MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA FERTILIDAD DEL POLEN Y SU RELACIÓN CON LOS RESULTADOS DE LAS POLINIZACIONES

María E. González, Ana Estévez y Diana García

ABSTRACT. Two staining methods -aceto carmin and acid fuchsine lactophenol- and *in vitro* germination were used to estimate pollen fertility in five potato varieties within the first, fifth and tenth days of pollen storage. Fertile pollen was ranked into three groups according to grain shape and content. Fertile pollen percentage decreased according to method arrangement and germination was reduced as days were passing away. Highly significant and positive correlations were recorded between aceto carmin and lactophenol. Just *in vitro* pollen germination was proved to be significantly correlated to fruit and seed number per fruit, giving an actual male fertility estimate.

Key words: fertility, pollination, germination, potato, *Solanum tuberosum*, pollen

RESUMEN. Dos métodos de tinción -aceto carmín y lactofenol fuchina ácida- y germinación *in vitro*, fueron aplicados para estimar la fertilidad del polen en cinco variedades de papa al primer, quinto y décimo días de almacenamiento del polen. El polen fértil fue dividido en tres clases basado en la forma y el contenido de los granos. Se apreció un decremento en el porcentaje de polen fértil en el orden indicado de los métodos, así como una disminución de la germinación con el transcurso de los días. Se encontraron correlaciones positivas y altamente significativas entre los métodos de aceto carmín y lactofenol. Se pudo comprobar que solamente la germinación del poler *in vitro* estuvo correlacionada significativamente con el número de frutos y semillas por fruto, dando un estimado más real de la fertilidad masculina.

Palabras clave: fertilidad, polinización, germinación, papa, *Solanum tuberosum*, polen

INTRODUCCIÓN

La determinación de la fertilidad del polen es un aspecto importante a tener en cuenta, para hacer conclusiones con respecto a investigaciones relacionadas con la reproducción sexual (Bamberg y Hanneman, 1991). Cuando observaciones microscópicas de los estilos indican que los tubos polínicos no penetran en el estilo, esto puede ser debido a incompatibilidades o a que el polen no es viable.

Existen diferentes métodos directos e indirectos para determinar la fertilidad del polen (María E. González *et al.*, 1992).

Los métodos de tinción son indirectos y han sido utilizados por diferentes investigadores (Ehlenfeldt, y Hanneman, 1984; Ana Estévez, 1985; Brown, 1989; Adiwilaga y Brown, 1991; Brown y Adiwilaga, 1991; Bamberg y Hanneman, 1991; y María E. González *et al.*, 1992); sin embargo, tienen la ventaja que permiten hacer predicciones rápidas de la fertilidad masculina. La determinación de la germinación *in vitro* del polen, es un método más directo con resultados más precisos, los que se corresponden en mayor medida con los éxitos en los cruzamientos (Jansen y Hermsen, 1976).

El objetivo del trabajo fue el estudio de la fertilidad del polen, a diferentes tiempos de conservación a 4°C mediante tres métodos y la relación entre estos métodos y el número de frutos y semillas por fruto.

Maria E. González y Diana García, Investigadores Agregados, y Dra. Ana Estévez , Investigador Titular del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal Nº 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de la fertilidad y germinación *in vitro* del polen en cinco variedades de papa (Desirée, Atlantic, Kondor, Aninca y Marinca). Se colectaron 100 flores de cada variedad en el momento de la antesis, aproximadamente a las 10 de la mañana del día 20 de enero de 1994. Se realizó la extracción del polen el mismo día de colectado y se conservó en frascos de vidrio tapados, los que se colocaron en condiciones refrigeradas a 4°C durante 10 días.

Los conteos al microscopio con un aumento de 450x(45x10x) se realizaron en número de 1 000 granos al primer, quinto y décimo días de almacenamiento y se determinaron los porcentajes de fertilidad y germinación del polen. Se realizó una apreciación visual de los granos de polen fértiles para los tres métodos, basado en el poder de germinación, la forma y el contenido de los granos de polen para los tres tiempos de conservación. Se consideró como polen con citoplasma muerto el redondo que se coloreó y no germinó.

Métodos utilizados para la determinación de la fertilidad del polen:

1.- Tinción con aceto carmín (1%), donde se consideró como polen fértil el redondo y coloreado de rojo.

2.- Tinción con lactofenol fuchina ácida, donde se consideró como polen fértil el redondo y coloreado de rojo brillante.

3.- Germinación *in vitro*, mediante el método descrito por María E. González *et al.* (1992), donde se consideró como grano de polen germinado aquel que el tubo polínico fuese dos veces mayor a su diámetro (Ramanna y Hermsen, 1974).

Se realizaron diferentes combinaciones híbridas, donde se seleccionaron 30 botones con características similares por cada progenitor femenino y se polinizaron (Tabla III) con polen de uno, cinco y 10 días de almacenamiento. Posteriormente alrededor de los 25 días se cosecharon los frutos botánicos (bayas), contándose por cada combinación el número de semillas total y se determinó el número promedio de semillas por baya y el porcentaje de fructificación (porcentaje de éxito).

Se hicieron análisis de proporciones para cada variedad con los tres métodos utilizados y los días de colección, con el objetivo de detectar si existieron diferencias entre los métodos y entre los días.

Se estimaron los coeficientes de correlación, así como los de sendero, considerándose un esquema causal donde:

Efecto: Y_0- número de semillas por fruto

Causas: X_1- polen teñido con aceto carmín (%)

X_2- polen teñido con lactofenol fuchina ácida (%)

X_3- polen germinado (%)

X_4- número de frutos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla I se muestra la apreciación visual de los granos de polen fértiles para los métodos de tinción con aceto carmín, lactofenol y germinación *in vitro*. Con carmín son teñidos de rojo, los granos redondos vivos, redondos con citoplasma muerto y los redondos con degeneración del citoplasma. Con lactofenol son teñidos de rojo brillante, los granos redondos vivos y redondos con citoplasma muerto. Por el método de germinación *in vitro*, solamente germinan los granos redondos vivos.

Tabla I. Apreciación visual de los granos de polen fértiles para tres métodos. Clasificación basada en el poder de germinación, la forma y el contenido de los granos de polen

Métodos	Características fenotípicas del grano de polen		
	Redondos vivos	Redondos con citoplasma muerto	Redondos con degeneración del citoplasma
Carmín	+	+	+
Lactofenol	+	+	-
Germinación	+	-	-

Estos resultados indican que el método de germinación determina el porcentaje de polen con citoplasma vivo, mientras que el carmín y lactofenol tiñen citoplasmas vivos y muertos, donde se realiza una sobreestimación de la fertilidad del polen. Esto se evidencia claramente en la Figura 1 (a-e). En esta se observa una disminución del porcentaje de polen fértil en el orden carmín, lactofenol y germinación. Con los métodos de tinción no disminuye el porcentaje en el transcurso de los días, lo que coincide con los resultados encontrados por Ana Estévez (1985), poniéndose de manifiesto que tiñen todo tipo de citoplasma. Estos métodos son muy fáciles y rápidos, y permiten analizar un gran número de observaciones, pero dan solamente una indicación de la fertilidad masculina.

Por otro lado, con la utilización del método de germinación, se observa que a medida que transcurren los días de almacenamiento del polen la viabilidad del mismo disminuye.

Según Tanner *et al.* (1990), el aceto carmín sobreestima la viabilidad del polen, pero da información adicional de la morfología nuclear. Este método también es utilizado para medir el diámetro del polen (Bannberg y Hanneman, 1991).

Los análisis de proporciones realizados para cada variedad por los tres métodos y días de almacenamiento, no muestran diferencias entre los métodos del carmín y lactofenol, pero sí existieron diferencias entre estos y la germinación. La Marinca no presentó diferencias entre los métodos de tinción ni entre los días de conservación, pero sí difirieron los dos primeros de la germinación, con excepción del carmín el primer día.

La variedad Kondor no difirió entre los dos primeros métodos, pero sí entre estos y la germinación para el quinto y décimo días de almacenamiento del polen. La Aninca presentó un comportamiento similar a la Kondor.

En la Desirée, en general, no se presentaron diferencias entre métodos, solamente se observaron diferencias para la germinación al décimo día.

Para la Atlantic, solo hubo diferencias significativas entre el carmín con polen de cinco días y la germinación.

Se puede apreciar una disminución de los porcentajes en el orden carmín, lactofenol, germinación, así como valores muy parecidos para los dos primeros métodos de tinción, los que son muy similares y no tendieron a variar con el tiempo de conservación; sin embargo, no ocurrió lo mismo para la germinación, donde hay una marcada disminución de los valores en el transcurso de los días de almacenamiento del polen. Según Ramanna y Hermsen (1974), el método de germinación es el más efectivo para la determinación de la viabilidad, lo que coincide con los resultados obtenidos en este trabajo y reafirma lo encontrado por María E. González *et al.* (1992).

Las variedades Kondor y Marinca presentaron los porcentajes de germinación más elevados, manteniéndose todavía polen funcional con un 23 y 35 % a los 10 días de conservación a 4°C.

La Aninca y la Desirée presentaron comportamientos similares, con valores al décimo día de 15 y 11 % respectivamente.

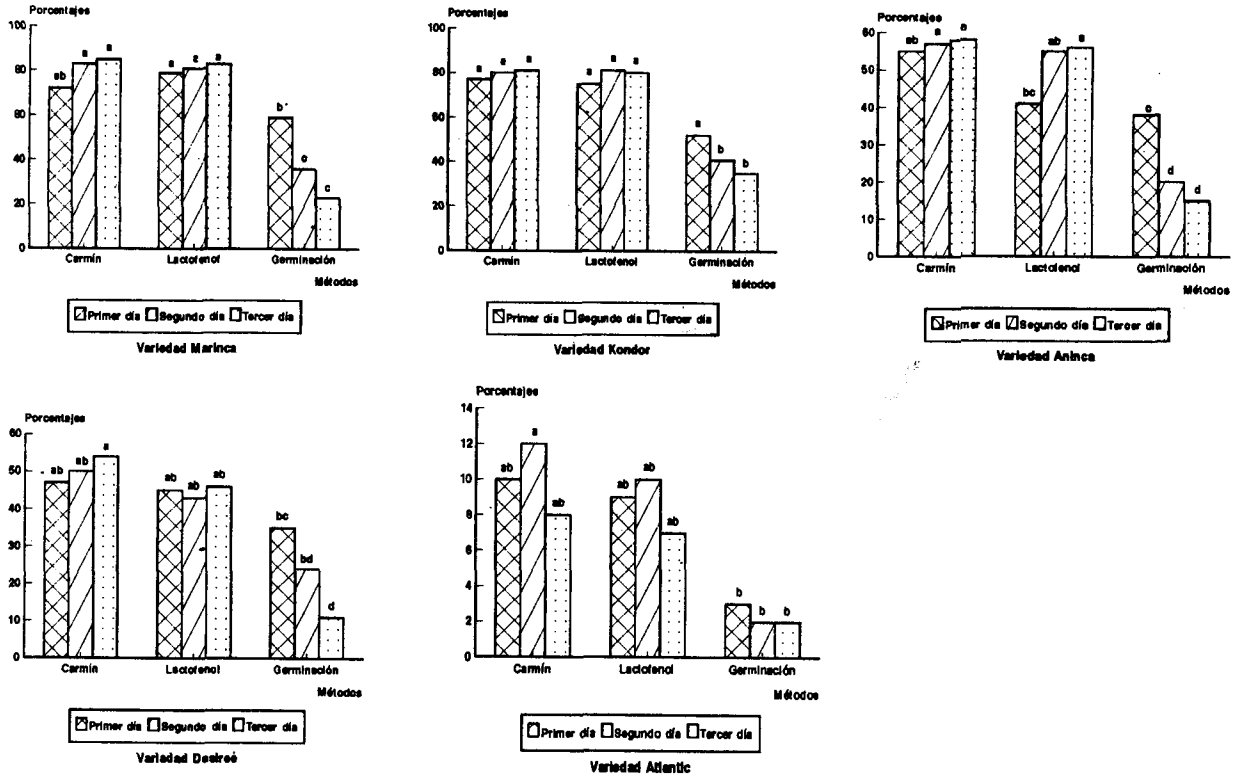

Figura 1. Porcentajes de polen fértil para tres métodos

La Atlantic presentó muy bajos porcentajes, lo que la limita como progenitor masculino.

En estudios realizados por María E. González *et al.* (1992), con polen de diferentes especies silvestres y cultivadas de papa conservadas a 17oC, se confirmó que a los 10 días la germinación era cero; sin embargo, en este trabajo se aprecia un incremento en valor cuando se disminuye la temperatura, lo que coincide con Sahar y Spiegel-Roy (1980), Ganeshan (1985), Lee, Thomas y Buchman (1985), los que plantean una mayor prolongación de la germinación del polen con la disminución de la temperatura.

Los resultados de los cruces con polen de diferentes días de conservación se aprecian en la Tabla II. Cuando se utilizaron como progenitor masculino las variedades Kondor y Marinca, se logró la mayor cantidad de frutos, así como los mejores porcentajes de fructificación, destacándose la combinación Atlantic x Kondor con un 76.7 %, Atlantic x Marinca (70 %) y Desirée x Marinca (66.7 %). No se lograron éxitos cuando se utilizó la Atlantic como progenitor masculino, debido a su mala fertilidad masculina (Tabla II).

El mayor número de semillas por fruto se encontró en la combinación Atlantic x Kondor (58), seguido de la Atlantic x Marinca (56), Aninca x Kondor (53) y Desireé x Kondor (50), lo que se corresponde con los resultados encontrados en la Tabla II en cuanto a la germinación del polen.

Los cruces Desirée x Aninca, Atlantic x Aninca y Atlantic x Desirée presentaron valores muy similares (32, 33 y 31) en cuanto a semillas por fruto.

De 300 flores cruzadas por cada tratamiento, mediante polen del primer día se cosecharon 114 frutos con 5 555 semillas, teniendo un promedio de semillas por fruto de 48.7; mediante polen de cinco días se cosecharon 70 frutos con 1 891 semillas y un promedio de semillas por fruto de 27; mediante polen de 10 días solo se lograron 33 frutos con 651 semillas y un promedio de 19.7 semillas.

Se pudo apreciar que a medida que aumentó el tratamiento de almacenamiento, van disminuyendo los valores de las variables estudiadas.

En la Tabla III se observan las correlaciones entre los métodos y los resultados de las polinizaciones. Se encontraron correlaciones positivas y altamente significativas entre los métodos de carmín y lactofenol, lo que manifiesta que se obtuvieron resultados muy similares en la determinación de la fertilidad masculina.

Se apreciaron también correlaciones positivas y altamente significativas entre el método de germinación y el número de frutos y semillas por fruto, corroborándose que este método nos da resultados más confiables para planificar los cruzamientos. Esto confirma lo planteado por Janssen y Hermsen (1976), los que concluyeron que solamente la germinación del polen *in vitro*, está significativamente correlacionada con las bayas y semillas por baya, dando un estimado confiable de la fertilidad masculina.

Tabla II. Resultados de los cruces con polen al primer, quinto y décimo días de almacenamiento

Combinaciones híbridas	Días de colección	Número de polinizaciones	Número de frutos logrados	Porcentaje de fructificación	Número de semillas total	Número de semillas por fruto
Desirée x Aninca	1	30	10	33.3	316	32
	5	30	6	20.0	109	18
	10	30	2	6.7	17	8
Desirée x Marinca	1	30	20	66.7	1 000	50
	5	30	10	33.3	212	21
	10	30	4	13.3	127	16
Aninca x Kondor	1	30	16	53.3	849	53
	5	30	9	30.0	181	20
	10	30	5	5.6	60	12
Atlantic x Kondor	1	30	23	76.7	1 334	58
	5	30	18	60.0	792	44
	10	30	8	26.7	256	32
Atlantic x Aninca	1	30	9	30.0	300	33
	5	30	6	20.0	113	19
	10	30	2	6.7	20	10
Atlantic x Marinca	1	30	21	70.0	1 176	56
	5	30	16	53.3	384	24
	10	30	9	30.0	135	15
Atlantic x Desirée	1	30	12	40.0	517	31
	5	30	5	16.7	100	20
	10	30	3	10.0	36	12
Marinca x Aninca	1	30	3	10.0	63	21
	5	30	0	0.0	-	-
	10	30	0	0.0	-	-
Aninca x Atlantic	1	30	0	0.0	-	-
	5	30	0	0.0	-	-
	10	30	0	0.0	-	-
Desirée x Atlantic	1	30	0	0.0	-	-
	5	30	0	0.0	-	-
	10	30	0	0.0	-	-
Total	1	300	114	38.0	5 555	48.7
	5	300	70	23.0	1 891	27
	10	300	33	11.0	651	19.7

Tabla III. Correlaciones entre los métodos y los resultados de las polinizaciones

	Carmín	Lacto-fenol	Germi-nación	Número de frutos
Lactofenol	0.972**			
Germinación	0.380	0.413		
Número de frutos	0.352	0.426	0.869 **	
Número de semillas por fruto	0.197	0.251	0.915 **	0.904 **

También se encontró asociación entre el número de frutos y el número de semillas por fruto. Según Brown y Adiwilaga (1991), un normal desarrollo de las bayas es debido a polinizaciones con polen compatible, el cual permite una abundante formación de semillas.

No hubo asociación entre los métodos de tinción y los resultados de la polinización, ni entre estos y el método de germinación *in vitro*.

El número de semillas es un requisito indispensable para iniciar el mejoramiento por hibridación, siendo necesario determinar qué variable de forma directa aporta una mayor contribución a esta, lo que se puede lograr mediante la contribución de la técnica de los coeficientes de sendero, pues los coeficientes de correlación involucran los efectos directos e indirectos de las variables (María E. González *et al.*, 1987).

En la Tabla IV se presentan las contribuciones directas (senderos) e indirectas con el número de semillas por fruto. La variable que presentó una mayor contribución directa fue la germinación del polen. Además, se observó que la correlación que alcanzó el número de frutos con el número de semillas, se debe fundamentalmente a su influencia indirecta a través de la germinación del polen.

En el trabajo se pudo comprobar que cuando se utilizan los métodos de carmín y lactofenol, se hace una sobreestimación de la fertilidad del polen, por lo que deben utilizarse con precaución.

Tabla IV. Contribuciones directas (coeficientes de sendero) e indirectas de diferentes variables con el número de semillas por fruto

	Carmín	Lacto-fenol	Germi-nación	Número de frutos	Correlación con el número de semillas
Carmín	**0.1132**	-0.0382	0.6278	-0.5059	0.1970
Lactofenol	0.0398	**-0.1085**	0.5600	-0.2404	0.2510
Germi-nación	0.0484	-0.0412	**1.4738**	-0.5658	0.9150**
Número de frutos	0.0984	-0.448	1.4325	**-0.5821**	0.9040**

Efecto residual 0.4273

Se evidenció que solo el porcentaje de germinación *in vitro* estuvo correlacionado con el número de frutos y semillas por fruto, siendo este el que presentó la mayor contribución de forma directa al número de semillas logradas, donde se corroboró que el número de semillas depende de la cantidad de polen germinado. Entonces se puede afirmar que el método de germinación *in vitro* brinda una estimación más real de la fertilidad del polen.

BIBLIOGRAFÍA

Adiwilaga, K. D y C. R. Brown. Use of 2n Pollen Producing Triploid Hybrids to Introduce Tetraploid Mexican Wild Species Germplasm to Cultivated Tetraploid Potato Gene Pool. Theor. Appl. Genet. (Nueva York)81: 645- 652, 1991.

Bamberg, J. B. y R. E. Hanneman. Rapid Ploidy Screening of Tuber-Bearing Solanum (Potato) Species through Pollen Diameter Measurement. American Potato Journal (Orono)68: 279-285, 1991.

Brown, G. R. Introgression of Solanum acaule Germplasm from the Endosperm Balance Number 2 Gene Pool into the Cultivated Endosperm Balance Number 4 Potato Gene Pool via Triplandroids. Genome 33: 273-278, 1989.

Brown, G. R. Characteristics of 2n Pollen Producing Triploid Hybrids between Solanum stoloniferum and Cultivated Diploid Potatoes American Potato Journal (Orono)65: 75-84, 1991.

Brown, G. R. y K. D. Adiwilaga. Use of Rescue Pollination to Make a Complex Interspecific Cross in Potato, American Potato Journal (Orono)68: 813-820, 1991.

Ehlenfeldt, M. K. y R. E. Hannenman. The use of Endosperm Balance Number and 2n Gametes to Transfer Exotic Germplasm in Potato. Theor. Appl. Genet. (Nueva York)68:155-161, 1984.

Estévez, Ana. Estudio de la viabilidad del polen en cinco variedades de papa. Cultivos Tropicales (La Habana) 7(3): 75-80, 1985.

Ganeshan, S. Viability and Fertilizing Capacity of Onion Pollen Stored in Liquid Nitrogen. Tropical Agriculture (Trinidad)63:46-48, 1985.

González, María E. /et al./. Estudio de correlaciones y coeficientes de sendero en soya en las épocas de invierno y verano. Cultivos Tropicales (La Habana)9(4):33-37, 1987.

González, María E., /et al./. Estudio de la fertilidad del polen en especies de papa. Cultivos Tropicales (La Habana)13(1):70-73, 1992.

Jansen, A. W. B. y J. G. Hermsen. Estimating Pollen Fertility in Solanum Species and Haploids. Euphytica 25: 577-586, 1976.

Lee, C. W., J. C. Thomas y S. L. Buchman. Factors Affecting In Vitro Germination and Storage of Jojoba Pollen. Journal of American Society for Horticultural Science (Alexandria)110: 671-676, 1985.

Ramana, M. S. y J. G. Hermsen. Unilateral "Eclipse Sterility" in Reciprocal Crosses between Solanum verrucosum Schlechtd and Diploid S.tuberosum. Euphytica (Wageningen)23: 417-421, 1974.

Sahar, N. y P. S. Spiegel-Roy Citrus Pollen Storage. Hort. Science (Alexandria)15: 81-82, 1980.

Tanner G. J. /et al./. Initiation of Non-Physiological Division and Manipulation of Developmental Pathway in Cultured Microspores of Medicago sp. Protoplasma 158: 165-175, 1990.

Recibido: 2 de marzo de 1995
Aceptado: 21 de abril de 1995