

# COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE POLINIZACIÓN CONTROLADA Y POLINIZACIÓN NATURAL EN *PERSEA AMERICANA* MILL. (LAURACEAE)

Erika Díaz Dubón<sup>a</sup>, Lilian Ferrufino-Acosta<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Carrera de Biología, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, UNAH, Tegucigalpa, Honduras, ediazd@unah.hn

<sup>b</sup> Herbario Cyril Hardy Nelson Sutherland (TEFH), Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, UNAH, Tegucigalpa, Honduras, lilian.ferrufino@unah.edu.hn. Maestría de Botánica, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, UNAH, Tegucigalpa, Honduras, maestria.botanica@unah.edu.hn. Miembro Organization for Women in Science for the Developing World (OWSD) - Honduras

*Recepción* 18/03/2021

*Aceptación* 09/08/2022

## *Resumen*

*Persea americana* Mill. presenta un sistema de reproducción de dicogamia sincrónica que promueve la reproducción. El objetivo de este trabajo fue comparar diferentes métodos para mejorar la polinización controlada y de esta manera lograr una fructificación exitosa. Este consistió, primero, en flores masculinas recolectadas en anteras dehiscentes y a la vez en estambres cuando el polen ha sido transferido por contacto directo de las anteras con el estigma durante la etapa femenina. Segundo, en polen transferido por medio del uso de un pincel poniendo en contacto el polen con el estigma siempre en etapa femenina. Adicionalmente, se hicieron registros de visitantes florales para una polinización natural o abierta. Se concluyó que para lograr una fructificación exitosa en cruces entre flores de distintas inflorescencias, las flores masculinas deben recolectarse cuando las anteras están abiertas y el polen debe transferirse por contacto directo de las anteras con el estigma de las flores funcionalmente femeninas. Los resultados obtenidos son útiles para optimizar polinizaciones controladas en *P. americana* y a la vez ayudar a aumentar la producción de frutos a nivel comercial, así como información sobre la historia natural de la especie.

**Palabras clave:** éxito reproductivo, aguacate, visitantes florales, *Anartia fatima fatima*, *Amazilia rutilia*, *Trigona fulviventris*.

# COMPARISON OF CONTROLLED POLLINATION AND NATURAL POLLINATION METHODS IN *PERSEA AMERICANA* MILL. (LAURACEAE)

Erika Díaz Dubón<sup>a</sup>, Lilian Ferruffino-Acosta<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Carrera de Biología, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, UNAH, Tegucigalpa, Honduras, ediazd@unah.hn

<sup>b</sup>Herbario Cyril Hardy Nelson Sutherland (TEFH), Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, UNAH, Tegucigalpa, Honduras, lilian.ferruffino@unah.edu.hn. Maestría de Botánica, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, UNAH, Tegucigalpa, Honduras, maestria.botanica@unah.edu.hn. Miembro Organization for Women in Science for the Developing World (OWSD) - Honduras

Received 18/03/2021

Accepted 09/08/2022

## Abstract

*Persea americana* Mill. has a unique synchronous dicogamy breeding system that promotes reproduction. In this work, a comparison of different methods was made to improve controlled pollination to achieve successful fruiting. This consisted of 1. Male flowers collected when all the anthers have dehisced and the pollen has been transferred by direct contact of the anthers with the stigma during the female stage. 2. Pollen transferred by means of the use of a brush putting the pollen in contact with the stigma always in the female stage. Additionally, records of floral visitors were made for natural or open pollination. It was concluded that to achieve a successful fruiting in crosses between floral groups, the male flowers must be collected in the dehiscence of the anthers and the pollen must be transferred by direct contact of the anthers with the stigma of the functionally female flowers. The results obtained are useful to optimize controlled pollinations in *P. americana* and can help to increase fruit production at a commercial level.

**Keywords:** reproductive success, avocado, *Anartia fatima fatima*, *Amazilia rutilia*, *Trigona fulviventris*.

## Introducción

*Persea americana* (Lauraceae) es una especie nativa de las regiones tropicales y subtropicales de México y de Centroamérica. Es un árbol frutal de hojas perennes que actualmente se cultiva en diferentes regiones en todo el mundo. Sus inflorescencias están dispuestas en panículas de flores con brácteas que surgen del nuevo crecimiento de las ramas o de las axilas de las hojas. Posee flores hermafroditas, cada una tiene ambas funciones, masculinas y femeninas, que se separan en el tiempo a través de un sistema de reproducción dicógamo protógino sincrónico. La flor se abre dos veces, la primera funcionalmente como flor femenina, luego la flor se cierra y al día siguiente se reabre funcionalmente como flor masculina (Dilip, 2014). Por esta razón, realizar cruces del mismo grupo floral es difícil. El fruto es una baya carnosa (no tiene endocarpio lignificado o endurecido), puede ser de superficie lisa o rugosa, su forma va desde elipsoide a ovoide y su color es verde, oscureciéndose en la madurez. Presenta una semilla ovalada, recalcitrante, con una cubierta mediana a gruesa y membranosa (Pérez, 2011).

La polinización es un paso clave para asegurar la fertilización y la producción de semillas y, en consecuencia, es una etapa crítica en la reproducción de la planta. Las polinizaciones controladas se utilizan ampliamente en árboles frutales y forestales, considerándose, la polinización manual controlada, una herramienta para mejorar la fructificación de una especie (Lora *et al.*, 2006). En el caso de *Persea americana* Mill., mejor conocida como aguacate o avocado, la polinización manual es favorable para producir frutos, pero no se utiliza generalmente con fines de producción comercial cuando se necesita un gran número de plántulas. Sin embargo, el método más común usado en la actualidad para producción comercial a gran escala es recolectar frutos de la planta madre polinizada por la abeja, este polinizador es el más frecuente en la producción comercial (Salar-García *et al.*, 2013).

Según investigaciones realizadas por Jiménez-Masis (2016), *P. americana* aún necesita de la polinización de insectos como eficientes polinizadores. La

entomofilia juega un papel importante en la polinización de *P. americana* para obtener frutos de buena calidad y altos rendimientos. En esta especie se ha visto que requiere de la visita de un polinizador para obtener buenos rendimientos (Wysocki *et al.*, 2002). Dicho esto, es importante recalcar que la demanda del fruto de *P. americana* es muchísimo más alta que la tasa de producción a la que se da actualmente. Estas especies presenta una proporción muy baja de flores y frutos, con menos del 1 % de las flores producidas capaces de dar frutos, debido a una caída masiva de flores y baja producción de frutos (Alcaraz *et al.*, 2013).

Por tanto, comparamos la eficiencia de la polinización artificial con polinización natural para mejorar la producción de frutos de *P. americana* y capturamos los visitantes florales.

## Materiales y métodos

Los experimentos se llevaron a cabo en la Residencial Maya, en el municipio de Tegucigalpa, departamento de Francisco Morazán, 14°09'46" N, 87°16'62" O. Los datos promedio para esta ubicación son temperaturas mínimas medias de 19.4 °C, temperaturas máximas medias de 26.7 °C entre noviembre de 2020 y enero de 2021.

Se usaron 23 inflorescencias distribuidas en tres árboles maduros, con 6 a 9 flores por cada inflorescencia, y un aproximado de 160 flores en total. Seguidamente se describieron los rasgos florales y los tiempos de apertura floral para las inflorescencias de *P. americana*.

Para determinar los mejores métodos de aplicación de polen en el estigma, las inflorescencias fueron embolsadas utilizando malla de punto. Cuando la flor estaba cerrada, se cubrieron con una bolsa que impide el acceso a ella a los insectos, y en el momento en que se produce la apertura, la bolsa se retira, permitiendo la polinización. Luego, se probaron dos técnicas de aplicación: la primera fue la polinización con pincel, de la cual se seleccionaron un total de 11 inflorescencias distribuidas en un árbol maduro y de 6 a 9 las flores fueron polinizadas a mano en cada inflorescencia con un total de aproximadamente 80

**Figura 1.** *Persea americana* Mill. A) Inflorescencia. B) Flor. C) Fructificación de *P. americana* en flores polinizadas por contacto directo



flores polinizadas por contacto directo con polen de flores masculinas cuando todas las anteras hubieron dehisido. Las anteras se separaron de sus filamentos y fueron colocados en un recipiente de plástico. La segunda fue la polinización por contacto directo de las anteras de las flores con el estigma de las flores de la misma planta, un total de 12 inflorescencias distribuidas en un árbol maduro con aproximadamente 80 flores polinizadas. En ambos casos, en el resto de flores no polinizadas se eliminaron las inflorescencias.

El número de flores con ensanchamiento ovárico fue monitoreado usando la metodología propuesta por Bazo *et al.* (2018) y Davenport *et al.* (1994). Seguidamente, se monitoreo la tasa de formación de fruto para cada tratamiento. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 26. Una prueba de chi-cuadrado para tablas de contingencia se utilizó para determinar la efectividad de cada método de polinización.

Para la identificación de los visitantes florales, se seleccionó uno de los tres árboles de *P. americana* aleatoriamente en el sitio de estudio y se asignó un horario de 7:00 a. m. a 10:00 a. m. para realizar las observaciones. Uno o dos individuos de cada especie fueron fotografiados y se identificaron con la ayuda del licenciado Luis Benito Martínez, del Museo del Entomología del CURLA-UNAH y la guía de campo para aves de Norteamérica y América Central de Fagan y Komar (2016). No se hizo recolecta de espécimen en campo para la elaboración de este estudio.

## Resultados

Los rasgos florales de *P. americana* corresponden a inflorescencias cimosas, blancas, diurnas, perfectas, que exhiben dicogamia que ocurre en dos tiempos de apertura floral (Figura 1A-B). En la primera apertura (etapa 1), que dura de 3 a 4 h, las flores son funcionalmente femeninas. La segunda apertura (etapa 2) de las mismas flores se produce el día siguiente y también dura de 3 a 4 h. Esta apertura es funcionalmente masculina porque el polen es liberado y los estigmas se secan.

Se observó un mayor ensanchamiento del ovario en flores polinizadas a mano por contacto directo del estigma (12 %) con las anteras en comparación con flores que se les aplicaron polen con pincel (10.7 %), pero las diferencias entre ambos métodos no fueron estadísticamente significativas ( $X^2 = 7.561$ ,  $gl = 1$ ,  $P = 0.092$ ). También se observó un mayor ensanchamiento del ovario en flores polinizadas a mano (12 %) por contacto directo que la obtenida en flores con polinización natural (4.9 %), mostrando la polinización por contacto directo significativamente mayor ( $X^2 = 91.76$ ,  $gl = 1$ ,  $P < 0.001$ ). La tasa de formación de frutos de flores polinizadas a mano por contacto directo del estigma fue mayor (6 %) que el obtenido cuando el polen se aplicó sobre el estigma con un pincel (4.6 %), aunque las diferencias entre ambos métodos de aplicación de polen no fueron marginalmente significativas ( $X^2 = 2.095$ ,  $gl = 1$ ,  $P = 0.061$ ) (Figura 1C).

Fueron contabilizados aproximadamente 275 visitantes florales, de los cuales la familia Nym-

phalidae (Lepidoptera) fue el más frecuente (38 %) con la especie *Anartia fatima fatima*, así como el colibrí, *Amazilia rutilia* (Trochilidae) (26 %). Otros visitantes florales visitaron en menor porcentaje, *Argia anceps*, familia Coenagrionidae (Odonata) (10 %). El 26 % restante se distribuye con las especies *Trigona fulviventris* dentro del orden Hymenoptera, un díptero de la familia Tachinidae y la especie *Eurides isabella*, *Siproeta epaphus epaphus*, *Fountainea eurypile confusa* y *Dynamine theseus* dentro del orden Lepidoptera (Figura 2A-J).

## Discusión

Los polinizadores, tanto silvestres como manejados, se ven muy influidos por los cambios en el entorno que les rodea. Por tanto, se hace mención en este estudio que la observación de visitantes tiene varias limitaciones que pueden haber influido en los resultados como el muestreo de un solo individuo de *P. americana* y la identificación sin recolección de visitantes florales.

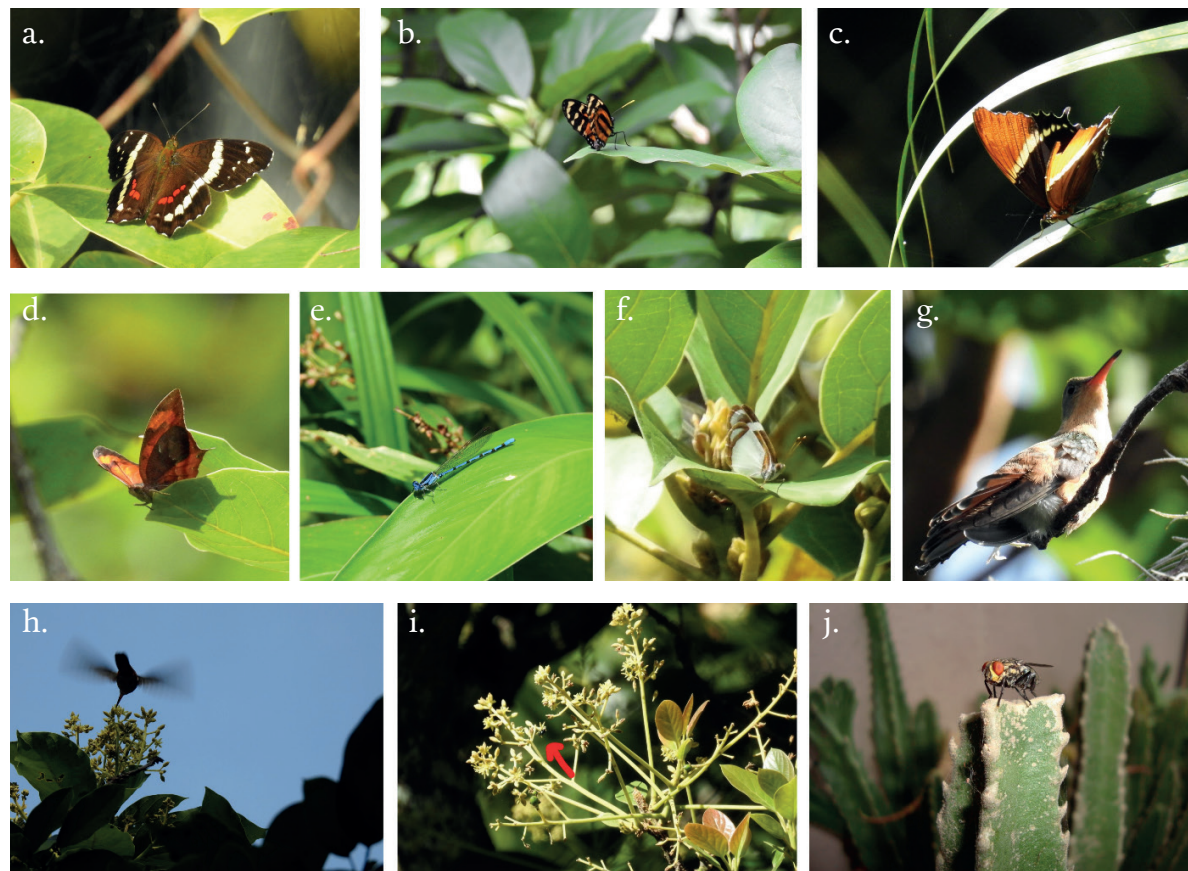
Los métodos de polinización manual proporcionan información sobre el manejo del polen durante el proceso, así como de la capacidad del estigma para portar el polen. La adhesión y germinación del polen en el momento de la aplicación es especialmente importante en especies como *P. americana*, ya que es muy usada para producción masiva y comercialización (Salazar-García *et al.*, 2013). Se obtuvieron mejores resultados en flores polinizadas por contacto directo que en flores polinizadas usando pincel. Esto podría deberse a que la polinización usando pincel implica manipulación adicional del polen cuando se usa este instrumento. Se sugiere realizar, cuando el pincel está siendo utilizado para la aplicación de polen, un paso adicional en el que las anteras se separen de las flores y se coloquen en una placa de Petri, de lo contrario provocaría un proceso más lento y con mayor riesgo a fracaso (Davenport *et al.*, 1994; Lahav y Lavi, 2013).

La polinización natural es un factor limitante en *P. americana*, a pesar de que el polinizador podría polinizar todas las flores de una inflores-

encia. Un bajo porcentaje de ellas presentaron ensanchamiento de ovario y por lo tanto una baja producción de frutos. Esto quizás debido a algún daño de parte del polinizador (por ejemplo, el tamaño del pico en el ave en comparación al tamaño de las flores) o que simplemente el polinizador no es efectivo y solo se considera un visitante floral (Alcaraz *et al.* 2013), así como la falta de adaptabilidad de sus piezas bucales y otras extremidades a la morfología floral (Walker, 2020). Por otro lado, Bronstein *et al.* (2006) comenta que los polinizadores exitosos deben desarrollar características morfológicas adaptativas para forrajear en la planta. Estas tendencias adaptativas morfológicamente son exhibidas tanto por las características florales de plantas polinizadas y las estructuras de las partes bucales como por otras flores interactivas características de sus respectivos polinizadores. A pesar de que la polinización natural no obtuvo la tasa de producción de fruto más alta, la entomofilia es la que ha sido mencionada como el síndrome más común en plantaciones de aguacate y de mejor éxito en cuanto a calidad y tamaño del fruto, por lo tanto sigue siendo el método más utilizado en producciones agrícolas (Castañeda, 2000; Jiménez, 2016).

Con relación a los visitantes, se observó un mayor porcentaje de especies del orden Lepidoptera. Esto podría ser por la presencia de néctar en sus flores como una fuente de alimento en los visitantes y polinizadores (Wscilo y Cane, 1996). En cuanto al orden, Himenóptera es el gremio más importante en relación a polinización de angiospermas, principalmente porque incluye numerosos visitantes florales frecuentes (Sierra y Pardo, 2008). Para este estudio se puede destacar la importancia de la especie de meliponino, *Trigona fulviventris*, ya que poliniza diferentes especies vegetales (Escareño *et al.*, 2019; Sierra y Pardo, 2008). Cabe mencionar que la importancia de las abejas en la polinización de cultivos agrícolas es reconocida para numerosas especies. Muchos investigadores hacen referencia al uso de colmenas de abejas para lograr una buena polinización en las flores de *P. americana*. Al colocar colmenas de abejas durante el periodo de floración, se producen más frutos que sin ellas, y el éxito de una

**Figura 2.** Visitantes florales de *Persea americana* Mill. A) *Anartia fatima fatima*. B) *Eurides isabella eva*. C) *Siproeta epaphus epaphus*. D) *Fountainea eurypile confusa*. E) *Argia anceps*. F) *Biblidinae*. G) *Amazilia rutilia*. H) *Amazilia rutilia* visitando flores de *P. americana* I) *Trigona fulviventris*. J) Díptero de la familia Tachinidae



buena polinización está dado por una adecuada cantidad de colmenas de abejas por hectárea, de manera que siempre existan flores en estado femenino y masculino para el traslado del polen por las abejas (Vásquez *et al.*, 2012).

En cuanto a *Apis mellifera*, no se observó ningún individuo de dicha especie, considerado que es el principal polinizador de *P. americana*. Se deduce que dicha ausencia se debe quizá al producto de factores abióticos como humedad relativa, luz o viento presentes en el área de estudio durante el periodo de la toma de datos (Afik *et al.*, 2006). También es importante mencionar que si bien es cierto la diversidad de dípteros asociados a la floración de *P. americana* es vasta, para este estudio en espe-

cial solo se observó la presencia de dos individuos pertenecientes a la familia Tachinidae (Figura 2J) asociados a la fase de apertura floral femenina. De acuerdo con Carabalí-Banguero *et al.* (2018), el seguimiento al comportamiento de los dípteros visitantes en las flores de *P. americana* en general está mayormente concentrados en consumo de néctar, consumo de polen y reproducción. Con base en lo anterior, es importante evaluar parámetros abióticos y de estacionalidad para lograr un argumento concluyente en cuanto a falta de diversidad de dípteros para el presente estudio, ya que Woodtruck *et al.* (2014) señala que dichos parámetros podrían tener un efecto en el comportamiento de los dípteros asociados a polinización en flores abiertas.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten mejorar los enfoques utilizados para realizar experimentos relacionados con la polinización manual en *P. americana*, sin embargo, para lograr una fructificación exitosa en cruces entre grupos florales, las flores masculinas deben recolectarse durante la dehiscencia de las anteras y el polen debe transferirse por contacto directo de las anteras al estigma de las flores funcionalmente femeninas. Se debe tomar en cuenta que sus visitantes florales no siempre son considerados polinizadores, por lo tanto es mucho más confiable realizar una polinización manual que una natural o abierta para incrementar la tasa de producción de frutas.

## Agradecimientos

Al licenciado Luis Benito Martínez, del Museo de Entomología del CURLA-UNAH, por la identificación de los insectos.

## Referencias

- Afik, O., Dag, A. y Shafir, S. (2006). The effect of avocado (*Persea americana*) nectar composition on its attractiveness to honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 37(3), 317-325. <https://doi.org/10.1051/apido:2005064>
- Alcaraz, M. L., Hormaza, J. I. y Rodrigo, J. (2010). Ovary starch reserves and pistil development in avocado (*Persea americana*). *Physiol. Plant.*, 140, 395-404. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2010.01410.x>
- Alcaraz, M. L. (2013). Pistil starch reserves determine flower fate in avocado (*Persea americana*). *PLOS ONE*, 8 (10), e78467. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078467>
- Bazo, I., Espejo, R., Palomino, C., Flores, M., Chang, M., López, C. y Mansilla, R. (2018). Estudios de biología floral, reproductiva y visitantes florales en el «loche» de Lambayeque (*Cucurbita moschata* Duchesne). *Ecología Aplicada*, 17, 191-205. <http://dx.doi.org/10.21704/rea.v17i2.1239>
- Bronstein, J. L., Alarcón, R. y Geber, M. (2006). Transley review: the evolution of plant-insect mutualisms. *New Phytologist*, 172, 412-28. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01864.x>
- Carabalí-Banguero, D., Montoya-Lerma, J. y Carabalí-Muñoz, A. (2018). Dípteros asociados a la floración del aguacate *Persea americana* Mill. cv. Hass en Cauca, Colombia. *Biota Colombiana*, 19(1), 92-111. <https://doi.org/10.21068/c2018.v19n01a06>
- Castañeda Vildózola, A. (2000). Identificación y eficiencia de insectos polinizadores del aguacatero en los estados de México y Michoacán, México [Tesis de posgrado]. Montecillo, Texcoco, México, Colegio de Posgraduados, Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas.
- Davenport, T. L., Parnitzki, P., Fricke, S. y Hughes, M. S. (1994). Evidence and significance of self-pollination of avocados in Florida. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119(6), 1200-1207.
- Dilip, N. (2014). Sustainable Horticultural Systems: Issues, Technology and Innovation. *Springer*, 176
- Escareño, F. C., Echazarreta, C. M., Guzmán-Nóvoa, E. y Macías-Macías, J. O. (2019). Traditional knowledge and potential use of stingless bees (Hymenoptera: Meliponinae) in the Manantlan, Sierra, Jalisco, Mexico. *Sociobiology*, 66(1), 120-125. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v66i1.3396>
- Fagan, J. y Komar, O. (2016). Peterson field guide to birds of northern Central America. Houghton Mifflin Harcourt.
- Jiménez Masís, R. M. (2016). *Evaluación de los servicios de polinización de Apis mellifera L. (Hymenoptera: Apidae) en el cultivo del aguacate (Persea americana Mill var. Hass) y su aporte en la producción*. San Pablo de León Cortés, San José.
- Lahav, E. y Lavi, U. (2013). Genetics and breeding. En Schaffer, B., Wolstenholme, B. N., Whaley, A. W. (Eds.), *The avocado: Botany, Production and Uses* (2.ª ed). Reino Unido: CAB International. <https://doi.org/10.1079/9781845937010.0000>

- Lora, J., Pérez de Oteyza, M. A., Fuentetaja, P. y Hormaza, J. I. (2006). Low temperature storage and *in vitro* germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) pollen. *Sci. Hort.*, 108, 91-94. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.12.003>
- Pérez, H. (2011). Respuesta del cultivo del aguacate (*Persea americana* Mill.) a la biofertilización en Nuevo San Juan Parangaricutiro [Tesis de grado]. Coahuila, México.
- Salazar-García, S., Garner, L. C. y Lovatt, C. J. (2013). Reproductive biology. En Schaffer, B., Wolstenholme, B. N., Whaley, A. W. (Eds.), *The avocado: Botany, Production and Uses* (2.ª ed.). Reino Unido: CAB International. <https://doi.org/10.1079/9781845937010.0000>
- Sierra, C. I. A. y Pardo, A. H. S. (2008). Abejas visitantes de *Aspilia tenella* (Kunth) SF Blake (Asteraceae): comportamiento de forrajeo y cargas polínicas. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 61(2), 4576-4587.
- Vásquez Romero, R. E., Martínez Sarmiento, R. A., Ortega Flórez, N. C. y Maldonado Quintero, W. D. (2012). *Manual técnico de apicultura abeja (Apis mellifera) polen*. Bogotá: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica. Produmedios.
- Walker, T. (2020). *Pollination: The enduring relationship between plant and pollinator*. USA: Princeton University Press.
- Wysoki, M., van den Berg, M. A., Ish-Am, G., Gazit, S., Peña, J. E. y Waite, G. K. (2002). Pest and pollinators of avocado. En J. E., Peña; J. L., Sharp; M., Wysoki. Wallingford (Eds.), *Tropical fruit pests y pollinators*. Estados Unidos.