-109.
- Razzaq, M. K., Rauf, S., Khurshid, M., Iqbal, S., Javaid, A. B., Farzand, A., y Gai, J. (2019). Pollen viability an index of abiotic stresses tolerance and methods for the improved pollen viability. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 32(4), 609.
- Ribeiro, G. S., Ferreira, A. F., de Lyra Neves, C. M., das Mercecirc, S., de Oliveira, C., Alves, E. M., y De Carvalho, C. A. L. (2013). Aspects of the floral biology and pollen properties of *Vigna unguiculata* L. Walp (Fabaceae). *African Journal of Plant Science*, 7(5), 149-154.
- Rieu, I., Twell, D., y Firon, N. (2017). Pollen development at high temperature: from acclimation to collapse. *Plant physiology*, 173(4), 1967-1976.
- Rodriguez-Riano, T., y Dafni, A. (2000). A new procedure to asses pollen viability. *Sexual Plant Reproduction*, 12(4), 241-244.
- Sarwar, A. K. M. G., Sohail, S. A., Islam, M. A., y Ashrafuzzaman, M. (2017). Pollen characteristics and yield performances of rice as influence by air temperature and relative humidity. *Bangladesh Journal Of Botany*, 46(3), 947-954.
- Sato, S., Kamiyama, M., Iwata, T., Makita, N., Furukawa, H., y Ikeda, H. (2006). Moderate increase of mean daily temperature adversely affects fruit set of *Lycopersicon esculentum* by disrupting specific physiological processes in male reproductive development. *Annals of Botany*, 97(5), 731-738.

- Sato, S., Peet, M. M., Thomas, J. F. (2000). Physiological factors limit fruit set of tomato (*Lycopersicon esculentum mill.*) under chronic, mild heat stress. *Plant Cell Environ.* 23, 719-726.
- Sharma, L., Priya, M., Bindumadhava, H., Nair, R. M., y Nayyar, H. (2016). Influence of high temperature stress on growth, phenology and yield performance of mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] under managed growth conditions. *Scientia Horticulturae*, 213, 379-391.
- Shekari, A., Nazeri, V., y Shokrpour, M. (2016). Pollen viability and storage life in *Leonurus cardiaca* L. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(3), 101-104.
- Schmitt, K., Paula, R., Moreno, E. C., Tiago, A. V., y Rossi, A. A. B. (2015). Uso de testes colorimétricos na avaliação da viabilidade polínica do urucum (*Bixa orellana* L.). *Enciclopédia Biosfera*, 2790-2797.
- Shivanna, K. R., y N. S. Rangaswamy. 1992. Pollen Biology. A Laboratory Manual. Springer-Verlag. Berlin/New York. 119p.
- Shivanna, K. R., y Tandon, R. (2014). Pollen Biology. In *Reproductive Ecology of Flowering Plants: A Manual* (pp. 35-50). Springer, New Delhi.
- Shivanna, K. R. (2020). The Pistil: Structure in Relation to Its Function. In *Reproductive Ecology of Flowering Plants: Patterns and Processes* (pp. 41-50). Springer, Singapore.
- Singh, S. K., Kakani, V. G., Surabhi, G. K., y Reddy, K. R. (2010). Cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) genotypes response to multiple abiotic stresses. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 100(3), 135-146.
- Souza, E. H., Souza, F. V. D., Rossi, M. L., Brancalleao, N., da Silva Ledo, C. A., y Martinelli, A. P. (2015). Viability, storage and ultrastructure analysis of *Aechmea bicolor* (Bromeliaceae) pollen grains, an endemic species to the Atlantic forest. *Euphytica*, 204(1), 13-28.
- Souza, E. H., Souza, F. V., Rossi, M. L., Packer, R. M., Cruz-Barros, M. A. V., y Martinelli, A. P. (2017). Pollen morphology and viability in Bromeliaceae. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(4), 3067-3082.

- Souza, M. D., Pereira, T. N. S., y Martins, E. R. (2002). Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). *Ciência e agrotecnologia*, 26(6), 1209-1217.
- Suzuki, K., Tsukaguchi, T., Takeda, H., y Egawa, Y. (2001). Decrease of pollen stainability of green bean at high temperatures and relationship to heat tolerance. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126(5), 571-574.
- Thakur, P., Kumar, S., Malik, J. A., Berger, J. D., y Nayyar, H. (2010). Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, 67(3), 429-443.
- Techio, V. H., Davide, L. C., Pedrozo, C. Â., y Vander Pereira, A. (2006). Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milho). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 28(1), 7-12.
- Thiyagu, K., Jayamani, P., y Nadarajan, N. (2008). Pollen Pistil Interaction in Inter-Specific Crosses of *Vigna* sp. *Cytologia*, 73(3), 251-257.
- Ting, P., Tu, Y., Lin, C., Chang, H., Chen, L., y Chan, L. (2014). Reproductive fitness of outcrossed hybrids between transgenic Broccoli (*Brassica oleracea*) carrying the *ipt* transgene and conventional varieties of kale, broccoli and cauliflower. *Pakistan Journal of Botany*, 46(4), 1437-1444.
- Tondonba, S. P., Khanna, V. K., y Tejaswini, V. U. (2018). Crossability Studies and Genetic Diversity Analysis in Blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) Using Molecular Markers. 7: 179. 2-8.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., y Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and experimental botany*, 61(3), 199-223.
- Warrag, M. O. A., y Hall, A. E. (1984). Reproductive responses of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) to heat stress. II. Responses to night air temperature. *Field Crops Research*, 8, 17-33.

Willmer, P. (2011). Pollination and floral ecology. Princeton University Press. 181-185.

Zanotto, M., Brammer, S. P., Nascimento Junior, A. D., y Scagliusi, S. M. (2009). Viabilidade polínica como seleção assistida no programa de melhoramento genético de triticales. *Ciência e Agrotecnologia*, 33(SPE), 2078-2082.

CAPITULO III: RECEPTIVIDAD ESTIGMÁTICA EN FRIJOL CAUPI (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) EN DIFERENTES HORAS DEL DÍA EN MONTERIA – CORDOBA.

CHAPTER III: STIGMATIC RECEPTIVITY IN CAUPI BEANS (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) AT DIFFERENT HOURS OF THE DAY IN MONTERIA - CORDOBA.

RESUMEN

La utilización del mejoramiento clásico, basado en la selección de individuos superiores y cruzamientos dirigidos, llevó a la necesidad de conocer aspectos de la biología floral. Uno de estos aspectos es el estudio de la receptividad de estigma, que refleja la capacidad del estigma para recibir el polen, permitiendo que se adhiera, se hidrate y finalmente germine. La presente investigación se llevó a cabo en la Universidad de Córdoba, el objeto de estudio fue evaluar la receptividad estigmática en frijol caupí (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) en diferentes horas del día en condiciones de campo y casa malla; para esto se sembraron 3 surcos de 10m de largo con espaciamentos de 1,2m entre surco y 0,6m entre plantas para cada cultivar, en casa malla las plantas se establecieron en bolsas de 8 Kg de capacidad de suelo, para cada genotipo se sembraron 10 plantas. Se colectaron 3 botones florales en preantesis en cada genotipo, en la mañana (7:00am y 9:00am) y en la tarde (3:00pm y 5:00pm), se transportaron al laboratorio en el menor tiempo posible y se colocaron dos gotas de peróxido de hidrógeno (3% v/v) en las papilas estigmáticas para verificar la actividad de la peroxidasa, la actividad de la efervescencia se determinó con un cronometro. Se evaluó bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 3x4 (3 genotipos y 4 horas en el día) con tres repeticiones (flores) para cada ambiente. El ambiente afecta considerablemente el tiempo de reacción del peróxido de hidrogeno con el estigma de frijol caupí en botones florales en preantesis aptos para emascular en procesos de hibridación, siendo superior en casa malla y este aumenta con el transcurrir de las horas. Los resultados de esta investigación indican que las polinizaciones controladas que se realicen entre las 7:00am y 9:00am en campo y entre las 3:00pm y 5:00pm en casa malla tendrán mayor probabilidad de generar vainas y semillas, ya que es cuando la mayoría de las flores en preantesis presentan mayor tiempo de reacción en los genotipos evaluados de frijol caupí.

Palabras clave: Estigma floral, peroxidasa, peróxido de hidrogeno.

ABSTRACT

The use of classical improvement, based on the selection of superior individuals and directed crosses, led to the need to know aspects of floral biology. One of these aspects is the study of stigma receptivity, which reflects the ability of the stigma to receive pollen, allowing it to adhere, hydrate and finally germinate. The research was carried out at the University of Córdoba, the object of study was to evaluate the stigmatic receptivity in cowpea beans (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) At different times of the day under field conditions and mesh house; For this, 8 rows of 10m long were sown with spacings of 1.2m between rows and 0.6m between plants for each cultivar, at home the plants were established in bags of 8 Kg of soil capacity, for each genotype they were sown 30 floors. 3 flower buds were collected in pre-synthesis in each genotype, in the morning (7:00 am and 9:00 am) and in the afternoon (3:00 pm and 5:00 pm), they were transported to the laboratory in the shortest possible time and two were placed drops of hydrogen peroxide (3% v / v) on the stigmatic papillae to verify the peroxidase activity, the effervescence activity was determined with a stopwatch. It was evaluated under a completely randomized design with a factorial arrangement of 3x4 (3 genotypes and 4 hours in the day) with three repetitions (flowers) for each environment. The environment considerably affects the reaction time of hydrogen peroxide with the cowpea stigma in pre-synthesized flower buds suitable for emaculating in hybridization processes, being higher in each mesh and this increases with the passing of the hours. The results of this research indicate that controlled pollinations carried out between 7:00am and 9:00 am in the field and between 3:00pm and 5:00 pm at home mesh will have a greater probability of generating pods and seeds, since that is when Most of the flowers in pre-synthesis show a longer reaction time in the evaluated cowpea genotypes.

Keywords: Floral stigma, peroxidase, hydrogen peroxide.

1. INTRODUCCIÓN

El frijol caupí es una especie estrictamente autógama, principalmente debido a la cleistogamia y la simultaneidad entre la receptividad del estigma y la eclosión de las anteras. El estigma es receptivo desde unas 12 horas antes de la dehiscencia de las anteras, característica que facilita los cruzamientos dirigidos. Es relativamente fácil de hibridar y las semillas de los cruces son de alta viabilidad (FAO, 2018).

Las características florales y las características de desarrollo tienen un impacto significativo en la reproducción exitosa de plantas (Zhang y Zhang, 2007). La receptividad del estigma es uno de los factores más importantes en la reproducción sexual, conocer el período de receptividad del estigma y la receptividad del estigma en diferentes etapas de desarrollo es propicia para mejorar de manera efectiva la tasa de éxito del cruzamiento (Li et al., 2014). El estigma es una región especializada, generalmente ubicada en el ápice del carpelo, de forma variable, tamaño y composición celular (Raghavan, 1997); desempeña un papel clave en la adhesión, el reconocimiento y la germinación del grano de polen (Cocucci y Mariath, 2004; Beck, 2010).

La receptividad del estigma y la viabilidad del polen son fundamentales para el inicio eficaz de la interacción polen-pistilo (Shivanna, 2003). Un estigma es receptivo cuando tiene la capacidad de apoyar la germinación del polen, y el inicio de la receptividad estigmática se acompaña de una serie de cambios que se producen al madurar el estigma (Sanzol y Herrero, 2001). La duración de la receptividad puede variar desde unas pocas horas hasta 10 días (Shivanna, 2003; Losada et al., 2014). Según Dafni (1992), la receptividad del estigma puede investigarse para identificar la edad óptima de la flor para los procedimientos de polinización artificial y para aumentar la eficiencia de la polinización; por lo que juega un papel importante en las hibridaciones exitosas. Para que ocurra la

fertilización, no solo los granos de polen deben estar en un estado viable, sino que también el estigma debe estar en una condición receptiva, para la germinación del grano de polen, crecimiento y desarrollo del tubo polínico.

Una secreción pegajosa que indica receptividad del estigma suele acompañar a la etapa femenina de la flor (Heslop-Harrison y Shivanna, 1977). Un gran número de estudios han demostrado que la receptividad al estigma de las plantas está estrechamente relacionada con el desarrollo de las flores y los cambios morfológicos (Li et al., 2014). El período óptimo de polinización se puede determinar en función del grado de apertura de las flores (Li et al., 2010; Guan et al., (2009), color del estigma (Qi et al., 2011), morfología del estigma (Liu et al., 2011) y secreciones del estigma (Li et al., 2010). Otros métodos para determinar la receptividad se centran en la indicación de la actividad de enzimas como esterasas, peroxidasas y fosfatasas ácidas, en la superficie del estigma (Dresselhaus y Franklin, 2013; Chen et al., 2013). La receptividad del estigma debe analizarse en particular con el fin de: (i) conocer con precisión la etapa de anthesis de la inflorescencia / flor / pistilo para la polinización cruzada manual; (ii) indicar la etapa pre o post-receptiva de los estigmas para mejorar la eficiencia de la polinización; (iii) estudiar la incompatibilidad polen / estigma; (iv) proponer un sistema de producción nuevo (De las Heras et al., 2001; Chen et al., 2013). Silva et al. (2010), anotan que los análisis de receptividad estigmática son esenciales, ya que la fertilización tendrá éxito solo cuando el polen desarrolle su tubo de polen debajo de la superficie estigmática receptiva.

Esta investigación tuvo como objetivo estudiar la receptividad del estigma en diferentes cultivares de frijol caupí sembrados en dos ambientes. Lo que nos permite comprender aspectos importantes para garantizar que el estigma esté listo para ser fertilizado cuando sea necesario.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1. LOCALIZACIÓN

La investigación se llevó a cabo en la granja experimental de la Facultad de Ciencias Agrícolas, de la Universidad de Córdoba, en Montería - Córdoba, cuyas coordenadas geográficas son 8° 45' N y 75° 53' W, una altitud de 15 m.s.n.m. Su clasificación climatológica corresponde a bosque seco tropical, con temperatura media de 27,4 °C, precipitación por año de 1346 mm, humedad relativa de 85% y brillo solar de 2108 horas solar anual (Palencia et al., 2006).

2.2. VARIABLES E INDICADORES

2.2.1. Variables dependientes. Corresponden a las variables que han sido definidas para llevar a cabo la investigación:

- Tiempo de reacción del estigma con el peróxido de hidrogeno.

2.2.2. Variables independientes. Corresponden a los cultivares evaluados:

- Casa malla: Caupicor 50, BRS Milenium, IT86.
- Campo: Caupicor 50, BRS Milenium, Missouri.

2.3. PROCEDIMIENTO

Para este estudio se evaluó en dos ambientes (campo y casa malla); en casa malla las plantas se establecieron en bolsas de 8 Kg de capacidad de suelo, para cada genotipo se sembraron 10 plantas, en campo se establecieron parcelas de 3 surcos de 10 metros de largo, con distancia entre surco de 1,2m y entre plantas de

0,6m; se sembraron primero los genotipos más tardíos (BRS Milenium e IT86) con intervalo de 5 días para los genotipos más precoces (Caupicor 50 y Missouri).

Se utilizó la técnica descrita por Crispim et al. (2017), modificada, que consiste en identificar y coleccionar 3 botones florales en cada genotipo (Caupicor 50, BRS Milenium, Missouri e IT86), en la mañana (7:00am y 9:00am) y en la tarde (3:00pm y 5:00pm) en pre anthesis, se transportaron al laboratorio en el menor tiempo posible, se expone el estigma eliminando los pétalos y las anteras y se colocaron dos gotas de peróxido de hidrógeno (3% v/v) en las papilas estigmáticas para verificar la actividad de la peroxidasa, que indica si el estigma es receptivo a los granos de polen; se observó inmediatamente la formación de burbujas como lo indica Galen y Plowright (1987) y Osborn et al. (1988); una vez aplicado el peróxido se cronometra el tiempo de la duración de la efervescencia, utilizando un cronometro marca Weston (modelo JS-510).

Este experimento se evaluó bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 3x4 (3 genotipos y 4 horas en el día) con tres repeticiones (flores).

2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó análisis de varianza, pruebas de medias según Tukey y correlación de Spearman, a las variables consideradas con el paquete estadístico SAS versión 9.4.

Para el experimento en campo se transformaron los datos con raíz cuadrada ($Y+0.5$) dado que no se cumplieron los supuestos estadísticos (las tablas contienen los datos originales y la significancia fue leída en los análisis transformados).

3. RESULTADOS Y DISCUSION

La receptividad del estigma juega un papel importante en las hibridaciones exitosas. La adhesión e hidratación del polen son los primeros eventos de las interacciones polen-estigma, que permiten que el polen compatible fertilice los óvulos (Yu et al., 2019). Para que ocurra la fertilización, no solo los granos de polen deben estar en un estado viable, sino que también el estigma debe estar en una condición receptiva para que se desarrolle su tubo polínico. Por lo que los análisis de receptividad estigmática se consideran esenciales (Silva et al., 2010).

Los resultados del análisis de varianza para el tiempo de reacción del peróxido de hidrogeno con el estigma de diferentes genotipos de frijol caupí cultivados en dos ambientes se muestran en la tabla 1. Las condiciones prevalecientes en las diferentes horas del día en someter el estigma de flores en pre anthesis influye en el tiempo de reacción con el peróxido de hidrogeno en los dos ambientes (Tabla 1).

Tabla 1. Cuadrados medios del análisis de varianza para el tiempo de reacción del estigma al peróxido de hidrogeno (TREP) en campo y casa malla, en tres genotipos en frijol caupí. Montería, 2020

FUENTE DE VARIACION	G.L	CAMPO	CASA MALLA
		TREP	TREP
HORA	3	0,089**	9,846**
GENOTIPO	2	0,139**	0,478*
HORA*GENOTIPO	6	0,143**	4,342**
ERROR	24	0,018	0,110
TOTAL	35		
\bar{X}		1,46	2,87
CV%		9,26	11,55
R ²		0,76	0,95

*: significativo con $p \leq 0,05$; **: altamente significativo con $p \leq 0,001$; ns: no significativo con $p \leq 0,05$; G.L: Grados de libertad; CV: coeficiente de variación.

Los resultados en campo, muestra que los mayores promedios se registraron a las 7:00am y 9:00am con 1,96 minutos y 1,90 minutos respectivamente (Tabla 2), caso contrario se presentó en los estigmas de las plantas que se desarrollaron en casa malla, donde la reacción fue más prolongada a las 3:00pm y 5:00pm con promedios de 3,90 minutos y 3,63 minutos. En la madurez floral, cuando los estigmas están listos para la polinización, estos se caracterizan por tener gran actividad peroxidasa (McInnis et al. 2006); estudios reportados por Nogueira et al. (2018) en *Chamaecrista desvauxii* (Fabaceae), indican que el estigma era receptivo antes de la antesis. Rodríguez et al. (2015), evaluaron la receptividad del estigma en diferentes especies de *Echeveria* en diferentes horas del día y reportan que el horario en que hubo mayor porcentaje de estigmas receptivos fue de 12:00m a 14:00pm; además, en estos horarios se observó que el burbujeo fue de mayor duración y las burbujas fueron más grandes. De igual forma Kumary et al. (2017), observaron en *Humboldtia Vahlia* Wight (Fabaceae) la mayor receptividad a las 13:00horas a 18:00horas. Sin embargo, en estudios reportados por Montoya et al. (2016), en *Boehmeria caudata*, indican que los estigmas se registraron como receptivos (prueba de peróxido de hidrogeno) en cualquier momento del día. Resultados similares obtuvieron Ribeiro et al. (2013), en *Vigna unguiculata*, observando en todo momento la acción de la peroxidasa.

La hora en campo y casa malla donde se registró menor tiempo de reacción del estigma al peróxido de hidrogeno ocurrió a las 3:00pm y a las 7:00am respetivamente. Por tanto, en dichas horas del día la actividad de la peroxidasa presente en el estigma es menor.

Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran claramente que la actividad de la peroxidasa en el estigma del frijol caupí está influenciada por el ambiente. Por tanto, es importante tener en cuenta dichos resultados en programas que incluyan la realización de polinización artificial y obtener mejores porcentajes de fecundación. Arathi et al. (2002) sugirieron que la receptividad del

estigma es un determinante importante del éxito reproductivo en las plantas. Investigaciones realizadas por Ribeiro et al. (2013) en frijol caupí, señalan que la prueba de receptividad del estigma, observaron que el estigma es receptivo por un período de un día antes de la antesis hasta el mediodía del día de la antesis.

Tabla 2. Promedios para el tiempo de reacción del estigma al peróxido de hidrogeno (TREP) en frijol caupí, evaluado en diferentes horas del día.

HORA	CAMPO	CASA MALLA
	TREP	TREP
7:00am	1,96a	1,81b
9:00am	1,90a	2,16b
3:00pm	1,28b	3,90a
5:00pm	1,68ab	3,63a

Literales diferentes entre filas indican diferencia estadística entre medias ($P < 0.05$) según Tukey.

Los resultados para el factor genotipo, muestran que en campo y casa malla el tiempo de reacción al peróxido de hidrogeno presento un efecto diferencial en los diferentes genotipos (Tabla 1); cabe anotar que existe un genotipo diferente para cada ambiente. De los genotipos evaluados en campo y casa malla, el BRS Milenium presentó un promedio del tiempo de reacción superior a los demás con 2.12 minutos y 3.10 minutos, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Promedios para el tiempo de reacción del estigma al peróxido de hidrogeno (TREP) en tres genotipos de frijol caupí, cultivados en campo y casa malla.

CAMPO		CASA MALLA	
GENOTIPO	TREP	GENOTIPO	TREP
CAUPICOR 50	1,54b	CAUPICOR 50	2,78ab
MISSOURI	1,46b	IT86	2,74b
BRS MILENIUM	2,12a	BRS MILENIUM	3,10a

Literales diferentes entre filas indican diferencia estadística entre medias ($P < 0.05$) según Tukey.

La interacción de la hora de evaluación con genotipo, mostro un efecto significativo del tiempo de reacción de la peroxidasa presente en el estigma con el peróxido de hidrógeno en los dos ambientes (Tabla 1), y con ello se establece que los valores promedios en las diferentes horas de evaluación cambian en función de los genotipos. En campo, en los genotipos Missouri y BRS Milenium, se detectó el mayor tiempo de reacción del peróxido de hidrogeno con la enzima peroxidasa a las 9:00am y 7:00am respectivamente, en tanto que en casa malla, se registraron los mayores promedios a las 3:00pm para Caupicor 50 y Missouri, y a las 5:00pm para BRS Milenium (Tabla 4).

Tabla 4. Promedios de la interacción hora por genotipo para tiempo de reacción del estigma al peróxido de hidrogeno (TREP) en frijol caupí, evaluado en diferentes horas del día.

HORA	CAMPO			CASA MALLA		
	CAUP. 50	MISSOURI	BRS MILEN	CAUP. 50	IT86	BRS MILEN
7:00am	1,22a	1,39ab	3,28a	1,116c	2,37b	1,90d
9:00am	1,37a	2,00a	2,33b	2,98b	2,21b	1,28c
3:00pm	1,80a	1,15b	0,91c	3,78a	4,31a	3,62b
5:00pm	1,79a	1,30b	1,96b	3,19b	2,09b	5,63a

Literales diferentes entre filas indican diferencia estadística entre medias ($P < 0.05$) según Tukey.

Claramente se observa que, independientemente del genotipo (Tabla 4), el ambiente a través de los efectos de temperatura y humedad relativa, ejercen un efecto diferencial en el tiempo de reacción del peróxido de hidrogeno con el estado de receptividad de flores en preantesis para frijol caupí.

Las correlaciones de temperatura y humedad relativa con el tiempo de reacción del estigma al peróxido de hidrogeno en campo presentan valores bajos y no registra significancia (Tabla 5); entre tanto, cuando se evaluó en casa malla las correlaciones presentan valores importantes altamente significativos de $r=0,75$ para temperatura y $r=-0,75$ para humedad relativa. Por tanto, en casa malla la

temperatura y la humedad relativa presentan un efecto de asociación importante con respecto al tiempo de reacción del peróxido de hidrogeno, mostrando que a mayor temperatura el tiempo de reacción es mayor y caso contrario se presenta con la humedad relativa donde valores altos de esta afectan negativamente el tiempo de reacción (Tabla 5).

Tabla 5. Correlación de Spearman del tiempo de reacción del estigma al peróxido de hidrogeno (TREP_H) con la temperatura (°C) y la humedad relativa (%), de muestras que provienen de campo y casa malla.

FACTORES AMBIENTALES	CAMPO	CASA MALLA
	TREP_H	TREP_H
TEMPERATURA	-0,26 ns	0,75**
HUMEDAD RELATIVA	0,39 ns	-0,75**

Estudios realizados por Kaur et al. (2015), en *Vigna radiata* resaltan que la receptividad del estigma disminuye notablemente en plantas estresadas por el calor (temperaturas por encima de > 40/25 °C día/noche), ocasionando daños en la superficie del estigma y posiblemente inhibiendo la actividad de las esterasas y las peroxidasa, dificultando la germinación del polen y los eventos posteriores relacionados con la fertilización. Igualmente, Fatokun (1991), corrobora que, en condiciones muy secas, el estigma pierde receptividad rápidamente. En el garbanzo, altas temperaturas superiores a 35/25°C día/noche, reduce la receptividad del estigma, lo que resulta en una falla en la fertilización (Sita et al., 2017). Por tanto, es posible las temperaturas elevadas reduzcan la reacción de la peroxidasa con el peróxido de hidrogeno al ocasionar modificaciones en la división y elongación celular, alterando la maduración del estigma y estilo (Giorno et al., 2013; Sage et al., 2015).

En la presente investigación, se evidencio que, durante las horas evaluadas en el día en los dos ambientes, el estigma de los botones florales en preantesis de los diferentes genotipos, presentan actividad de la peroxidasa en reacción con el

peróxido de hidrogeno. Lo anterior se corrobora con lo expresado por Poonia et al. (2018), el estigma en *Vigna unguiculata* se vuelve receptivo un día antes de la apertura de la flor y permanece receptivo hasta el mediodía del día de antesis.

4. CONCLUSIONES

El ambiente afecta considerablemente el tiempo de reacción del peróxido de hidrogeno con el estigma de frijol caupí en botones florales en preantesis aptos para emasculación en procesos de hibridación, siendo superior en casa malla y este aumenta con el transcurrir de las horas.

Los resultados de esta investigación indican que las polinizaciones controladas que se realicen entre las 7:00am y 9:00am en campo y entre las 3:00pm y 5:00pm en casa malla tendrán mayor probabilidad de generar vainas y semillas, ya que es cuando la mayoría de las flores en preantesis presentan mayor tiempo de reacción en los genotipos evaluados de frijol caupí.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Arathi, H. S., Rasch, A., Cox, C., y Kelly, J. K. (2002). Autogamy and floral longevity in *Mimulus guttatus*. *International Journal of Plant Sciences*, 163(4), 567-573.
- Beck, C. B. (2010). An introduction to plant structure and development: plant anatomy for the twenty-first century. Cambridge University Press. P361-383.
- Chen, F., Yuan, W., Shi, X., y Ye, Y. (2013). Evaluation of pollen viability, stigma receptivity and fertilization success in *Lagerstroemia indica* L. *African Journal of Biotechnology*, 12(46), 6460-6467.
- Cocucci, A. E., y Mariath, J. E. A. (2004). Gametogênese, fecundação, seleção do gametófito mais apto, embriogênese e diásporo maduro. *Germinação: do básico ao aplicado, Porto Alegre: Artmed Porto Alegre, Brasil*, 15-30.
- Crispim, J. G., Rêgo, E. R., Rêgo, M. M., Nascimento, N. F. F., y Barroso, P. A. (2017). Stigma receptivity and anther dehiscence in ornamental pepper. *Horticultura Brasileira*, 35(4), 609-612.
- Dafni, A. (1992). Pollination ecology: a practical approach. Oxford University Press, Oxford. 250p.
- De las Heras, M. A., Hidalgo, P. J., y Ubera, J. L. (2001). Stigmatic cuticle in *Hedysarum glomeratum*: structure and function. *International Journal of Developmental Biology*, 45(S1), S41-S42.
- Dresselhaus, T., y Franklin-Tong, N. (2013). Male-female crosstalk during pollen germination, tube growth and guidance, and double fertilization. *Molecular plant*, 6(4), 1018-1036.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2018). Legumbres. Pequeñas semillas, grandes soluciones. Ciudad de Panamá. P 58-61.

- Fatokun, C. A. (1991). Wide hybridization in cowpea: problems and prospects. *Euphytica*, 54(2), 137-140.
- Galen, C. y R. C. Plowright. (1987). Testing the accuracy of using peroxidase activity to indicate stigma receptivity. *Can. J. Bot.* 65: 107-111.
- Giorno, F., Wolters-Arts, M., Mariani, C., y Rieu, I. (2013). Ensuring reproduction at high temperatures: the heat stress response during anther and pollen development. *Plants*, 2(3), 489-506.
- Guan, W., Li, Y., Chen, X., y Yang, D. (2009). Flower structure and biological characteristics of flowering and pollination in *Iris japonica* Thunb. *Acta Horticulturae Sinica*, 36(10), 1485-1490.
- Heslop-Harrison, Y., y Shivanna, K. R. (1977). The receptive surface of the angiosperm stigma. *Annals of botany*, 41(6), 1233-1258.
- Kaur, R., Bains, T. S., Bindumadhava, H., y Nayyar, H. (2015). Responses of mungbean (*Vigna radiata* L.) genotypes to heat stress: Effects on reproductive biology, leaf function and yield traits. *Scientia Horticulturae*, 197, 527-541.
- Kumary, K. D., Sreekala, A. K., y Varghese, A. (2017). Pollination Biology Of *Humboldtia Vahlia* Wight. (Fabaceae)-An Endemic Tree Of Southern Western Ghats. *Journal Of Palynology Vol*, 53, 13-23.
- Li, C., Su, J., Liu, X., Chen, S., y He, L. (2014). Pistillate Flower Development and Stigma Receptivity of *Euphorbia pulcherrima*. *Agricultural Science & Technology*, 15(10), 1671.
- Li, J., Huang, L., Chen, Z., Zeng, J., y Yi, M. (2010). Floral morphology, anthesis and pistil receptivity of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 18(4), 379-385.
- Liu, H., Gao, Y., Dong, N., Xu, H., y Pei, D. (2011). Study on pollination activity of pistillate and staminate flowers in walnut excellent varieties. *Journal of Beijing Forestry University*, 33(6), 119-123.

- Losada, J. M., Herrero, M., Hormaza, J. I., y Friedman, W. E. (2014). Arabinogalactan proteins mark stigmatic receptivity in the protogynous flowers of *Magnolia virginiana* (Magnoliaceae). *American journal of botany*, 101(11), 1963-1975.
- McInnis, S. M., Emery, D. C., Porter, R., Desikan, R., Hancock, J. T., y Hiscock, S. J. (2006). The role of stigma peroxidases in flowering plants: insights from further characterization of a stigma-specific peroxidase (SSP) from *Senecio squalidus* (Asteraceae). *Journal of Experimental Botany*, 57(8), 1835-1846.
- Montoya-Pfeiffer, P. M., Kevan, P. G., González-Chaves, A., Queiroz, E. P., y Dec, E. (2016). Explosive pollen release, stigma receptivity, and pollen dispersal pattern of *Boehmeria caudata* Sw. (Urticaceae) in a Brazilian rain forest. *Botany*, 94(8), 607-614.
- Nogueira, A., Valadão-Mendes, L. B., El Ottra, J. H., Guimarães, E., Cardoso-Gustavson, P., Quinalha, M. M., y Rando, J. G. (2018). Relationship of floral morphology and development with the pattern of bee visitation in a species with pollen-flowers, *Chamaecrista desvauxii* (Fabaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 187(1), 137-156.
- Osborn, M. M., Kevan, P. G. y Lane, M. A. (1988). Pollination biology of *Opuntia polyacantha* and *Opuntia phaeacantha* (Cactaceae) in Southern Colorado. *Pl. Syst. E. vol. 159: 85-94.*
- Palencia, G., Mercado, T., y Combatt, E. (2006). Estudio agroclimático del departamento de Córdoba. Editorial Gráficas el Caribe, Montería. 126p.
- Poonia, A., Phogat, D. S., y Phougat, D. (2018). Cowpea breeding: status and perspectives. *Advances in environment and agriculture biotechnology*. 50 – 56.
- Qi, X., Zhang, S., y Fang, J. (2011). Flower structure and biological characteristics of all red *Actinidia arguta*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 31(5), 966-971.
- Raghavan, V. (1997). *Molecular embryology of flowering plants*. Cambridge University Press. 669p.

- Ribeiro, G. S., Ferreira, A. F., De Lyra Neves, C. M., das Merceirc, S., De Oliveira, C., Alves, E. M., Sousa, F.S., Sodré, G.S., y De Carvalho, C. A. L. (2013). Aspects of the floral biology and pollen properties of *Vigna unguiculata* L. Walp (Fabaceae). *African Journal of Plant Science*, 7(5), 149-154.
- Rodríguez-Rojas, T. J., Andrade-Rodríguez, M., Canul-Ku, J., Castillo-Gutiérrez, A., Martínez-Fernández, E., y Guill n-Sánchez, D. (2015). Viabilidad de polen, receptividad del estigma y tipo de polinización en cinco especies Echeveria en condiciones de invernadero. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(1), 111-123.
- Sage, T. L., Bagha, S., Lundsgaard-Nielsen, V., Branch, H. A., Sultmanis, S., y Sage, R. F. (2015). The effect of high temperature stress on male and female reproduction in plants. *Field Crops Research*, 182, 30-42.
- Sanzol, J., y Herrero, M. (2001). The “effective pollination period” in fruit trees. *Scientia Horticulturae*, 90(1-2), 1-17.
- Shivanna KR. (2003). Pollen–pistil interaction and fertilization. In: Pollen biology and biotechnology. Enfield, NH: *Science Publisher Inc.*, 117.
- Silva, L. A. C., Pagliarini, M. S., Santos, S. A., y Do Valle, C. B. (2010). Receptividade dos estigmas de acessos da grama-do-cerrado (*Mesosetum chauseae* Luces), Pantanal. In *Embrapa Pantanal-Resumo em anais de congresso (ALICE)*. Simpósio Sobre Recursos Naturais E Socioecon micos Do Pantanal, 5., 2010, Corumbá, MS. Anais. Corumbá: Embrapa Pantanal: UFMS; Campinas: ICS do Brasil, 2010. 1 CD-ROM SIMPAN 2010.
- Sita, K., Sehgal, A., Kumar, J., Kumar, S., Singh, S., Siddique, K. H. M., y Nayyar, H. (2017). Identification of High-Temperature Tolerant Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Genotypes through Leaf and Pollen Traits. *Front. Plant Sci.* 8: 744.
- Yu, B., Liu, L., y Wang, T. (2019). Deficiency of very long chain alkanes biosynthesis causes humidity-sensitive male sterility via affecting pollen adhesion and hydration in rice. *Plant, Cell & Environment*, 42(12), 3340-3354.

Zhang, Y., y Zhang, D. (2007). Asexual and sexual reproductive strategies in clonal plants. *Frontiers of Biology in China*, 2(3), 256-262.

**CAPITULO IV: EVALUACION DE DOS MÉTODOS DE HIBRIDACIÓN EN
FRIJOL CAUPI (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) EN CONDICIONES DE CAMPO
Y CASA MALLA EN MONTERIA – CORDOBA.**

**CHAPTER IV: EVALUATION OF TWO HYBRIDIZATION METHODS IN CAUPI
BEANS (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) IN FIELD AND MALLA HOUSE
CONDITIONS IN MONTERIA - CORDOBA.**

RESUMEN

La búsqueda de nuevos cultivares es de suma importancia para el mantenimiento de la producción, y las mejoras principalmente genéticas vienen a ayudar en este proceso en forma de cruces, que puede resultar en un nuevo cultivar con características deseables para el productor y consumidor. La investigación se llevó a cabo en la Universidad de Córdoba, con el fin de evaluar dos métodos de hibridación en frijol caupí (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) en condiciones de campo y casa malla en Montería; para esto se sembraron 8 surcos de 10m de largo con espaciamientos de 1,2m entre surco y 0,6m entre plantas para cada cultivar, en casa malla las plantas se establecieron en bolsas de 8Kg de capacidad de suelo, para cada genotipo se sembraron 30 plantas. Los cruzamientos se realizaron utilizando dos métodos, 1: emasculación y polinización en la mañana (7:00am y 9:00am), 2: colecta de polen en la mañana (6:30am – 7:00am) y emasculación y polinización en la tarde (3:00pm y 5:00pm); se realizaron 7 cruces para cada hora. El método uno, en el horario de 7:00am a 10:00am, en los dos ambientes se registraron los mayores porcentajes de cruzamientos viables. Siendo en casa malla de 29,15% y en campo fue de 57,15%, a pesar que bajo estas condiciones los registros de temperatura fueron más altos oscilando entre 29,9°C - 39,4°C y humedad relativa entre 45,5% y 78,5%.

Palabras clave: Emasculación, antesis, polinización, fecundación.

ABSTRACT

The search for new cultivars is extremely important for the maintenance of production, and mainly genetic improvements come to help in this process in the form of crosses, which can result in a new cultivar with desirable characteristics for the producer and consumer. The research was carried out at the University of Córdoba, in order to evaluate two hybridization methods in cowpea beans (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) Under field conditions and casserole in Monteria; For this, 8 rows of 10m long were sown with spacings of 1.2m between rows and 0.6m between plants for each cultivar, at home the plants were established in bags of 8 Kg of soil capacity, for each genotype they were sown 30 floors. The crosses were carried out using two methods, 1: emasculation and pollination in the morning (7:00 and 9:00 a.m.), 2: pollen collection in the morning (6:30 - 7:00 a.m.) and emasculation and pollination in the afternoon. (3:00 and 5:00 pm); 7 crosses were made for each hour. Method one, from 7:00 to 10:00 am, in the two environments the highest percentages of viable crosses were recorded. Being a mesh of 29.15% at home and in the field it was 57.15%, despite the fact that under these conditions the temperature records were higher, ranging between 29.9 - 39.4 ° C and relative humidity between 78.5 - 45.5%.

Keywords: Emasculation, anthesis, pollination, fertilization.

1. INTRODUCCIÓN

El caupí es una especie autógama en razón a la cleistogamia, las flores se abren solo un día, son grandes y llamativas, lo que hace que la hibridación sea relativamente fácil. El nivel de polinización cruzada en el caupí es generalmente bajo (Fatokun y Ng, 2007) y podría variar con el ambiente donde se cultiva. Las anteras se abren para liberar los granos de polen que contiene el día que se abre la flor. Sin embargo, el estigma es receptivo desde un día antes de la antesis y permanece así hasta el día de la apertura de la flor (Boukar et al., 2019).

El mejoramiento del frijol caupí se ha enfocado principalmente a incrementar el rendimiento y a obtener líneas indiferentes al fotoperiodo, con resistencia a enfermedades, tallo recto y regular, pedúnculos florales largos que sobresalgan del follaje, color y calidad del grano, entre otros. La coloración del tegumento de la semilla está determinada por unos 10 genes: rojo básico, blanco recesivo, negro epistático a todos menos a púrpura. Otros genes determinan la distribución del color en algunas variedades que presentan manchas pequeñas de diferente tamaño. La variabilidad genotípica ha sido fundamental para el desarrollo de variedades adaptadas a diferentes condiciones ambientales (FAO, 2018).

El éxito de los programas de mejora depende principalmente de la elección de padres superiores para la hibridación y la comprensión clara del sistema genético involucrado en la herencia de los rasgos de rendimiento. Siempre hubo posibilidad de mejorar el cultivo mediante la incorporación de genes silvestres a las especies cultivadas (Bhanu et al., 2018). La hibridación artificial brinda la oportunidad de aumentar la variabilidad genética. En particular, los cruces interespecíficos permiten la introgresión de alelos importantes de especies silvestres, por ejemplo, alelos de resistencia o tolerancia a tensiones abióticas y bióticas; sin embargo, la

presencia de fuertes barreras antes y después de la fertilización es una limitación importante en los programas de hibridación (Wasonga et al., 2020).

La técnica de polinización cruzada en hibridación se ha practicado durante muchos años en programas convencionales de fitomejoramiento. El propósito es transferir el polen del órgano reproductor masculino de un individuo al órgano reproductor femenino de otro individuo Mangena y Mokwala (2018). Este método requiere polinización natural con la ayuda de aves, insectos y viento, o artificialmente mediante polinización manual. La polinización artificial es preferible en la mayoría de los programas de reproducción, ya que ofrece una alternativa para aumentar el conjunto de semillas y garantizar una alta productividad (Dongarwar y Thakur, 2014; Gupta et al., 2017). La polinización manual también evita el cruce entre individuos no deseados para garantizar que las plantas produzcan semillas que sean de tipo deseado.

El éxito de la polinización artificial o natural depende en gran medida de la preparación de los órganos reproductores masculinos y femeninos para someterse a la fertilización y el posterior desarrollo del cigoto. Esto está indicado por la viabilidad de los granos de polen y la receptividad del estigma (Zulkarnain et al., 2019). A menudo se encuentra que en ciertas plantas la hibridación en condiciones naturales no es posible porque la maduración de los órganos reproductores masculinos y femeninos no tiene lugar simultáneamente debido a una amplia variación en la respuesta de floración, por ejemplo, en *Pistacia vera* (Vithanage y Alexander, 1985). Además, se debe considerar la presencia de cutícula estigmática en los procesos de interacción polen-pistilo (Edlund et al., 2004). El polen no germinará hasta que la cutícula se rompa, a pesar de que la planta es totalmente autocompatible (Shivanna y Rangaswamy, 2012). Esto se debe a que la cutícula estigmática representa una barrera física que evita el contacto entre el polen y el estigma (Costa et al., 2014). El reconocimiento adecuado de las sustancias proteicas, la penetración del tubo polínico en el

estigma y la coordinación entre las proteínas del polen y del pistilo son necesarios para lograr el crecimiento normal del tubo polínico (Thiyagu et al., 2008). Cuando los granos de polen logran atravesar la superficie estigmática, los tubos polínicos en crecimiento son guiados al micropilo por señales que se originan en el estilo y el saco embrionario (Lord y Russell, 2002), para la doble fecundación.

La receptividad del estigma es otro aspecto que juega un papel importante en las hibridaciones exitosas. Para que ocurra la fertilización, no solo los granos de polen deben estar en un estado viable, sino que también el estigma debe estar en una condición receptiva. Arathi et al. (2002) sugirieron que la receptividad del estigma es un determinante importante del éxito reproductivo en las plantas.

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar dos métodos de cruzamientos controlados en ambientes diferentes. Lo que nos permite comprender y ajustar aspectos importantes para garantizar técnicas adecuadas de obtención de nuevos genotipos por el fitomejorador.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1. LOCALIZACIÓN

La investigación se llevó a cabo en la granja experimental de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba, Montería – Córdoba, cuyas coordenadas geográficas son 8° 45' N y 75° 53' W, una altitud de 15 m.s.n.m. Su clasificación climatológica corresponde a bosque seco tropical, con temperatura media de 27.4 °C, precipitación por año de 1346 mm, humedad relativa de 85% y brillo solar de 2108 horas solar anual (Palencia et al., 2006).

2.2. VARIABLES E INDICADORES

2.2.1. Variables dependientes. Corresponden a las variables que han sido definidas para llevar a cabo la investigación:

- Porcentaje de cruzamientos viables (%)

2.2.2. Variables independientes. Corresponden a los cultivares evaluados:

- Casa malla: Caupicor 50, BRS Milenium e IT86.
- Campo: IT86, BRS Milenium y Missouri.

2.3. PROCEDIMIENTO

Para este estudio se utilizaron tres genotipos en cada ambiente; en casa malla se utilizaron como madre Caupicor 50 y BRS Milenium y actuó como padre el genotipo IT86, para el experimento en campo se usó como madre el genotipo Missouri y como padres los genotipos BRS Milenium e IT86. En casa malla, las plantas se establecieron en macetas de 8Kg de capacidad de suelo, para cada

genotipo se sembraron 30 plantas; en campo se establecieron parcelas de 8 surcos de 10 metros de largo, con distancia entre surco de 1.2m y entre plantas de 0.6m; se sembraron primero los genotipos más tardíos (BRS Milenium e IT86) con intervalo de 5 días para los genotipos más precoces. Los cruzamientos se realizaron utilizando dos métodos, los cuales se describen a continuación. Se realizaron 7 cruces para cada momento (7:00am, 9:00am, 3:00pm, 5:00pm), para cada hora se tomaron registros de temperatura y humedad relativa con un termo higrómetro marca Brixco (Modelo 5015). La variable a medir fue el número de cruces efectivos o viables, considerados estos en los cuales se observó la formación de vainas con presencia de semillas.

Método 1. Propuesto por Kheradnam y Niknejad (1971) y Zary y Miller Junior (1982); se utilizó polen de flores recolectadas en la mañana; los botones en preantesis fueron emasculados y polinizados la misma mañana.

Método 2. Esta metodología es propuesta por Rachie et al. (1975) y Zary y Miller Junior (1982), polen de flores recogidas en la mañana (flor abierta) y almacenadas en nevera hasta su uso. Al final de la tarde, los botones florales fueron emasculados y polinizados.

En cada método la emasculación y polinización se llevó a cabo de siguiente manera:

En la emasculación, la yema se tomó suavemente para evitar cualquier tipo de estrés o lesión, se sostenía con el dedo pulgar y el índice, el estandarte se separó con una pinza de punta fina deslizando la punta a lo largo de la sutura, se desdobra y se extiende hacia atrás junto con las alas. La quilla se quita con la pinza, exponiendo los estambres y el estigma. Los estambres debe quitarse agarrando firmemente los filamentos y procediendo con cuidado para asegurarse de que se eliminen los 10, asegurándose que no se rompan las anteras y se evite

cualquier daño o contacto con el estigma; se debe verificar con una lupa la superficie estigmática para detectar la presencia de polen antes de intentar la polinización cruzada.

La polinización se llevó a cabo inmediatamente después de la emasculación. Se obtuvieron flores recién abiertas (entre las 6:30am y 7:00am), vigorosas y sin ningún daño mecánico, para ser usadas inmediatamente (para el método dos, se almacenaron bolsas de papel y se mantuvieron a 25°C, para ser usados en la tarde). Para exponer el saco de anteras, los pétalos fueron removidos con una pinza. El polen depositado en las vellosidades inmediatamente debajo del estigma y de las anteras se frotó suavemente sobre el estigma de la flor emasculada (planta madre). El estigma se devolvió a la quilla y se cerró con el ala y los pétalos estándar inmediatamente después de la polinización para evitar la desecación.

Cada cruzamiento se identificó con etiquetas de colores vivos en el pedicelo de la flor, en las cuales se registraron el nombre de identificación del genotipo que actuó como progenitor femenino y del progenitor masculino, la fecha y la hora en que se realizó la polinización. La efectividad de fecundación se valoró realizando seguimientos hasta los tres días, considerando viables aquellos donde se observó la vaina en crecimiento.

2.4. ANALISIS ESTADISTICO

Se realizaron análisis de correlación de Spearman, considerando el porcentaje de cruzamientos viables con temperatura y humedad relativa.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

La forma más común de obtener variabilidad en la mejora genética de los frijoles ha sido mediante la recombinación de diferentes genotipos, mediante el uso de hibridaciones artificiales. El éxito de obtener cruzamientos viables en frijol caupí, exige conocer la biología y estructura floral de dicha especie. Los resultados obtenidos de los cruzamientos realizados en campo y casa malla, utilizando dos métodos se muestran en las Tablas 1 y 2.

En casa malla, la efectividad en los cruzamientos Caupicor 50 x BRS Milenium con el método uno fue 33,3%, que corresponde a los iniciados a las 7:00am, mientras que a las 9:00am se obtuvieron resultados superiores con 50,0%, para el mismo cruzamiento (Tabla 1); en contraste con los resultados cuando se utilizó el método dos, donde solo hubo éxito en los cruzamientos iniciados a las 5:00pm con 16,7% de efectividad. Estos resultados contrastan con los realizados por Nameirakpam y Khanna (2018) en frijol caupí, donde realizaron la polinización en horas de la mañana entre las 9:00 - 11:00am inmediatamente después de la emasculación, obteniendo porcentajes de cuajado entre 54,55 y 70,59%.

Tabla 1. Porcentaje de cruzamientos viables (P.C.V) en frijol caupí realizados en casa malla, utilizando dos métodos de hibridación. Montería, 2020

CRUZAMIENTO	MÉTODO	HORA	P.C.V (%)	TEMP	HR
CAUP.50 x BRS M	1	7:00am	33,3	27,0	83,0
		9:00am	50,0	31,2	71,0
	2	3:00pm	0,0	33,7	61,0
		5:00pm	16,7	32,8	59,0
BRS M x IT86	1	7:00am	0,0	27,1	81,7
		9:00am	33,3	31,2	71,0
	2	3:00pm	0,0	33,7	61,0
		5:00pm	16,7	32,8	59,0

CAUP.59: Caupicor 50; BRS M: BRS Milenium; TEMP: Temperatura °C; HR: Humedad Relativa; Método 1: Emasculación y polinización en la mañana; Método 2: Emasculación y polinización en la tarde (polen colectado en la mañana).

Investigaciones realizadas por Teófilo et al. (1975), sobre polinización artificial de caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) en condiciones de invernadero, obtuvieron porcentaje de fertilización de 29,72% y de abscisión de 70,28%. Venter (1996), informa que las condiciones controladas del invernadero fueron más beneficiosas para una polinización cruzada exitosa en frijol caupí, que las condiciones variables del campo.

Wasonga et al. (2020), en hibridaciones en dos especies de *Crotalaria spp*, en dos horarios del día en invernadero, reportan que en los cruces realizados a las 7:00am mostró una tasa de éxito media del 61%, en los cruces realizados a las 5:00pm se registró una tasa de éxito del 55%. Así mismo argumentan que la etapa de desarrollo del capullo de la flor influyó en la tasa de éxito de la polinización artificial en *Crotalaria*.

Cuando se cruzaron los genotipos BRS Milenium x IT86, utilizando el método uno, solo hubo éxito en los cruzamientos iniciados a las 9:00am con 33,3%, mientras que con el método dos solo se obtuvo un 16,7% de efectividad a las 5:00pm (Tabla 1). Resultados similares a los obtenidos con el método uno fue reportado por De Sousa y De Alcantara (2020), en cruzamientos controlados realizados en frijol común, donde obtuvieron un 33,3% de vainas normales. Nunes et al. (2010), obtuvo el mayor número de vainas colectando pólen en la mañana, emasculando y polinizando en la tarde, con una tasa de éxito del 10,52%. Estudios realizados por Myers (1991) recomienda que en el caso del caupí, la emasculación se lleve a cabo por la noche entre las 16:00 y las 18:00 horas, seguida de la polinización a las 6:00 y las 08:00 horas del día siguiente cuando comienza la antesis.

Ting et al. (2014), declaró que el éxito de la hibridación incluye la capacidad de la planta donante para producir polen viable y el tiempo de duración de la viabilidad del polen. Aunque Jiang et al. (2019), manifiestan que aun si los granos de polen son viables, los pasos posteriores de polinización y fertilización pueden fallar

cuando se registran temperaturas altas. Estos pasos sensibles al calor son: la receptividad del estigma al polen, la retención de granos de polen en las superficies del estigma, la hidratación exitosa del polen y la germinación del tubo polínico (Kaushal et al., 2016; Sita et al., 2017). En la presente investigación, los cruzamientos realizados a las 3:00pm, los registros de temperatura fue la más alta (33,7°C) y es posible que explique el fracaso, para la germinación del grano de polen y crecimiento del tubo polínico (Tabla 1). Así mismo autores como Warrag y Hall (1984), Gross y Kigel (1994), reportan que incluso con una fertilización exitosa a partir de polen y óvulos viables, un embrión aún puede abortar bajo condiciones de estrés por calor. Boukar et al. (2015), manifiestan que, aunque la emasculación y la polinización se pueden llevar a cabo durante todo el día, la hibridación del caupí es menos efectiva cuando prevalecen temperaturas es altas. Por tanto, se ha sugerido que la polinización debe realizarse en la mañana entre 5:00am a 7:00am (Bhanu et al., 2018). Estudios realizados por Onwubiko et al. (2011) en *Vigna Subterranea*, sugirió que la polinización debe completarse dentro de las 12 horas posteriores a la emasculación, y que el período de floración se produce entre las 7:00am y las 10:00am cuando se puede realizar la polinización.

En los cruzamientos Caupicor 50 x BRS Milenium y BRS Milenium x IT86, se destaca que, se obtuvo mayor éxito a las 9:00 am con el método uno con porcentajes de cruzamientos viables de 33,3% y 50,0% respectivamente (Tabla 1); es de destacar que además de las condiciones que prevalezcan tanto ambientales como las intrincadas del polen con del estigma, es relevante la destreza que se tenga al momento de manipular los botones florales en la emasculación y la polinización. Con el método dos, en los cruces mencionados, solo se obtuvo un 16,7% de efectividad a las 5:00pm.

Los cruzamientos realizados en campo para los dos métodos, se obtuvo que el cruzamiento de Missouri x IT86 (Tabla 2), con el método uno, el porcentaje de

cruzamientos viables fue de 42,9% y 57,1% a las 7:00 y 9:00 am respectivamente; con el método dos para el cruzamiento en mención solo hubo efectividad de tan solo un 7,1% a las 5:00 pm. En el cruzamiento Missouri x BRS Milenium, se obtuvieron resultados que variaron de 50,0 y 78,6% a las 7:00 y 9:00 am respectivamente (Tabla 2); cuando se utilizó el método dos, se obtuvo un 7,1% a las 3:00 pm. Resultados similares a los obtenidos con el método dos entre Missouri x BRS Milenium reporta Rangkham y Khanna (2018), en hibridaciones en caupí, obteniendo resultados de cuajado de 60,0 y 76,2%. Tondonba et al. (2018), llevaron a cabo cruces de genotipos de *Vigna mungo*, obtuvieron rangos de éxitos de 58,33 y 70,58%, realizándolos entre las 4:30 y 5:00am inmediatamente después de la emasculación.

Tabla 2. Porcentaje de cruzamientos viables (P.C.V) en frijol caupí realizados en campo, utilizando dos métodos de hibridación. Montería, 2020

CRUZAMIENTO	MÉTODO	HORA	P.C.V (%)	TEMP	HR
MISSOURI x IT86	1	7:00am	42,9	29,9	78,5
		9:00am	57,1	39,4	45,5
	2	3:00pm	0,0	37,5	48,0
		5:00pm	7,1	27,5	78,0
MISSOURI x BRS M	1	7:00am	50,0	29,9	78,5
		9:00am	78,6	39,4	45,5
	2	3:00pm	7,1	37,5	48,0
		5:00pm	0,0	27,5	78,0

BRS M: BRS Milenium; TEMP: Temperatura (°C); HR (%): Humedad Relativa, Método 1: Emasculación y polinización en la mañana; Método 2: Emasculación y polinización en la tarde (polen colectado en la mañana).

Los resultados anteriores muestran que las hibridaciones en campo, con el método uno (emasculando y polinizando en la mañana), la efectividad de cuajado en los cruzamientos es superior, con respecto a los resultados obtenidos con el método dos (emasculando y polinizando en la tarde, con polen de flores colectadas en la mañana).

Los métodos de hibridación artificial en caupí difieren en términos de la técnica y el tiempo de emasculación del botón floral, en términos de recolección y uso de polen y en términos de tiempo de polinización. Som y Hazra (1993), señalan que la hibridación más exitosa se logró emasculando botones florales entre 12 a 15 horas antes de la apertura de la flor, y la hora de polinización más adecuado fue hasta las 7:00am; así mismo advierten que el papel de la diversidad genética en la determinación del éxito del cruce está fuertemente implicado: cuanto mayor sea la divergencia genética entre los padres, menor será el éxito del cruce. Por tanto, se debe tener en cuenta que las diferencias extremas en el tiempo de realizar la emasculación y la polinización pueden estar asociadas con las diferentes condiciones ambientales en las que se realizaron los cruces, así como con las diferencias genotípicas y de especies (Mohammed et al., 2015).

Autores como Adewale y Adegbite (2018), investigando los mecanismo de reproducción del *Sphenostylis stenocarpa* (Fabaceae), en tratamientos donde se emascularon por la mañana y embolsaron durante 24 horas; la polinización manual con pólenes de la misma planta y pólenes de otra accesión, frotando la antera dehiscente en el extremo estigmático de las flores emasculadas un día después de la emasculación, con los siguientes resultados: se evidencio una mayor tasa de éxito de 46,5% en la autofecundación artificial (polen de la misma planta), en comparación con el 32,3% de los cruces entre diferentes accesiones.

En la presente investigación con el método uno (emasculando y polinizando en la mañana), en los dos ambientes se registraron los mayores porcentajes de cruzamientos viables; lo anterior contrasta con trabajos realizados por Rêgo et al. (2006), usando cuatro métodos de cruzamientos en diferentes genotipos de frijol caupí, concluyendo que el porcentaje de éxito con el método dos fue mayor con 44,9% y con el método uno mostro un porcentaje de pega de alrededor de 24,6%. Estos resultados confirmaron los obtenidos por Zary y Miller Junior (1982), indicando una mayor eficiencia del método dos.

Llevar a cabo procesos de hibridación artificial, requiere previo conocimiento de aspectos relevantes en la biología floral de la especie, como: hora de inicio de la anthesis, receptividad estigmática y viabilidad del polen, así como también tener en cuenta las condiciones ambientales prevalecientes como temperatura y humedad relativa. Merin et al. (2019), evaluaron el porcentaje de frutos cuajados en *Vigna unguiculata* sub sp. *Sesquipedalis*, emasculando al final de la tarde y polinizando al día siguiente en la mañana, encontraron mayor porcentaje de cuajado 36,8% entre las 6:30am - 7:30am en comparación con el intervalo de tiempo de 7:30am a 8:30 am que fue de 23,8%. Parrotta et al. (2016) y Snider et al. (2009), señalan que el estrés por calor conduce a un contenido reducido de carbohidratos en los granos de polen junto con bajas reservas de energía en el pistilo, lo que a su vez reduce la energía disponible para el tubo polínico en crecimiento, produciendo efectos negativos en la fecundación. La temperatura moderada y el aumento de la humedad parecen aumentar el porcentaje de vainas establecidas después de cruces emasculados a mano. En general, la tasa de formación de vainas varía enormemente con las condiciones ambientales, el genotipo y las técnicas de manipulación (Boukar et al., 2015).

Subroto et al. (2018), en cruzamientos entre diferentes géneros de *Vigna*, siguiendo el método de realizar la emasculación por la tarde para botones florales que florecerían al día siguiente, quitando un tercio de los pétalos y eliminando todas las anteras, y realizando la polinización en la mañana siguiente adhiriendo polen en el pistilo de las flores emasculadas; lo consideran como método eficaz para generar variabilidad genética. Igual metodología (emascular las flores del progenitor femenino un día antes de la anthesis y polinizar a la mañana siguiente) utilizó Fatokun (1991), en cruzamientos de *V. vexillata* con *V. unguiculata*, sin resultados positivos, atribuyéndolo a barreras reproductivas entre las especies. De igual manera Thiyagu et al. (2008), indicó la presencia de barreras reproductivas de pre fertilización que dificultan la introgresión al observar un bajo porcentaje de

formación de vainas en el cruce de *V. radiata* × *V. umbellata* (12,89%) y *V. mungo* × *V. umbellata* (5,56%).

Con los resultados aportados en la presente investigación es posible adelantar mejoramiento genético del frijol caupí mediante el cruzamiento de genotipos que muestren características deseables; estos trabajos se vienen realizando en diferentes zonas del mundo con el fin de ajustar metodologías de acuerdo a las condiciones o factores ambientales prevalecientes. Por ejemplo, Subroto et al. (2018), realizaron hibridaciones artificiales entre *V. radiata*, *V. umbellata*, *V. unguiculata* y *V. sesquipedalis*, con el objeto de mejorar la variabilidad genética y los antecedentes genéticos del germoplasma de *Vigna* mediante la hibridación interespecífica, encontraron que los híbridos eran viables y fértiles, el coeficiente de variación genotípico y el coeficiente de variación fenotípico fueron diferentes entre combinaciones cruzadas y entre rasgos cuantitativos.

Los diferentes cruzamientos realizados en condiciones de campo y casa malla, no muestran significancia y la magnitud en las correlaciones de P.C.V con la temperatura es de $r= 0,59$ y $r= - 0,53$ respectivamente; los resultados muestran que en asociación de la variables existe un efecto contrario en campo y casa malla, indicando que a medida que la temperatura aumenta el porcentaje de cruzamientos viables también lo hacen, y en casa malla es contrario el efecto; la magnitud de la correlación de P.C.V con la humedad relativa es bajo y sin efecto significativo (Tabla 3). Los resultados muestran efectos divergentes entre los métodos con los cambios en los factores ambientales; en campo y casa malla se observa que, al aumentar la temperatura, existe mayor efectividad en los cruzamientos utilizando el método uno, entre tanto los resultados con el método dos, en casa malla y en campo no muestra tendencias claras. Al disminuir la humedad relativa en los dos ambientes se muestra una tendencia positiva en el cuajado de los cruzamientos cuando se utilizó el método uno, con el método dos

presenta un efecto contrario en campo y en casa malla no se registraron cambios relevantes en la humedad relativa (Tabla 1 y 2).

Tabla 3. Correlación de Spearman para porcentaje de cruzamientos viables (P.C.V) en frijol caupí realizados en campo y casa malla.

FACTORES	CAMPO	CASA MALLA
	P.C.V	P.C.V
TEMPERATURA (°C)	0,59 ns	-0,53 ns
HUMEDAD RELATIVA (%)	-0,29 ns	0,28 ns

El proceso de desarrollo del polen y gineceo, la sincronía del estambre y la fertilización son muy sensibles a las altas temperaturas (Thuzar et al., 2010). Khattak et al. (2009), en trabajos en *Vigna radiata* informan que la alta temperatura puede causar el secado del estigma y el ovario o perturba la viabilidad de las anteras, por lo que la hibridación puede fallar causando el desprendimiento de flores sin iniciar la vaina. Es importante tener en cuenta que los cambios que proceden y acompañan a la germinación son rápidos y dramáticos (Gill, 2014). La permeabilidad de la plasmalema del polen se altera durante la hidratación del polen en el momento de la germinación (Wang et al., 2004).

Los resultados del presente estudio mostro que el ambiente juega un papel importante en la efectividad de los cruzamientos. Pípolo et al. (2001), en cruzamientos en *Phaseolus vulgaris*, en diferentes horas del día (10, 12 y 15 horas) y en dos épocas diferentes, reporta que el mayor porcentaje lo obtuvo a las 15:00 horas en las dos épocas.

4. CONCLUSIONES

El método uno (emasculando y polinizando en la mañana), en el horario de 7:00am a 10:00am, en los dos ambientes se registraron los mayores porcentajes de cruzamientos viables.

El porcentaje promedio de cruzamientos viables con el método uno en casa malla fue de 29,15% y en campo fue de 57,15%, a pesar que bajo estas condiciones (campo) los registros de temperatura fueron más altos y los de humedad relativa los más bajos.

Con el método dos (colectando el polen en la mañana, emasculando y polinizando en la tarde), el promedio más alto se logró a las 5:00pm en casa malla con un 16,7%; en contraste con los resultados nulos en los iniciados a las 3:00pm.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Adewale, D. B., y Adegbite, A. E. (2018). Investigation of the breeding mechanism of African yam bean [Fabaceae] (*Sphenostylis stenocarpa* Hochst. Ex. A. Rich) Harms. *Notulae Scientia Biologicae*, 10(2), 199-204.
- Arathi, H. S., Rasch, A., Cox, C., y Kelly, J. K. (2002). Autogamy and floral longevity in *Mimulus guttatus*. *International Journal of Plant Sciences*, 163(4), 567-573.
- Bhanu, A. N., Singh, M. N., y Srivastava, K. (2018). Efficient hybridization procedure for better pod setting in inter-specific crosses involving vigna species. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 8(2), 112-116.
- Boukar, O., Fatokun, C. A., Roberts, P. A., Abberton, M., Huynh, B. L., Close, T. J., Boahen, S. K., Higgins, T. J. y Ehlers, J. D. (2015). Cowpea. In *Grain Legumes* (pp. 219-250). Springer, New York, NY.
- Boukar, O., Togola, A., Chamarthi, S., Belko, N., Ishikawa, H., Suzuki, K., y Fatokun, C. (2019). Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] Breeding. In *Advances in Plant Breeding Strategies: Legumes* (pp. 201-243). Springer, Cham.
- Costa, M. F. B., Paulino, J. V., Marinho, C. R., Leite, V. G., Pedersoli, G. D., y Teixeira, S. P. (2014). Stigma diversity in tropical legumes with considerations on stigma classification. *The Botanical Review*, 80(1), 1-29.
- De Sousa, C. M., y De Alcantara, C. B. (2020). Cruzamento Entre As Cultivares De Feijão Brs-Majestoso E Iac-Imperador Pelo Método Da Hibridação. *Saúde y Meio Ambiente*, 7(1), 112-122.
- Dongarwar, N., y Thakur, U. (2014). Artificial pollination and its role in orchid conservation. *A Glimpse of current vistas in Plant Science Research. Nagpur, India: Hislop College Publication Cell*, 123-140.

- Edlund, A. F., Swanson, R., y Preuss, D. (2004). Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *The Plant Cell*, 16(suppl 1), S84-S97.
- Fatokun, C. A. (1991). Wide hybridization in cowpea: problems and prospects. *Euphytica*, 54(2), 137-140.
- Fatokun C. A., y Ng Q. (2007). Outcrossing in cowpea. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 5:334-338.
- Gill, M. U. K. T. I. (2014). Pollen storage and viability. *Int. J. Bot. Res*, 4, 1-18.
- Gross, Y., y Kigel, J. (1994). Differential sensitivity to high temperature of stages in the reproductive development of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research*, 36(3), 201-212.
- Gupta, A., Godara, R., Sharma, V., y Panda, A. (2017). Artificial pollination: a tool for improving fruiting traits in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Chemical Science Review and Letters*, 6, 1312-1320.
- Jiang, Y., Lahlali, R., Karunakaran, C., Warkentin, T. D., Davis, A. R., y Bueckert, R. A. (2019). Pollen, ovules, and pollination in pea: Success, failure, and resilience in heat. *Plant, cell & environment*, 42(1), 354-372.
- Kaushal, N., Bhandari, K., Siddique, K. H., y Nayyar, H. (2016). Food crops face rising temperatures: an overview of responses, adaptive mechanisms, and approaches to improve heat tolerance. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1134380.
- Khattak, G. S. S., Saeed, I., y Muhammad, T. (2009). Flowers' shedding under high temperature in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Pak. J. Bot*, 41(1), 35-39.
- Kheradnam, M., y Niknejad, M. (1971). Crossing technique in cowpeas. *Iran Agricultural Research*, 1(1), 57-58.
- Lord, E. M., y Russell, S. D. (2002). The mechanisms of pollination and fertilization in plants. *Annual review of cell and developmental biology*, 18(1), 81-105

- Mangena, P., y Mokwala, P. W. (2018). Introductory chapter: pollination. *Pollination in plants*. London: IntechOpen Limited, 1-6.
- Merin, E. G., Sarada, S., y Celine, V. A. (2019). Pod set and pollen viability studies in yard long bean (*Vigna unguiculata* sub sp. sesquipedalis). *Journal of Horticultural Sciences*, 14(2), 169-172.
- Meyers, G. O. (1991). Hand Crossing of cowpeas. *IITA Research Guide*, (42).
- Mohammed, M. S., Shimelis, H. A., y Laing, M. D. (2015). Preliminary investigation of the crossing of bambara nut (*Vigna subterranea* [L.] Verdc.). *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 8(2), 225-232.
- Nameirakpam, B., y Khanna, V. K. (2018). Studies on Crossability and Genetic Diversity in Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources*, 13(1), 08-16.
- Nunes, E. D., Santos, C. A. F., Medeiros, A. G., Diniz, L. S., y Costa, S. R. (2010). Hibridação artificial em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* Walp) em diferentes cultivares. In *Embrapa Semiárido-Resumo em anais de congresso (ALICE)*. In: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 18., 2010, Jequié. Genética, biodiversidade e conservação. Jequié: UESB: Sociedade Brasileira de Genética, 2010.
- Onwubiko, N. I. C., Odum, O. B., Utazi, C. O., y Poly-Mbah, P. C. (2011). Studies on the adaptation of Bambara Groundnut [*Vigna Subterranea* (L.) Verdc] in Owerri Southeastern Nigeria. *New York Science Journal*, 4(2), 60-67.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2018). Legumbres. Pequeñas semillas, grandes soluciones. Ciudad de Panamá. P 58-61.
- Palencia, G., Mercado, T., y Combatt, E. (2006). Estudio agroclimático del departamento de Córdoba. Editorial Gráficas el Caribe, Montería. 126 p.
- Parrotta, L., Faleri, C., Cresti, M., y Cai, G. (2016). Heat stress affects the cytoskeleton and the delivery of sucrose synthase in tobacco pollen tubes. *Planta*, 243(1), 43-63.

- Pípolo, V. C., Vizoni, É., y Giroto, J. C. M. (2001). Determinação do melhor período para realização de cruzamento artificial em feijão-vagem, *Phaseolus vulgaris* L., em Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 23, 1191-1193.
- Rangkham, T., y Khanna, V. K. (2018). Studies on Hybridization and Genetic Diversity in Cowpea (*Vigna unguiculata* L). *Open Acc J Oncol Med* 2 (1). 125-134.
- Rachie, K. O., Rawal, K. M., Franckowiak, J. D. (1975). A rapid method for hand crossing cowpeas. Ibadan: IITA. 5 p. (IITA. Technical Bulletin, 2).
- Rêgo, M., Lopes, A. D. A., Rocha, M. D. M., Freire Filho, F. R., Ribeiro, V., Y Sousa, I. D. S. (2006). Avaliação de métodos de cruzamentos artificiais em feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]. In *Embrapa Meio-Norte-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 1.; REUNIÃO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 6., 2006, Teresina. Tecnologias para o agronegócio: anais. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2006.
- Shivanna, K. R., y Rangaswamy, N. S. (2012). Pollen biology: a laboratory manual. Springer Science & Business Media. 119p.
- Sita, K., Sehgal, A., Kumar, J., Kumar, S., Singh, S., Siddique, K. H., y Nayyar, H. (2017). Identification of high-temperature tolerant lentil (*Lens culinaris* Medik.) genotypes through leaf and pollen traits. *Frontiers in Plant Science*, 8, 744.
- Snider, J. L., Oosterhuis, D. M., Skulman, B. W., y Kawakami, E. M. (2009). Heat stress-induced limitations to reproductive success in *Gossypium hirsutum*. *Physiologia plantarum*, 137(2), 125-138.
- Som, M. G., y Hazra, P. (1993). Cowpea: *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In *Genetic Improvement of Vegetable Crops* (pp. 339-354). Pergamon.
- Subroto, G., Ujjanto, L., y Yakop, U. M. (2018). Interspecific hybridization among vigna species to create new superior variety containing high protein and anthocyanin. *International Journal of Agricultural Science*, 33p.

- Teófilo, E. M., Paiva, J. B., y SM Filho, P. A. E. F. (1975). Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). *Ciência e Agrotecnologia*, 25(1), 220-223.
- Thuzar M, Puteh AB, Abdullah NAP, Lassim MM, Jusoff, K (2010) The effects of temperature stress on the quality and yield of soya bean [(*Glycine max* L.) Merrill.]. *J Agric Sci* 2:172.
- Ting, P., Tu, Y., Lin, C., Chang, H., Chen, L., y Chan, L. (2014). Reproductive fitness of outcrossed hybrids between transgenic Broccoli (*Brassica oleracea*) carrying the ipt transgene and conventional varieties of kale, broccoli and cauliflower. *Pakistan Journal of Botany*, 46(4), 1437-1444.
- Tondonba, S. P., Khanna, V. K., y Tejaswini, V. U. (2018). Crossability Studies and Genetic Diversity Analysis in Blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) Using Molecular Markers. 7: 179. 2-8.
- Thiyagu, K., Jayamani, P., y Nadarajan, N. (2008). Pollen Pistil Interaction in Inter-Specific Crosses of *Vigna* sp. *Cytologia*, 73(3), 251-257.
- Venter, H. M. (1996). Difficulties with cross-pollinating five cowpea lines: technique development. In *The Biodiversity of African Plants* (pp. 656-660). Springer, Dordrecht.
- Vithanage, H. I. M. V., y Alexander, D. M. (1985). Synchronous flowering and pollen storage techniques as aids to artificial hybridization in pistachio (*Pistacia* spp.). *Journal of horticultural science*, 60(1), 107-113.
- Wasonga, M. A., Arunga, E. E., Neondo, J. O., Muli, J. K., Kamau, P. K., & Budambula, N. L. (2020). A hybridization technique for orphan legumes: development of an artificial interspecific pollination protocol for *Crotalaria* spp. *Journal of Crop Improvement*, 1-12.
- Warrag, M. O. A., y Hall, A. E. (1984). Reproductive responses of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) to heat stress. II. Responses to night air temperature. *Field Crops Research*, 8, 17-33.
- Zulkarnain, Z., Eliyanti, E., y Swari, E. I. (2019). Pollen viability and stigma receptivity in *Swainsona formosa* (G. Don) J. Thompson (*Fabaceae*), an

ornamental legume native to Australia. *Ornamental Horticulture*, 25(2), 158-167.

Zary, K. W., Miller Junior, J. C. (1982). Comparison of two methods of hand-crossing *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Hort Science*, Alexandria, 17(2): 246-248.

Wang, M. L., Hsu, C. M., Chang, L. C., Wang, C. S., Su, T. H., Huang, Y. J. J., ... y Jauh, G. Y. (2004). Gene expression profiles of cold-stored and fresh pollen to investigate pollen germination and growth. *Plant and cell physiology*, 45(10), 1519-1528.

**CAPITULO V: EFECTO DEL ALMACENAMIENTO DE POLEN DE FRIJOL
CAUPI (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) SOBRE LA VIABILIDAD EN DOS
AMBIENTES EN MONTERIA – CORDOBA.**

**CHAPTER V: EFFECT OF THE STORAGE OF CAUPI BEAN POLLEN (*Vigna
unguiculata* L. (Walp.)) ON THE VIABILITY IN TWO ENVIRONMENTS IN
MONTERIA - CORDOBA.**

RESUMEN

La posibilidad de mantener la viabilidad del polen a través del proceso de conservación depende de factores como el estado fisiológico de la flor, la temperatura de almacenamiento, la humedad relativa y el contenido de humedad del polen. La presente investigación se llevó a cabo en la Universidad de Córdoba, la cual tuvo como objetivo evaluar efecto del almacenamiento de polen de frijol caupí (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) sobre la viabilidad en dos ambientes, la cual se evaluó, mediante el uso de métodos de tinción con acetocarmin al 1% y sal de tetrazolio al 3.0% mas 20% de sacarosa. El polen se obtuvo de la colecta de botones florales en anthesis, se eliminaron los pétalos y se procedió a extraer mediante vibraciones en las anteras con la ayuda de una aguja de disección en cajas de Petri, se colocó en un desecador que contenía 300g silica gel durante 14 horas, con el fin de bajar el contenido de humedad. Se almacenaron aproximadamente 0,2cc en microtubos con capacidad de 0,5cc; las muestras fueron almacenados a una temperatura de $1,1 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y HR 68% en nevera y $5,6 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ y HR 48% en cuarto frio durante 6 y 12 días. Se evaluó bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial de $2 \times 3 \times 3$ (2 ambientes, 3 tiempos de almacenado y 3 genotipos) con cuatro (4) repeticiones por tratamiento. Los resultados muestran que las condiciones de almacenamiento no afectaron la viabilidad de polen, por el contrario, el tiempo de conservación y las características del polen de cada genotipo ejercieron influencia en su viabilidad; con el test de acetocarmin se obtuvieron los valores más altos para porcentaje de polen viable (90%), en contraste con el test sal de tetrazolio el cual fue de un 70%.

Palabras clave: acetocarmin, tetrazolium, conservación.

ABSTRACT

The possibility of maintaining pollen viability throughout the preservation process depends on factors such as the physiological state of the flower, the storage temperature and the relative humidity and moisture content of the pollen. The present research was carried out at the University of Córdoba, which aimed to evaluate the effect of the storage of pollen of cowpea bean (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) On the viability in two environments, which was evaluated by means of the use of staining methods with 1% acetocarmin and 3.0% tetrazolium salt plus 20% sucrose. The pollen was obtained from the collection of flower buds in anthesis, the petals were removed and it was extracted by vibrations in the anthers with the help of a dissection needle in Petri dishes, it was placed in a desiccator containing 300g silica gel for 14 hours, in order to lower the moisture content. Approximately 0.2cc were stored in microtubes with a capacity of 0.5cc; The samples were stored at a temperature of 1.1 ± 0.5 ° C and 68% RH in a refrigerator and 5.6 ± 1.0 ° C and 48% RH in a cold room for 6 and 12 days. It was evaluated under a completely randomized design with a 2x3x3 factorial arrangement (2 environments, 3 storage times and 3 genotypes) with four (4) repetitions per treatment. The results show that the storage conditions did not affect the viability of pollen, on the contrary, the conservation time and the characteristics of the pollen of each genotype influenced their viability; With the acetocarmin test, the highest values were obtained for percentage of viable pollen (90%), in contrast to the tetrazolium salt test which was 70%.

Keywords: acetocarmin, tetrazolium, conservation.

1. INTRODUCCIÓN

Desde el siglo pasado, se han probado varios métodos para almacenar polen en diferentes especies (Yates et al., 1991; Connor y Towill, 1993; Spark y Yates, 2002), demostrando que la temperatura y el contenido de humedad son factores importantes que influyen en su conservación. La conservación del polen es una herramienta importante para el mantenimiento de los recursos fitogenéticos y puede promover una mayor eficiencia en los programas de mejoramiento y la conservación e intercambio de germoplasma. Mantener la capacidad de germinación del polen almacenado puede ser muy útil y, en particular, ahorrar tiempo en los programas de hibridación y en situaciones en las que es necesaria la polinización artificial, como plantas estériles alógamas o masculinas. Las plantas silvestres que se enfrentan a la extinción y los taxones cultivados podrían beneficiarse de las contribuciones de genomas silvestres, también son casos en los que se puede usar polen almacenado viable. El almacenamiento de polen también elimina la necesidad de cultivar continuamente líneas que se utilizan con frecuencia en los cruces. También proporciona una mayor flexibilidad en estudios experimentales sobre polen (Gill, 2014).

El almacenamiento de polen se considera el método más eficiente para superar las barreras a la hibridación entre plantas que florecen en diferentes momentos o que crecen en diferentes regiones. El almacenamiento a largo plazo se ha logrado entre diferentes métodos de almacenamiento, el almacenamiento en frío ha demostrado ser el método más económico y ampliamente utilizado para preservar el polen. Alba et al. (2011) sugirieron el uso de la criopreservación de polen usando nitrógeno líquido a -196°C . Se han publicado varios estudios sobre la determinación de las condiciones óptimas para mantener la viabilidad del polen durante un período más largo.

Para un programa de hibridación exitoso, se requiere un método confiable de almacenamiento de polen, controlando la temperatura y humedad de almacenamiento, este método se ha aplicado con éxito a una amplia gama de angiospermas como *Melaleuca alternifolia* (Baskorowati, 2009), *Cocus nucifera* (Machado et al., 2014), *Imperata cylindrica* (Rather et al., 2017) y Rosa híbrida (Giovannini et al., 2017). Pinney y Polito (1989) obtuvieron buenos resultados cuando el polen de aceituna se almacenó a 28% - 33% de HR a 20°C. Por consiguiente, la edad del polen, el estado fisiológico de la flor y el contenido de humedad del polen afectan la viabilidad durante el almacenamiento (Rosell et al., 2006; Soares et al., 2008). Para ser útil para la investigación, el polen preservado debe ser viable. Por lo tanto, esto debe ser monitoreado antes, durante y después del almacenamiento, para establecer el período máximo en el que el polen puede permanecer preservado sin perder sus propiedades y por lo tanto su capacidad de germinar (Souza et al., 2015).

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento de polen de tres genotipos de frijol caupí en dos ambientes. Con estos resultados se permite generar información pertinente sobre el tiempo de conservación del polen viable que puedan ser utilizados en procesos de hibridación.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1. LOCALIZACIÓN

La investigación se llevó a cabo en la granja experimental de la Facultad de Ciencias Agrícolas, de la Universidad de Córdoba, en Montería - Córdoba, cuyas coordenadas geográficas son 8° 45' N y 75° 53' W, una altitud de 15 m.s.n.m. Su clasificación climatológica corresponde a bosque seco tropical, con temperatura media de 27,4 °C, precipitación por año de 1346 mm, humedad relativa de 85% y brillo solar de 2108 horas solar anual (Palencia et al., 2006).

2.2. VARIABLES E INDICADORES

2.2.1. Variables dependientes. Corresponden a las variables que han sido definidas para llevar a cabo la investigación:

- Porcentaje de polen viable (%)
- Porcentaje de polen inviable (%)

2.1.1. Variables independientes. Corresponden a los cultivares evaluados:

- Caupicor 50, IT86 y BRS Milenium

2.3. PROCEDIMIENTO

Las flores para la extracción del polen se colectaron de las parcelas establecidas con genotipos que se utilizaron como padres para realizar los cruzamientos. Una vez los tres genotipos estuvieron en máxima floración se colectaron flores en anthesis entre las 7:00am y 8:00am y fueron almacenadas en bolsas de papel,

fueron conducidas al laboratorio de fitomejoramiento, seguidamente se eliminaron los pétalos y se procedió a extraer el polen mediante vibraciones en las anteras con la ayuda de una aguja de disección en cajas de Petri previamente identificadas; extraído el polen de cada genotipo se colocó en un desecador que contenía 300g silica gel durante 14 horas, con el fin de bajar el contenido de humedad. Después de ese período se procedió a tomar muestras para realizar la evaluación de viabilidad con los dos test (acetocarmin y tetrazolium), para considerarse como evaluación a los 0 días, paralelamente se almacenaron aproximadamente 0,2cc en microtubos con capacidad de 0,5cc; las muestras fueron almacenados a una temperatura de $1,1 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y HR 68% en nevera y $5,6 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ y HR 48% en cuarto frio durante 6 y 12 días. Las pruebas de viabilidad con acetocarmin al 1% y sal de tetrazolio al 3,0% más 20% de sacarosa se realizaron conforme se describió en el capítulo II.

Este experimento se evaluó bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial de $2 \times 3 \times 3$ (2 ambientes, 3 tiempos de almacenado y 3 genotipos) con cuatro (4) repeticiones por tratamiento.

2.4. ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó análisis de varianza para cada variable, pruebas de medias según Tukey y análisis de correlación de Spearman, utilizando el software Estadístico SAS versión 9.4.

Para la prueba con acetocarmin: La variable porcentaje de polen viable (PPV), se utilizó estadística no paramétrica por rangos de Kruskal y Wallis (1952) y para porcentaje de polen inviable (PPI), se realizó transformación raíz cuadrada ($Y+0,5$).

3. RESULTADOS Y DISCUSION

El almacenamiento, como medio para mantener la viabilidad del polen, es una herramienta valiosa empleada por los mejoradores y genetistas. El almacenamiento de polen se justifica en los programas de hibridación cuando hay un retraso en la floración entre las especies de interés, o cuando se encuentran en diferentes regiones.

Los resultados del análisis de varianza para esta investigación que consistió en almacenar por 6 y 12 días el polen de tres genotipos de frijol caupí en dos ambientes se muestra en la tabla 1.

El análisis de varianza para la viabilidad del polen de frijol caupí, para las variables porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen viable (PPI), cuando se utilizó la prueba de acetocarmin, las fuentes de variación tiempo de almacenamiento, la interacción almacenamiento por tiempo para PPI y la interacción tiempo por genotipo acusaron diferencias estadísticas, indicando que el tiempo de almacenamiento influye en las variables en estudio y ello, se corrobora con un cambio en la respuesta de los genotipos en función de la viabilidad del polen; en tanto que para almacenamiento, genotipo, interacción de almacenamiento por tiempo para PPV, almacenamiento con genotipo, y la interacción de los tres factores registraron ausencia de significancia (Tabla 1).

Los coeficientes de variación para las variables de respuesta cuando se probó la viabilidad con acetocarmin, correspondieron a 42,74% y 33,88% para PPV y PPI (Tabla 1), los cuales se consideran altos. Estos resultados divergen con los reportados por Machado et al. (2014), para viabilidad de polen de diferentes genotipos en diferentes condiciones de almacenamiento por 30 y 60 días con acetocarmin y germinación *in vitro*, donde los coeficientes de variación fueron de 5,14% y 10,17%. Con la prueba de tetrazolium, los coeficientes de variación

oscilaron entre 13,97% y 34,06% para PPV y PPI, valores que se acercan a los reportados por Araméndiz et al. (2013) en berenjena con registros de 15,73 % para polen viable y 25,10% para polen inviable, con el uso de test de tetrazolio a diferentes concentraciones.

Tabla 1. Cuadrados medios del análisis de varianza para las variables porcentaje de polen viable (PPV) e inviable (PPI) de tres cultivares de frijol caupí, almacenado en nevera y cuarto frío, Montería, 2020

FUENTE DE VARIACIÓN	GL	TEST- ACETOCARMIN		TEST- TETRAZOLIO	
		PPV	PPI	PPV	PPI
Almacenamiento	1	203,34ns	0,26ns	35,28ns	35,42ns
Tiempo	2	2488,62**	3,11**	843,54**	843,51**
Genotipo	2	56,57ns	0,09ns	1548,46**	1549,23**
Almacenamiento*Tiempo	2	728,18ns	0,86*	189,77ns	189,53ns
Almacenamiento*Genotipo	2	64,44ns	0,09ns	976,50**	975,85**
Tiempo*Genotipo	4	2486,96**	3,30**	1018,03**	1018,14**
Almacena.*Tiempo*Genotipo	4	79,91ns	0,09ns	602,85**	602,37**
Error	54	243,46	0,27	98,16	98,20
Total	71				
\bar{X}		36,50	1,54	70,91	29,08
C.V. (%)		42,74	33,88	13,97	34,06
R ²		0,56	0,60	0,72	0,71

*: significativo con $p \leq 0,05$; **: altamente significativo con $p \leq 0,001$; ns: no significativo con $p \leq 0,05$; G.L: Grados de libertad; CV: coeficiente de variación.

La viabilidad de polen para PPV y PPI con la aplicación del test de tetrazolio, registró diferencias estadísticas altamente significativas para las fuentes de variación estudiadas, excepto para almacenamiento y la interacción de almacenamiento con tiempo (Tabla 1). Se resalta que para la conservación de polen de frijol caupí, los diferentes genotipos y el tiempo de conservación influyen considerablemente en su viabilidad cuando se usa el test sal de tetrazolium. Es importante enfatizar que las pruebas de acetocarmin y tetrazolium esencialmente se diferencian en que la primera determina la integridad de la membrana o contenido citoplasmático; el citoplasma se tiñe de rojo en el polen viable y permanece transparente en el polen no viable (Nassar et al., 2000), mientras que

la prueba de tetrazolium determina la actividad enzimática de la deshidrogenasa en el polen; algunos autores han señalado que esta última, proporciona una estimación confiable de la viabilidad del polen porque los resultados son cercanos a los obtenidos con las pruebas de germinación *in vitro* (Huang et al., 2004; Abdelgadir et al., 2012). Sin embargos autores como Brambatti et al. (2016) y Santos et al. (2020), destacan que el tinte de carmín acético ha demostrado ser eficaz en estudios que estiman la viabilidad del grano de polen y se ha utilizado con diferentes especies de plantas. Es importante considerar que la integridad del grano de polen y la presencia de ADN no garantizan que sea fértil, ya que, según Dafni y Firmage (2000), los granos de polen viables pueden no germinar (*in vitro* o *in vivo*) si las condiciones no son las adecuadas y aunque lo haga, no hay garantía de que tenga la capacidad de fertilización.

En los ambientes considerados de cuarto frío y nevera, con registros de temperatura (T) y humedad relativa (HR) (T=1,1 ± 0,5°C y HR=68% nevera y T=5,6 ± 1,0°C y HR=48% en cuarto frío), para determinar la viabilidad de polen en los tres genotipos de *Vigna unguiculata* evaluados, los promedios para PPV son superiores al 97% y 70% con el test de acetocarmin y tetrazolium respectivamente, los cuales se consideran altos (Tabla 2). Con los resultados obtenidos en este estudio, se demuestra que dichas condiciones de temperatura permiten la reducción del metabolismo del polen y mantener su viabilidad en porcentajes altos durante el almacenamiento en nevera y cuarto frío; lo que concuerda con lo expresado por Cuchiara et al. (2012) y Aloisi et al. (2016). Autores como Dafni (1992), manifiestan que la prolongación de la viabilidad del polen conservado a 4°C parece estar determinada principalmente por una reducción en la actividad enzimática y la actividad celular.

Tabla 2. Prueba de medias para las variables porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI), almacenado en dos ambientes.

ALMACENAMIENTO	TEST ACETOCARMÍN		TEST TETRAZOLIO	
	PPV	PPI	PPV	PPI
CUARTO FRIO	97,80 a	2,19 a	71,61 a	28,38 a
NEVERA	97,41 a	2,58 a	70,21 a	29,78 a

Literales diferentes entre filas indican diferencia estadística entre medias ($P < 0,05$) según Tukey.

El tiempo de almacenamiento (6 y 12 días), afecta significativamente el porcentaje de polen viable e inviable en los dos test utilizados (acetocarmin y tetrazolio) (Tabla 1). Con la prueba de acetocarmin se destaca que los promedios de los 6 y 12 días después de almacenado no registran diferencias estadísticas (Tabla 3), el promedio a los 0 días resulto se inferior a los demás; es probable que se haya incurrido en un error en la interpretación de lectura en la prueba inicial o que dicha muestra contenía pólenes inmaduros que la prueba no alcanzo a detectar eficazmente. Al respecto Sparks y Yates (2002), encontraron que la viabilidad del polen de nuez (*Juglans regia*), aún era significativamente mayor que la del polen fresco después de haber sido criopreservado durante 13 años; igualmente son similares a resultados de Chaudhury et al. (2010), donde la viabilidad del polen de mango (*Mangifera Indica* L.) y Litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.) de diferentes cultivares fue mayor que la del polen fresco después de criopreservados durante 4 años. Así mismo Shekari et al. (2016), estudiaron la viabilidad de polen *Leonurus cardiaca* y encontraron que la razón de la baja germinación del polen recolectado un día antes de la antesis, se debió probablemente a la evolución incompleta del polen antes de la antesis.

Los resultados obtenidos con la prueba de acetocarmin para polen de frijol caupí almacenado por 12 días, registró promedios superiores a 98,0% de viabilidad. Marak y Wani (2018), reportan que el grano de polen de *Gliricidia sepium* cuando lo almacenaron a temperatura ambiente mostró que el porcentaje máximo de viabilidad del polen mediante la prueba de acetocarmina, fue de 87,50% en el

primer día de recolección de polen y disminuyó a 18,50% después de 15 días de almacenamiento. Lo cual genera una alternativa para futuras investigaciones en pruebas con polen de frijol caupí.

Tabla 3. Prueba de medias para las variables porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI), conservado por 6 y 12 días.

TIEMPO ALMAC	TEST ACETOCARMÍN		TEST TETRAZOLIO	
	PPV	PPI	PPV	PPI
0 días	96,20 b	3,79 a	64,84 b	35,15 a
6 días	98,36 a	1,63 b	76,68 a	23,31 b
12 días	98,25 a	1,74 b	71,21 ab	28,79 ab

Literales diferentes entre filas indican diferencia estadística entre medias ($P < 0,05$) según Tukey.

Con la prueba de tetrazolio, se observó un incremento en el promedio de PPV desde los 0 a 6 días de 64,84% a 76,68% y de los 6 a 12 días un leve descenso, pasando a 71,21% (Tabla 3). Marak y Wani (2018), almacenaron polen de *Gliricidia sepium* (fabaceae) por 90 días en tres ambientes, reportando que el almacenamiento a $-18 \pm 1^\circ\text{C}$ y $4 \pm 1^\circ\text{C}$ dio un porcentaje de germinación del 74,0% y del 75,0% después de 15 días, donde a los 0 días fue de 80%. Estudios de polen almacenado de *Vigna mungo* (fabaceae) a baja temperatura de -20°C y -30°C , mostró un mejor porcentaje de germinación en comparación con el polen almacenado a 4°C (Khan y Perveen 2006). Pio et al. (2007) al analizar el almacenamiento y la viabilidad del polen de cultivares de cítricos durante nueve semanas, encontraron que la viabilidad del grano de polen disminuyó con el aumento del tiempo de almacenamiento.

Así como en la prueba de acetocarmin a los 0 días, con la prueba de tetrazolium se presenta una situación similar, registrando promedio inferior a los demás (Tabla 3), lo cual posiblemente obedece al haber colectado pólenes inmaduros. Según Gibernau et al. (2003) y Khan y Perveen (2006), en los granos de polen almacenados a bajas temperaturas, no hay aumento de la viabilidad del polen durante el período de almacenamiento, sino más bien una disminución. Sin

embargo, Oliveira et al. (2001), sustenta que las diferencias observadas en cuanto a la germinación del polen, dentro de la misma temperatura, pero en diferentes momentos, pueden haber ocurrido debido a varios factores, como las condiciones de almacenamiento, el contenedor utilizado para almacenar el polen, humedad del grano de polen y el manejo de los contenedores.

Es evidente el contraste en los resultados de las dos pruebas para viabilidad de polen; las pruebas histoquímicas se utilizan para indicar la viabilidad del polen, pero estas pruebas reflejan solo la integridad de las estructuras celulares (Souza et al., 2017), lo cual radica en que el test con acetocarmin solo se evalúa la integridad de la membrana (Baez y Hernández, 2016), mientras que con la sal de tetrazolium se evalúa la actividad enzimática de la deshidrogenasa que está asociada con la respiración y a su vez con la capacidad de germinación del grano de polen (Endo et al., 2013). Coelho et al. (2012) en un estudio de viabilidad del grano de polen en accesiones de *Crotalaria juncea* L. (Fabaceae) usando orceína acética y tinción Alexander en 10 accesiones, concluyeron que hubo diferencias significativas entre tinciones, las cuales pueden deberse al modo de acción específico de cada tinción en la estructura citológica de los granos de polen.

Los promedios de polen viable e inviable de los genotipos evaluados con el test de tetrazolio, durante el periodo de almacenamiento (6 y 12 días), se destaca el genotipo Caupicor 50, el cual presento el promedio más alto de polen viable con 79,18% (Tabla 4); así mismo según esta prueba la viabilidad del polen del genotipo BRS Milenium fue la más afectada, con un promedio de 63,14%. Las diferencias en los promedios para PPV y PPI con la prueba de tetrazolio puede obedecer a las propiedades intrínsecas particulares proporcionadas por cada genotipo en la formación del polen (tamaño, contenido de azúcar y la presencia de ciertas proteínas protectoras (Campbell y Close, 1997) o la capacidad de resistencia a las condiciones ambientales (temperatura y humedad relativa) una vez liberado y de la capacidad de mantener su viabilidad bajo las condiciones

almacenamiento. Investigación realizada en diferentes genotipos de nogal (*Juglans regia* L.) mostraron que la viabilidad del polen utilizando la prueba de tetrazolium para todos los cultivares llegó a ser inferior al 50% cuando se almacenó a 4 °C, y no se observaron diferencias estadísticas entre los cultivares (Ozcan et al., 2019). Autores como Dafni y Firmage (2000), reportan que el polen, una vez liberado de la antera está inevitablemente sujeto a tensiones ambientales, y su viabilidad disminuirá.

Tabla 4. Prueba de medias para las variables porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) en tres genotipos de frijol caupí.

GENOTIPO	TEST ACETOCARMÍN		TEST TETRAZOLIO	
	PPV	PPI	PPV	PPI
BRS MILENIUM	97,98 a	2,01 a	63,14 c	36,86 a
CAUPICOR 50	97,29 a	2,70 a	79,18 a	20,81 c
IT 86	97,55 a	2,44 a	70,41 b	29,58 b

Literales diferentes entre filas indican diferencia estadística entre medias ($P < 0,05$) según Tukey.

Aun cuando los promedios para PPV y PPI obtenidos con el test de acetocarmin, no generaron diferencias entre ellos, se observa que sus valores fueron muy superiores a los obtenidos con la prueba de tetrazolio (Tabla 4); esto reitera que posiblemente esta prueba sobreestima el PPV en frijol caupí. Munhoz et al. (2008), en estudios realizados en papaya concluyen que las pruebas con acetocarmín, estima ineficientemente la viabilidad del polen, aunque se pueden usar de manera efectiva para determinar los componentes celulares y la integridad del grano de polen. La prueba con tetrazolium, demostró ser una herramienta confiable como una estimación rápida de la viabilidad del polen. Por tanto, el uso de métodos confiables para la calidad funcional del polen es importante en la evaluación durante su almacenamiento, en la mejora del cultivo, la genética y los estudios de fertilidad, y por ende en la producción de cultivos (Radicevic et al., 2013). Según Souza et al. (2002), la viabilidad del polen superior al 70% se considera satisfactoria para su uso en cruces con el objetivo de obtener nuevos híbridos.

Volk (2011), informa que idealmente, la producción exitosa de frutos y semillas ocurre después de la polinización con polen bien conservado. Marquard (1992) demostró que no se requieren altos niveles de viabilidad, el cuajado ocurrió cuando los estigmas se trataron con solo un 5% de polen viable.

Estudios llevados a cabo por Mesnoua et al. (2018) en palma dactylifera, encontraron que el porcentaje de cuajado de frutos no se correlacionó con el porcentaje de germinación de polen *in vitro*, donde el bajo porcentaje de polen viable del genotipo Deglat Beida (19%) almacenado a 4°C tiene el mismo porcentaje de cuajado de frutos que Deglet Nour, con alto porcentaje de polen viable de (89%), almacenado a -20 °C. La posible explicación de estos resultados podría atribuirse a que la cantidad de polen que llega a los estigmas supera con creces la cantidad necesaria para fertilizar todos los óvulos (Zhang et al., 2010).

La interacción de los diferentes ambientes con el tiempo de almacenamiento solo mostro diferencias estadística para porcentaje de polen inviable (PPI) cuando se utilizó el test de acetocarmin (Tabla 1). Por lo que se infiere que a medida que el tiempo aumenta se causa cambios en la posición de los ambientes en función del tiempo, en los promedios de polen no viables para frijol caupí.

El efecto combinado de los factores tipo de ambiente con los genotipos evaluados, revelan que los promedios para PPV y PPI en los dos ambientes cambian en función de los genotipos con el test de tetrazolio (Tabla 1), indicando este test que el tipo de ambiente ejerce una influencia en la viabilidad del polen dependiendo de que genotipo provenga. Las condiciones de cuarto frio, presenta promedio superior con el genotipo IT86 para PPV y con BRS Milenium para PPI (Tabla 5); cuando se almaceno en nevera, se obtuvieron promedios superiores con BRS Milenium. Se resalta que el genotipo Caupicor 50, registro los promedios más altos para PPV e igualmente el valor más bajo para porcentaje de polen inviable. Estudios recientes por Tyagi y Hymowitz (2003) han registrado que el polen de la

soja anual retiene su viabilidad durante cuatro meses cuando se almacena a -20 °C.

Tabla 5. Promedios de las variables porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) en tres genotipos de frijol caupí, para la interacción ambiente por genotipo utilizando el test de tetrazolium.

ALMACENAMIENTO	GENOTIPOS					
	PPV			PPI		
	BRS M	CAUP 50	IT86	BRS M	CAUP 50	IT86
CUARTO FRIO	57,34b	80,13a	77,36a	42,65a	19,86a	22,63b
NEVERA	68,94a	78,23a	63,46b	31,06b	21,76a	36,53a

Literales diferentes entre filas indican diferencia estadística entre medias ($P < 0,05$) según Tukey

Los factores tiempo de almacenamiento y los genotipos evaluados, para los dos test utilizados para determinar la viabilidad del polen, muestran un efecto diferencial altamente significativo en las dos pruebas utilizadas (Tabla 1), lo cual indica que los genotipos cambiaron su clasificación en función del tiempo de almacenamiento, como se aprecia para el test con acetocarmin (Tabla 6) y sal de tetrazolio (Tabla 7).

En los resultados con la prueba de acetocarmin, se observan promedios superiores a los cero y seis días con el genotipo BRS Milenium para PPV y con Caupicor 50 e IT86 para PPI (Tabla 6); se resalta que el polen de los genotipos hasta los 12 días mantuvo un porcentaje de polen viable por encima del 95%. Con la prueba de sal de tetrazolio, a los seis días se presentaron porcentajes superiores en los genotipos BRS Milenium e IT86 y con Caupicor 50 a los cero días de almacenado para PPV (Tabla 7); los resultados muestran que con la prueba de tetrazolio los promedios a los doce días de almacenado el polen de los genotipos evaluados oscilaron entre 61,33 y 80,03%. Asimismo, se observa que los genotipos BRS Milenium e IT86 presentaron los valores más bajos para PPV a los doce días, en comparación con el promedio de Caupicor 50, que fue más alto

con 80.03%; es probable que las características propias del polen de este genotipo no estén influenciadas por el ambiente y le permitan preservar su viabilidad. También resaltamos que en los genotipos BRS Milenum e IT86, la longevidad del polen disminuye la calidad después de los seis días de almacenamiento, al bajar el PPV un 11,5% y 12,6% respectivamente.

Tabla 6. Prueba de medias para las variables porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) en tres genotipos de frijol caupí, para la interacción tiempo por genotipo utilizando el test de acetocarmin.

TIEMPO	GENOTIPOS					
	PPV			PPI		
	BRS M.	CAUP. 50	IT86	BRS M.	CAUP. 50	IT86
0 días	99,05 a	94,42 b	95,15 b	0,95 b	5,57 a	4,85 a
6 días	98,73 a	98,22 a	98,13 a	1,26 b	1,77 b	1,86 b
12 días	96,16 b	99,23 a	99,37 a	1,86 a	0,76 b	0,62 b

Literales diferentes entre filas indican diferencia estadística entre medias ($P < 0,05$) según Tukey.

Tabla 7. Promedios de las variables porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) en tres genotipos de frijol caupí, para la interacción tiempo por genotipo utilizando el test de tetrazolium.

TIEMPO	GENOTIPOS					
	PPV			PPI		
	BRS M.	CAUP. 50	IT86	BRS M.	CAUP. 50	IT86
0 días	55,25 b	85,15 a	54,12 c	44,75 a	14,85 b	45,87 a
6 días	72,83 a	72,36 b	84,86 a	27,16 b	27,63 a	15,13 c
12 días	61,33 b	80,03 ab	72,26 b	38,67 a	19,96 ab	27,73 b

Literales diferentes entre filas indican diferencia estadística entre medias ($P < 0,05$) según Tukey.

En la interacción de los tres factores considerados en la presente investigación para las variables PPV y PPI, se registran diferencias estadísticas cuando se evaluó la calidad del polen con el test de tetrazolio (Tabla 1), por lo que la clasificación para PPV y PPI en cuarto frío y nevera cambian en función de los días de almacenamiento y el genotipo (Tabla 8). Estos resultados confirman que el

porcentaje de viabilidad depende de varios factores, principalmente los relacionados con el almacenamiento (Pio et al., 2007). En cuarto frío se registran promedios superiores a los seis y doce días para el genotipo IT86, en nevera se obtuvieron valores superiores a los doce días con el genotipo BRS Milenium, respecto a los registrados con almacenamiento en nevera (Tabla 8).

A los doce días se registran los valores más altos para PPI en cuarto frío con BRS Milenium (56,47%) y en nevera con el genotipo IT86 (34,8%) (Tabla 8).

Tabla 8. Promedios de las variables porcentaje de polen viable (PPV) y porcentaje de polen inviable (PPI) en tres genotipos de frijol caupí, para la interacción almacenamiento por tiempo por genotipo utilizando el test de tetrazolium.

ALMAC	PPV									
	0 DIAS			6 DIAS			12 DIAS			
	BRS M	C. 50	IT86	BRS M	C. 50	IT86	BRS M	C. 50	IT86	
C. FRIO	55,25a	85,15a	54,12a	73,25a	69,55a	98,65a	43,52b	85,70a	79,32a	
NEVERA	55,25a	85,15a	54,12a	72,42a	75,17a	71,07b	79,15a	74,37a	65,20b	
ALMAC	PPI									
	C. FRIO	44,75a	14,85a	45,87a	26,75a	30,45a	1,35b	56,47a	14,30a	20,67b
	NEVERA	44,75a	14,85a	45,87a	27,57a	24,82a	28,92a	20,87b	25,62a	34,80a

Literales diferentes entre filas indican diferencia estadística entre medias ($P < 0,05$) según Tukey. ALMAC: Almacenamiento; C. FRIO: cuarto frío; BRS M: BRS Milenium; C. 50: Caupicor 50;

Cuando se almaceno bajo las condiciones de nevera, se observa que entre los genotipos a los seis y doce días sus promedios para PPV y PPI son similares (Tabla 8). De acuerdo con los promedios de polen viable de los diferentes genotipos en los dos ambientes evaluados, a los doce días se mantuvo por encima del 60%, excepto para BRS Milenium en cuarto frío. En los granos de polen, el efecto de las bajas temperaturas está relacionado con la reducción del metabolismo celular, proporcionándoles una mayor longevidad (Cuchiara et al., 2012).

Los resultados anteriores, muestran que bajo las condiciones de almacenamiento (nevera y cuarto frío), el polen de los tres genotipos evaluados, conservado por 12 días, mostró invariablemente valores de viabilidad similares a los de los controles, que oscilaron entre el 65,2 y 85,7% y el 72% (Tabla 8), excepto el genotipo BRS Milenium en cuarto frío; lo que demuestra la retención de la actividad enzimática y la integridad de la membrana en el polen almacenado a baja temperatura y, por tanto, ninguna pérdida significativa de viabilidad.

4. CONCLUSIONES

Las condiciones de temperatura donde se almaceno el polen por 12 dias (cuarto frio o nevera), representan una estrategia conveniente para la conservación eficiente de la viabilidad del polen para la polinización artificial, ya que el polen mantuvo promedios superiores en porcentaje de viabilidad (> 70% con la sal de tetrazolium y superiores al 90% con el test de acetocarmin).

Los resultados con la prueba de tetrazolium, mostraron que el PPV y PPI, varían con el genotipo y el tiempo de almacenamiento; donde lo genotipos con mayores promedios de polen viable en cuarto frio y nevera fueron Caupicor 50 y BRS Milemium.

Los genotipos estudiados responden de manera diferencial a las condiciones de almacenamiento y tiempo de almacenamiento, destacando al cultivar Caupicor 50 como el mejor por los valores registrados.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelgadir, H. A., Johnson, S. D., y Van Staden, J. (2012). Pollen viability, pollen germination and pollen tube growth in the biofuel seed crop *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). *South African Journal of Botany*, 79, 132-139.
- Alba, V., Bisignano, V., Alba, E., De Stradis, A., y Polignano, G. B. (2011). Effects of cryopreservation on germinability of olive (*Olea europaea* L.) pollen. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58(7), 977.
- Aloisi, I., Cai, G., Serafini-Fracassini, D., y Del Duca, S. (2016). Polyamines in pollen: from microsporogenesis to fertilization. *Frontiers in plant science*, 7, 155.
- Araméndiz, T. H., Cardona, A. C., y Jarma, O. A. (2013). Eficiencia de dos métodos para evaluar la viabilidad del polen de berenjena (*Solanum melongena* L. cv. Lila criolla). *U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 16(2): 351-358
- Baez Hernandez, A., y Hernandez Medina, C. A. (2016). Estudio del rendimiento de cultivares de frijol caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) en diferentes épocas de siembra en Camajuani, Cuba. *Revista de Ciencia y Tecnología*, (26), 11-18.
- Baskorowati, L. (2009). Stigma receptivity and pollen viability of *Melaleuca alternifolia*. *Indonesian Journal of Forestry Research*, 6(1), 26-37.
- Brambatti, A., Brammer, S. P., Wiethölter, P., y Nascimento Junior, A. D. (2016). Estabilidade genética em triticale estimada pela viabilidade polínica. *Arquivos do Instituto biológico*, 83.
- Campbell, S. A., y Close, T. J. (1997). Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *New Phytologist*, 137(1), 61-74.
- Coelho, A. P., Morais, K. P., Laughinghouse IV, H. D., Giacomini, S. J., y Tedesco, S. B. (2012). Pollen grain viability in accessions of *Crotalaria juncea* L. (*Fabaceae*). *Agrociencia*, 46(5), 481-487.

- Connor, K. F., y Towill, L. E. (1993). Pollen-handling protocol and hydration/dehydration characteristics of pollen for application to long-term storage. *Euphytica*, 68(1-2), 77-84.
- Cuchiara, C. C., Silva, S. D. D. A., y Bobrowski, V. L. (2012). Conservação de grãos de pólen de mamoneira a baixas temperaturas. *Revista Ceres*, 59(1), 82-87.
- Chaudhury, R., Malik, S. K., y Rajan, S. (2010). An improved pollen collection and cryopreservation method for highly recalcitrant tropical fruit species of mango (*Mangifera indica* L.) and litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *CryoLetters*, 31(3), 268-278.
- Dafni, A. (1992). *Pollination Ecology: A Practical Approach*. University Press. New York. 250 p.
- Dafni, A., y Firmage, D. (2000). Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. In *Pollen and pollination* (pp. 113-132). Springer, Vienna.
- Endo, S., Shinohara, H., Matsubayashi, Y., y Fukuda, H. (2013). A novel pollen-pistil interaction conferring high-temperature tolerance during reproduction via CLE45 signaling. *Current Biology*, 23(17), 1670-1676.
- Gibernau, M., Macquart, D., Diaz, A., House, D., Fern-Barrow, P., y Dorset, B. (2003). Pollen viability and longevity in two species of Arum. *Aroideana*, 26, 58-62.
- Giovannini, A., Macovei, A., Caser, M., Mansuino, A., Ghione, G. G., Savona, M., y Balestrazzi, A. (2017). Pollen grain preservation and fertility in valuable commercial rose cultivars. *Plants*, 6(2), 17.
- Gill, M. U. K. T. I. (2014). Pollen storage and viability. *Int. J. Bot. Res*, 4, 1-18.
- Huang, Z., Zhu, J., Mu, X., y Lin, J. (2004). Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. *Annals of Botany*, 93(3), 295-301.

- Khan, S. A., y Perveen, A. (2006). Germination capacity, viability and maintenance of stored pollen of *vigna mungo* l. *International Journal Of Biology And Biotechnology* 3 (4): 779-781.
- Kruskal, W. H., y Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American statistical Association*, 47(260), 583-621.
- Machado, C. D. A., Moura, C. R. F., Lemos, E. E. P. D., Ramos, S. R. R., Ribeiro, F. E., y Lédo, A. D. S. (2014). Pollen grain viability of coconut accessions at low temperatures. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 36(2), 227-232.
- Marak, M. K., y Wani, A. M. (2018). Pollen morphology and viability in *Gliricidia sepium*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(5), 19-22.
- Marquard RD. (1992). Fruit set of pecan requires a low percentage of live pollen in controlled pollination. *HortScience* 27(5):473.
- Mesnoui, M., Roumani, M., y Salem, A. (2018). The effect of pollen storage temperatures on pollen viability, fruit set and fruit quality of six date palm cultivars. *Scientia Horticulturae*, 236, 279-283.
- Munhoz, M., Luz, C. F. P. D., Meissner Filho, P. E., Barth, O. M., y Reinert, F. (2008). Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. *Brazilian Journal of Botany*, 31(2), 209-214.
- Nassar, N. M., Santos, E. D., y David, S. R. (2000). The transference of apomixis genes from *Manihot neusana* Nassar to cassava, *M. esculenta* Crantz. *Hereditas*, 132(2), 167-170.
- Oliveira, M., Maués, M. M., y Kalume, M. D. A. (2001). Viabilidade de pólen in vivo e in vitro em genótipos de açaizeiro. *Acta bot. bras.* 15(1): 27-33.
- Ozcan, A., Sütyemez, M., Bükücü, S. B., y Ergun, M. (2019). Pollen viability and germinability of walnut: A comparison between storage at cold and room temperatures. *Fresenius Environ. Bull*, 28(1), 111-115.
- Palencia, G., Mercado, T., y Combatt, E. (2006). Estudio agroclimático del departamento de Córdoba. Editorial Gráficas el Caribe, Montería. 126 p.

- Pinney, K., y Polito, V. S. (1989). Olive pollen storage and in vitro germination. In *International Symposium on Olive Growing 286* (pp. 207-210).
- Pio, L. A. S., Ramos, J. D., Pasqual, M., Junqueira, K. P., Santos, F. C., y Rufini, J. C. M. (2007). Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. *Ciência e Agrotecnologia*, 31(1), 147-153.
- Radičević, S. A. N. J. A., Nikolić, D. R. A. G. A. N., Cerović, R. A. D. O. S. A. V., y Đorđević, M. (2013). In vitro pollen germination and pollen grain morphology in some sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(3), 8341-8349.
- Raghavan, V. (1997). Molecular embryology of flowering plants. University Press, Cambridge, pp 33-35.
- Rather, S. A., Chaudhary, H. K., y Kaila, V. (2017). Pollen preservation potential of *Imperata cylindrica*-an efficient source for doubled haploid production in wheat. *Cereal Research Communications*, 45(3), 525-534.
- Rosell, P., Saúco, V. G., y Herrero, M. (2006). Pollen germination as affected by pollen age in cherimoya. *Scientia horticultrae*, 109(1), 97-100.
- Santos, J. F. L., Rossi, A. A. B., Pena, G. F., Tiago, A. V., Zortéa, K. É. M., Dos Santos Cardoso, E., ... y dos Santos, I. R. B. (2020). Morfologia, viabilidade polínica e índice meiótico de *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth. *Brazilian Journal of Development*, 6(6), 37514-37536.
- Soares, T. L., Silva, S. O., Costa, M. A. P. C., Santos-Serejo, J. A., Souza, A. D. S., Lino, L. S. M., ... y Jesus, O. N. (2008). In vitro germination and viability of pollen grains of banana diploids. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 8(2), 111-118.
- Souza, M. D., Pereira, T. N. S., y Martins, E. R. (2002). Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). *Ciência e agrotecnologia*, 26(6), 1209-1217.
- Souza, E. H., Souza, F. V. D., Rossi, M. L., Brancalleao, N., da Silva Ledo, C. A., y Martinelli, A. P. (2015). Viability, storage and ultrastructure analysis of

- Aechmea bicolor* (Bromeliaceae) pollen grains, an endemic species to the Atlantic forest. *Euphytica*, 204(1), 13-28.
- Souza, E. H., Souza, F. V., Rossi, M. L., Packer, R. M., Cruz-Barros, M. A. V., y Martinelli, A. P. (2017). Pollen morphology and viability in Bromeliaceae. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(4), 3067-3082.
- Shekari, A., Nazeri, V., y Shokrpour, M. (2016). Pollen viability and storage life in *Leonurus cardiaca* L. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(3), 101-104.
- Sparks, D., y Yates, I. E. (2002). Pecan pollen stored over a decade retains viability. *HortScience*, 37(1), 176-177.
- Tyagi, R. K., y Hymowitz, T. (2003). Pollen from Glycine species survive cryogenic exposure. *CryoLetters*, 24(2), 119-124.
- Sparks, D., y Yates, I. E. (2002). Pecan pollen stored over a decade retains viability. *HortScience*, 37(1), 176-177.
- Volk, G. M. (2011). Collecting pollen for genetic resources conservation. *Collecting plant genetic diversity: technical guidelines*, 1-10.
- Yates I. E., Sparks D., Connor K., Towill L. (1991). Reducing pollen moisture simplifies long-term storage of pecan pollen. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116:430-434.
- Zhang, C., Tateishi, N., y Tanabe, K. (2010). Pollen density on the stigma affects endogenous gibberellin metabolism, seed and fruit set, and fruit quality in *Pyrus pyrifolia*. *Journal of experimental botany*, 61(15), 4291-4302.

6. CONCLUSIONES GENERALES

- El polen colectado a diferentes horas del día en los genotipos evaluados, acusaron respuesta diferencial en los semestres A y B de 2019; el cultivar Caupicor 50 presentó mayor porcentaje de polen viable con 93,89% y 94,61% respectivamente. En tanto que el menor promedio lo registró Missouri con 85,42%.
- Las polinizaciones controladas que se realicen entre las 7:00am y 9:00am en campo y entre las 3:00pm y 5:00pm en casa malla tendrán mayor probabilidad de formar vainas y semillas, dado que en ese horario se presenta mayor tiempo de reacción al peróxido de hidrogeno en los genotipos evaluados de frijol caupí.
- El método de hibridación artificial uno (emasculando y polinizando en la mañana), en el horario de 7:00am a 10:00am, en la casa de malla y campo, se registraron los mayores porcentajes de cruzamientos viables.
- Las condiciones de temperatura donde se almaceno el polen por 12 dias (cuarto frio y nevera), representan una estrategia conveniente para la conservación eficiente de la viabilidad del polen de frijol caupí para la polinización artificial, ya que el polen mantuvo promedios superiores de viabilidad (> 70% con la sal de tetrazolium y superiores al 90% con el test de acetocarmin).

ANEXOS

Anexo 1. Temperatura (T) y humedad relativa (HR) en las diferentes horas de colecta de muestras para detectar la viabilidad de polen en frijol caupí. 2019A

	EVAL 1		EVAL 2		EVAL 3		EVAL 4		EVAL 5	
HORA	T (°C)	HR (%)								
6:00am	27,3	89	27,2	90	27,2	94	26,8	93	27,9	92
8:00am	33,0	64	28,8	86	32,2	73	33,0	67	29,3	86
10:00am	38,6	47	32,1	69	32,6	67	37,2	51	33,2	66

Anexo 2. Temperatura (T) y humedad relativa (HR) en las diferentes horas de colecta de muestras para detectar la viabilidad de polen en frijol caupí. 2019B

	EVAL 1		EVAL 2		EVAL 3		EVAL 4		EVAL 5	
HORA	T (°C)	HR (%)								
6:00am	26,2	84	30,0	85	26,2	84	28,9	83	25,0	90
8:00am	29,0	82	30,9	84	27,4	88	29,6	89	30,9	80
10:00am	37,0	41	36,6	58	34,7	63	33,3	67	32,8	74
12:00m	41,8	37	38,1	45	42,0	41	44,0	29	31,4	75