DETERMINACION DE LA FRECUENCIA DE POLINIZACION NATURAL CRUZADA EN TOMATE MEDIANTE LA UTILIZACION DE MARCADORES GENETICOS.

A SIGARROA Y ANA ESTEVEZ

INSTITUTO DE CIENCIA AGRICOLA GAVETA POSTAL Nº 1, SAN JOSE DE LAS LÁJAS, LA HABANA

Se llevó a cabo un experimento, consis- tente en la estimación del % de alogamiaen tomate, utilizando los marcadores ge-néticos recesivos ag/ag (anthocyanin gainer) y c/c (potato leaf) detectables en el estadio de plántula y presentes en las variedades Manalucie y Geneva 3000, res-pectivamente. Los valores encontrados en las Estaciones Experimentales de Bauta y-Tapaste (INCA) durante los años 1975 y ---1976, no alcanzaron el 3% de polinización natural oruzada. El análisis de varianza modelo factorial arrojó diferencias sig-nificativas para las variedades utiliza -das. las localidades muestreadas y para las interacciones de primer orden varie-dad x año y localidad x año. Se reco- -mienda la utilización del método en aquellas regiones donde insectos vectores del polen sean detectados.

En el mejoramiento genético de las plantas se utilizanfrecuentemente dos métodos: la hibridización, cuyo objetivoes la creación de variabilidad genética mediante el cruzamiento, y la selección, cuya finalidad radica en la explotación de la variabilidad creada, eliminando los genotipos pobres y fijando los óptimos. Sin embargo, para que estos métodos puedan ser eficientemente empleados, es necesario poseer un conocimiento previo acerca de la morfología floral y
de los mecanismos de reproducción de la especie o especies cuyo mejoramiento se desea emprender.

El tomate (Lycopersicon esculentum Mill) presenta, porlo general, inflorescencias de 4-6 flores. El cáliz y la -corola están constituidos casi siempre por 6 lóbulos (sépa-los y pétalos) y se presentan 6 estambres unidos a la base de la corola, con filamentos cortos coronados por anteras -amarillas, las cuales se hallan parcialmente unidas, formando un cono alrededor del pistilo. La posición pendiente de
las flores y la dehiscencia longitudinal de las anteras fa-vorecen la autogamia. Sin embargo, la dehiscencia ocurre 1ó 2 días después de la antesis, por lo cual puede verificarse también la polinización cruzada (Bin y Soressi, 1972; - Free, 1970).

Las investigaciones relacionadas con la frecuencia de polinización natural cruzada en las distintas regiones y localidades son de gran importancia, tanto para el manteni- miento de la pureza de las líneas y variedades en colección, como para la producción de semilla híbrida comercial. Los trabajos realizados con este propósito han sido numerosos. Jones, en 1916 (citado por Hayes e Immer, 1954), utilizandom mutante enano sembrado en un diseño de plantas alternas en Connecticut, encontró de 2-4% de polinización natural - cruzada. Posteriormente, Lesley (1924), utilizando 2 variedades diferentes en California, encontró que la variedad - Dwarf Champion presentaba un % de polinización natural cruzada (0,59%) mucho menor y significativamente diferente de la variedad Magnus (4,9%). Esta diferencia estuvo dada por la presencia en esta última variedad de un estilo mucho - --

mayor, el cual sobresalía 1,4 mm por encima del cono que - - forman las anteras. De esta investigación se deriva que la-exposición del estigma es uno de los factores determinantes-en la obtención de un elevado % de alogamia.

La mayor parte de las variedades que se cultivan en - - países tales como México y Perú presentan el estilo ligera--mente exerto y pueden ser encontrados valores promedios entre 15-26% de polinización natural cruzada en plantas típi--camente autógamas (Rick, 1958). El fotoperíodo, las altas - temperaturas y la baja humedad son agentes ambientales que - influyen en el elongamiento de los estilos antes de que se - produzca la dehiscencia de las anteras (Bin y Soressi, 1972; Haskell y Paterson, 1966).

El viento y los insectos vectores del polen son agentes que influyen en el grado de alogamia. El primero de ellos - ha sido considerado de importancia despreciable con relación con el último (Boswell, 1961), aunque se ha establecido que-la acción del viento favorece positivamente al polinizador - (Currence y Jenkins, 1942).

Los mutantes androestériles han sido ampliamente utilizados en las investigaciones relacionadas con la determina-ción del % de polinización natural cruzada (Bullard y Ste- venson, 1953; Clayberg, 1959; Hafen y Stevenson, 1956; Rick, 1947. 1949, 1950; Soost y Rick, 1957). Sin embargo, la utilización de líneas autofértiles ofrece resultados más precisos sobre el grado de cruzamiento natural, debido a que losgranos de polen transportados a las flores pueden establecer competencia con los de las anteras de la propia flor. Numerosas lineas autofértiles man sido utilizadas en estas inyestigaciones y entre ellas el gen marcador más empleado hasido el mutante "hoja patatera" (potato lear), Bin y Spressi. 1972; Clayberg, 1959; Currence y Jenking, 1942; Haskell y --Paterson, 1966; Marchesi, 1959, 1961; Richardson y Alvarez,-1957; Rick, 1958; Soressi y Lorenzoni, 1970). En Cuba no se tienen antecedentes de trabajos realizados en este sentido y un estudio de la tasa de alogamia permitiria tomar precauciones en los trabajos de mejoramiento encaminados tanto a la selección de líneas puras como a la producción de hibridos y semilla comercial.

El propósito de nuestra investigación consistió en - -efectuar un estimado del % de polinización natural oruzada,utilizando dos marcadores genéticos en líneas autofértiles y
precisar la influencia ambiental (localidades y años) sobrela manifestación de este parámetro.

MATERIALES Y METODOS

El experimento se llevó a cabo en las Estaciones Experimentales de Bauta y Tapaste, en la provincia de La Habana, ambas pertenecientes al Instituto de Ciencia Agrícola (INCA), en las cuales se realizaban proyectos de mejoramiento en tomate. Se utilizaron 2 líneas autofértiles con marcadores egenéticos situados en diferentes grupos de ligamiento. La variedad Manalucie Verde fue suministrada por H. Laterrot, en la Estación Experimental de Montfavet (INRA), en Francia, y su genotipo presentaba condición homocigótica para el alelo ag (ag/ag-) que elimina la presencia de antocianina en el eje hipocotílico, que es su fenotipo normal para la forma de la hoja (/ / /).

El otro genotipo utilizado fue la variedad Geneva-3000(proporcionada por G.P. Soressi, del Instituto Experimentalde Horticaltura, en Milán, Italia) con el eje hipocotílico normal (/ / /) y hoja patatera (c / o). El alelo ag está situado en el grupo de ligamiento 10, mientras que el alelo c se presenta en el grupo de ligamiento 6. De esta -forma, se contó con 2 marcadores genéticos de fácil detección en el estadio de plántula, lo cual facilitó grandemente
las condiciones experimentales.

Las siembras se realizaron durante los años 1975 y 1976 y el diseño aplicado fue el de plantas alternas, utilizándose para ello 2 bloques de 5 surcos, con una distancia de - siembra de 40 cm entre plantas y 130 cm entre surcos. Cadabloque presentaba un total de 150 plantas, distribuidas en surcos de 30 plantas, con los marcadores alternos dentro decada surco.

En cada una de las localidades se efectuaron 4 mues- -- treos, con un tamaño de muestra de aproximadamente 30 frutes por muestreo, de tal manera que en el experimento fueron -- procesados un total de 450 frutos, a los cuales se les ex-

trajeron las semillas separadamente. Estas fueron sembradas posteriormente en semilleros, para analizar el fenotipo de - cada una de las plántulas. El % de plántulas con hoja nor-mal, respecto al total de plántulas de la variedad Geneva- - 3000, se tomó como medida de la polinización natural cruzada en esta variedad, y de igual forma el % de plántulas con eleje hipocotílico púrpura (normal), en la variedad Manolucie-Verde, en relación con el total de plántulas de esta varie-dad, constituyó el % de polinización natural cruzada de la - misma.

Se procedió, además, a efectuar un análisis estadístico de los datos, mediante la aplicación de un análisis de va-rianza modelo factorial, considerando como factores las va-riedades utilizadas, las localidades en que se desarrolló el experimento y los años, calculándose, además, las interac-ciones de primero y segundo orden entre estos factores.

Un test de normalidad arrojó la ausencia de distribu-ción normal en los datos originales expresados en % y en -donde un gran número de valores eran cero, por lo cual se -lievó a cabo una transformación de los mismos a $\sqrt{x \neq 0,5}$, según Steel y Torrie (1960).

RESULTADOS Y DISCUSION

El % de polinización natural cruzada fue calculado talcomo se describió en Materiales y Métodos, y los resultadosse presentan en la Tabla 1, en la cual separamos convenien -temente los valores para variedades, localidades y años. --Ambas variedades mostraron un rango de polinización naturalcruzada menor del 3%, indicando una poca actividad de los -insectos en las localidades en que fue desarrollado el experimento. No se realizaron observaciones entomológicas, al no haberse detectado ningún insecto vector de polen en las áreas experimentales. En contraste con las localidades en que se desarrolló nuestro experimento, Laterrot, en 1976 - -(Comunicación personal), detectó en la Estación de Produc- oión de Semillas en Charco Azul, Escambray, la presencia dela especie Exomalopsis bruesi Cook, perteneciente a la familia Anthophoridae reportada en Perú por Rick (1950), como -polinizador del Lycopersicon peruvianum y presente, además,- en Guadalupe, cuya ecología es muy similar a la zona del Escambray y en donde valores del orden del 40% de polinización natural cruzada han sido reportados en las variedades de tomate. Este hecho resalta la necesidad de un estudio de este tipo en esta localidad, tomando en cuenta que en la misma se produce semilla comercial.

Las observaciones realizadas en cuanto a la morfologíafloral de las variedades indicaron que la longitud del estilo nunca superaba al cono que forman las anteras de la floren ambas variedades, alcanzando este nivel en algunos casossólo la variedad Manalucie Verde.

Se realizó un estudio estadístico mediante la aplica--ción de un test F y los resultados se presentan en la Tabla 2. Las fuentes de variación Variedades y Localidades -presentaron diferencias significativas a los niveles de probabilidad de 0,01 y 0,05, respectivamente, indicando un comportamiento diferencial de ambas variedades en cuanto al - grado de alogamia y una influencia ambiental de las locali -dades donde se desarrolló el experimento. Obsérvese en la -Tabla 1 que ambas variedades presentaron un mayor % de polinización natural cruzada en la localidad de Tapaste en ambos Se obtuvieron, además, diferencias significativas alnivel de probabilidad de 0,05 en las interacciones de primer orden Variedad x Año y Localidad x Año. Como hemos recalcado anteriormente, la utilización de líneas autofértiles conmarcadores genéticos en experimentos donde se pretende estimar el % de polinización natural cruzada, es mucho más pre-cisa que el empleo de plantas androestériles, debido a que el alopolen establece competencia con el autopolen en las -plantas fértiles. Cuando la polinización natural cruzada -presente valores elevados, como pudiera ser el caso de la -región de producción de semillas en el Escambray, la utili -zación de lineas autofértiles con genes marcadores de fácilreconocimiento en el estadio de plantula o en la propia se-milla, como ocurre con los genes semilla carmelita (bs) y -semilla esponjosa (as) descritos por Soressi (1969), pudie-ran ser empleados para la producción de semilla híbrida. - utilizando el beneficio que reporta la polinización naturalcruzada. Además, el hecho de que las plantas androestériles

produzcan una limitada cantidad de frutos por planta y muy pocas semillas por fruto en comparación con las plantas autofértiles (Clayberg, 1959; Lapushner y Frankel, 1967), justifica más su uso en la producción de semilla híbrida comercial. Esta realización no deberá ser lejana en nuestro país
por las innumerables ventajas que representa el híbrido comercial de tomate y que han sido enumeradas por algunos - -autores (Bin y Soressi, 1972; Lapushner y Frankel, 1967).

Estudios de polinización natural oruzada deberán ser -emprendidos en otras regiones y localidades de nuestro paísdonde se llevan a cabo trabajos de mejoramiento, producciónde semillas y mantenimiento de líneas de tomate, fundamen- talmente en localidades donde se tengan antecedentes de la-presencia de insectos vectores del polen (localidad de Charco Azul), con la finalidad de mantener la pureza varietal -y/o aprovechar las ventajas de la polinización natural oru-zada en la producción de semilla híbrida comercial.

- La polinización natural cruzada es un parámetro de -gran importancia para el mantenimiento de la pureza varietal
 y para la producción de híbridos en líneas autofértiles.
- La polinización natural cruzada depende en gran medida de la morfología floral, en cuanto a la situación del estilo con respecto al cono que forman las anteras y de la fauna entomófila polinizadora.
- Las localidades en que se desarrolló nuestro experimento dieron como resultado valores bajos de polinización -- natural cruzada, por la ausencia de estilos exertos en las variedades utilizadas y la baja frecuencia de insectos vectores del polen.
- Experimentos relacionados con la estimación del % depolinización natural cruzada deben ser emprendidos en otrasregiones y localidades del país, fundamentalmente en la región de Charco Azul, Escambray, donde se tienen antecedentes
 de insectos vectores de polen.
- Los genes marcadores de fácil reconccimiente en plantas autofértiles deben ser aprovechados para la producción de semilla híbrida comercial.

DETERMINATION OF THE NATURAL CROSS
POLLINATION FREQUENCY IN TOMATO
(LYCOPERSICON ESCULENTUM MILL) BY USING
GENETIC MARKERS

An experiment was carried out with the -aim of estimating allogamy % in tomato, using the genetic recessive markers ag/ag (anthocyanin gainer) and c/c (potato - -leaf), which are detected at seedling - stage and are present in the varieties --Manalucie and Geneva 3000, respectively .-The values found at the Experimental - --Stations of Bauta and Tapaste (INCA) along 1975 and 1976 did not reach 3% of the - natural cross pollination. Variance analysis, by means of the factorial design. showed significant differences not only for the varieties used, but for every - location sampled and also for the first-rate interactions variety/year and location/year. This method is recomended to be used in those regions where pollen- transmitting insects are detected.

TABLA 1. Valores expresados en % de polinización natural -cruzada encontrados en las variedades Geneva 3000 y Manalu-cie Verde en las localidades de Bauta y Tapaste durante los
años 1975 y 1976.

	Gene va	3000	Manalucie Verde	
	Tapaste	Bauta	Tapas te	Bauta
1 9 7 5	1,27%	0,03%	2,66%	0,59%
1 9 7 6	0,82%	0,73%	1,21%	0,42%

TABLA 2. Resultados del Análisis de varianza factorial.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	F
Variedades (A)	1	0,31	18,2**
Localidades (B)	1	0,15	8,8
Años (C)	1	0,003	0,17 n.s.
AxB	1	0,05	2,9 n.s.
A x C	1	0,30	11,11*
ВжС	1	0,16	9,4*
AxBxC	: 1	0,01	0,6 n.s.
Error	8	0,017	
Total	15		

^{* =} Significative al nivel de probabilidad p < 0.05

^{** =} Significative al nivel de probabilidad p < 0.01

REFERENCIAS

- BIN, F. y G.P. SORESSI: Insetti pronubi e produzione di seme ibrido di pomodoro. Genética Agraria 27: 35-74, 1972.
- BOSWELL, V.R.: Flowering habit and production of seeds. The Yearbook of Agriculture. Washington, 1961.
- BULLARD, E.T. y E.C. STEVENSON: Production of hybrid tomatoseed. Proc. Amer. Soc. Hort. Soi., 61: 451-458, --
- CIAYHERG, C.D.: Observations on the effectivity of natural cross-pollination. Tomato Gen. Coop. Rep., 9: 27-28, 1959.
- CURRENCE, T.M. y J.M. JENKINS: Natural crossing in tomatoesas related to distance and direction. Proc. Amor. Soc. Hort. Soi. 41; 473-276, 1942.
- FREE, J.B.: Insect pollination of crops. Academic Press, -- London and New York, 1970.
- HAFEN, L. y E.C. STEVENSON: Natural cross pollination in - tomato using several male-sterile mutants. Proc. Amero. Soc. Hort. Sci 68: 433-436, 1956.
- HASKELL, G. y E.B. PATERSON: Genetic determination of natural self-pollination in Scottish Glasshouse tomatoes. Euphytica 15: 128-132, 1966.
- HAYES, H.M. y F.R. IMMER: Nuevos métodos de selección de - plantas. Versión al español, 1954.
- IAPUSHNER, D. y R. FRANKEL: Practical aspects and the use of male-sterility in the production of hybrid tomato-seed. Euphytica 16: 300-310, 1967.
- LATERROT: Comunicación personal.
- LESLEY, J.W.: Cross-pollination of tomatoes. J. Hered. 15: 233-235, 1924.
- MARCHESI, G.: Frequenze di fecondaziones incrociata naturale nel pomodoro. Genética Agraria 10: 309-319, 1959.
- MARCHESI, G.: Fecondaziones incrociata naturale in due cultivar di pomodoro. Atti VII Congresso Annuale - Soc. Italiana Genética Agraria 14: 380-385, 1961.
- RICHARDSON, R.W. y E.L. ALVAREZ: Pollination relationships among vegetable crops in Mexico I. Natural cross--pollination in cultivated tomatoes. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 69: 366-371, 1957.
- RICK, C.M.: The effect of planting design upon amount of -seed produced by male-sterile tomato plants as a result of natural cross-pollination. Proc. Amer.
 Soc. Hort. Soi. 50: 273-284, 1947.

- RICK, C.M.: Rates of natural cross-pollination of tomatoes in various localities in California as measured by the fruits and seed set on male-sterile plants. -- Proc. Amer. Soc. Hort. Sci 54: 237-252, 1949.
- RICK, C.M.: Pollination relations of Lycopersicon esculentum in native and foreign regions. Evolution 4: 110--122, 1950.
- RICK, C.M.: NCP in cultivated tomatoes from the Chile-Peru frotier. Tomato Gen. Coop. Rep. 8: 31, 1958.
- SOOST, K.R. y C.M. RICK: Effect of varieties of pollen and ovule parents on natural cross-pollination of tomatces. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 70: 357-365, 1957.
- SORESSI, G.P.: Utilità di alcuni caratteri mutanti nella constituzione di cultivar e ibridi per la raccolta meccanica nel pomodoro. Sementi Ellette 15: 76-81, 1969.
- SORESSI, G.P. y C. LORENZONI: Crossing rate after natural or hand pollination with and without flower emasculation, Tomato Gan. Coop. Rep. 20: 61-63, 1970.
- STEEL, R.G.D. y J.H. TORRIE: Principles and procedures of -statistics. Mo. Graw-Hill Co. INC., New York, 1960.