# COMUNICACION CORTA
# EFECTO DEL ESTRES DE ALTAS TEMPERATURAS SOBRE LA GERMINACION *In Vitro* DEL POLEN DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

**Marta Alvarez, M. Varela y Gladys Verde**

**ABSTRACT.** The pollen of Campbell-28 cv. (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and wild Nagcarlán (*Lycopersicon esculentum* var. cerasiforme) was exposed to different heat treatments: a) temperatures of 40, 45, 50, 55 and 60°C for 90 minutes previous to germination and b) temperatures of 30°C and 35° C for 30, 60, 90, 120 and 180 minutes at *in vitro* germination. As a result of heat treatments, in general, *in vitro* pollen germination percentage was more affected than pollen tube length in Campbell-28 cv. rather than in Nagcarlán. Treatments of 45°C for 90 minutes previous to germination and 35°C for 60 and 90 minutes at germination stage provoked a greater differentiation in pollen germination of Campbell-28 and Nagcarlán. These results constitute the basis for some studies being aimed to use the gametophytic selection of tomato breeding programs for its tolerance to high temperatures, as well as the establishment of screening methods against this stressing agent.

*Key words*: Stress, high temperatures, *in vitro* germination, pollen germination, tomato, *Lycopersicon esculentum*

**RESUMEN.** El polen de la variedad Campbell-28 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y del tipo silvestre Nagcarlán (*Lycopersicon esculentum* var. cerasiforme) fue expuesto a diferentes tratamientos de calor: a) temperaturas de 40, 45, 50, 55 y 60°C durante 90 minutos, previo a la germinación y b) temperaturas de 30° y 35°C por 30, 60, 90, 120 y 180 minutos, durante la germinación *in vitro*. Como resultado de los tratamientos de calor se observó, en forma general, que se afectó más el por ciento de germinación del polen *in vitro* que la longitud del tubo polínico en la variedad Campbell-28 que en Nagcarlán. Los tratamientos que provocaron una mayor diferenciación en la germinación del polen de Campbell-28 y Nagcarlán, fueron los tratamientos de 45°C por 90 minutos, previo a la germinación y de 35°C por 60 y 90 minutos, durante la germinación. Estos resultados sirven de base a los estudios que se vienen realizando, con vistas a utilizar la selección gametofítica en los programas de mejoramiento genético del tomate para la tolerancia a las altas temperaturas, así como el establecimiento de métodos de screening ante este agente estresante.

*Palabras claves*: Estrés, altas temperaturas, germinación *in vitro*, germinación del polen, tomate, *Lycopersicon esculentum*

## INTRODUCCION

En los últimos años se ha demostrado que la selección gametofítica masculina puede jugar un rol importante en el mejoramiento de la tolerancia de las plantas a los estrés bióticos y abióticos, para lo cual deben emplearse esquemas de selección en la fase haploide, que sean capaces de producir efectos positivos sobre la fase diploide (Zamir, 1983).

En el cultivo del tomate, Tanksley, Zamir y Rick (1981) demostraron que una gran proporción de genes (60 %) se expresan tanto en fase esporofítica como gametofítica. Este gran solapamiento en la expresión génica posibilitaría que en muchos casos se pueda seleccionar a nivel de polen, caracteres que se desean en la planta (Ottaviano y Mulcahy, 1989).

Una estrecha correspondencia entre caracteres expresados en el polen y en la planta, ha sido probada en el tomate para bajas temperaturas (Zamir y Gadish, 1987), salinidad (Sacher *et al.*, 1982), toxinas de *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* (Bino *et al.*, 1988) y toxicidad al aluminio (Searcy y Mulcahy, 1990).

En el caso de las altas temperaturas, se ha demostrado la existencia de una estrecha relación entre la germinación del polen *in vitro* y algunos caracteres indicadores de la tolerancia al calor en la planta (Marta Alvarez, 1982, y Weaver y Timm, 1989), así como el predominio de acción génica aditiva y una elevada correlación positiva para el porcentaje de germinación del polen *in vitro* y el porcentaje de fructificación de la planta (Marta Alvarez *et al.*, 1992), lo cual constituye una condición indispensable para el posible uso de la selección gametofítica en los programas de mejora genética para dicho estrés.

Dra. Marta Alvarez, Investigador Titular del departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal y M. Varela, Investigador del departamento de Matemática Aplicada, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal No. 1, San José de las Lajas, La Habana; Gladys Verde, Profesor Asistente del departamento de Biología y Fitotecnia, Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias de La Habana, Apartado Postal 18-19, San José de las Lajas, La Habana.

En nuestro país, con el fin de elevar la tolerancia del tomate a las condiciones de altas temperaturas y humedad, se lleva a cabo la hibridación durante el período de invierno y la selección a nivel de plantas, durante los períodos de primavera y verano. Resulta de interés conocer si tratamientos dados al polen previo a la polinización tendrían un efecto positivo en la competitividad de estos para efectuar la fertilización, lo cual posibilitaría incorporar la selección de polen durante el proceso de hibridación y estudiar su efecto sobre la progenie.

Es por ello que el objetivo de este trabajo fue determinar primeramente a nivel *in vitro*, el efecto de la aplicación de diferentes tratamientos de calor al polen en estadio de polen maduro (postmeiótico) sobre la germinación de este y el crecimiento del tubo polínico, así como escoger el momento más adecuado para la aplicación del estrés y la magnitud o presión de selección a emplear en posteriores experimentos *in vitro*.

## MATERIALES Y METODOS

Se sembró la variedad Campbell-28 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y el tipo silvestre Nagcarlán (*Lycopersicon esculentum* var. cerasiforme), a razón de 20 plantas por cada una, en macetas al aire libre que contenían una mezcla de suelo Ferralítico Rojo compactado (Hernández *et al.*, 1975) y materia orgánica (3:1), el 4 de diciembre de 1990 y el 24 de noviembre de 1991, en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. El riego fue diario y la fertilización así como las atenciones fitosanitarias se efectuaron según lo establecido por el Instructivo técnico del cultivo (Cuba. Ministerio de la Agricultura, 1984).

El procedimiento para la germinación *in vitro* consistió en extraer el polen de cada flor mediante un vibrador eléctrico y esparcirlo sobre portaobjetos excavados conteniendo el medio de germinación propuesto por Weaver y Timm (1989). Estos se colocaron en cajas plásticas hermetizadas con papel de filtro humedecido en su interior y se dejaron transcurrir alrededor de 18 horas antes de realizar la tinción con cotton blue en lactofenol.

Se efectuaron seis muestreos de cinco flores en el momento de la antesis para cada tratamiento. Los tratamientos de calor se aplicaron en una incubadora con temperatura controlada (± 2°C): a) las ramas florales se sumergieron en beaker con agua a temperaturas de 40, 45, 50, 55 y 60°C por 90 minutos; posteriormente se extrajo el polen y se colocó a germinar a 23°C y b) se extrajo el polen y se colocó a germinar a 35°C por 30, 60, 90, 120 y 180 minutos, colocándose posteriormente a 23°C.

En todos los casos se utilizó como control el polen germinado a 23°C el día que fue colectado.

Para evaluar el porcentaje de germinación se contaron 200 granos de polen en diferentes campos de cada preparación, siendo considerados como capaces de germinar aquellos que emitieron el tubo polínico con una longitud al menos igual al diámetro del mismo. Se utilizó un microscopio Karl Zeiss con 40x aumentos, adicionándose un micrómetro ocular (15x) para medir la longitud del tubo polínico a 30 granos de polen escogidos al azar en cada preparación.

Con el objetivo de conocer a qué temperatura se produjeron las mayores diferencias entre la variedad Campbell-28 y Nagcarlán, se determinó la prueba t de Student para cada tratamiento de calor, previa transformación de los porcentajes a arcoseno % (Snedecor y Cockran, 1967).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los tratamientos de calor durante 90 minutos previos a la germinación (a), comenzaron a afectar el porcentaje de germinación del polen a partir de los 40°C (Figura 1), fundamentalmente en la variedad Campbell-28.

Es de destacar que no se detectaron diferencias en el porcentaje de germinación del polen de Nagcarlán y Campbell-28 en el control, lo cual era de esperarse, ya que estos se formaron y desarrollaron durante el invierno en que las condiciones climáticas fueron propicias; sin embargo, se observó una marcada diferenciación varietal cuando se les aplicó el tratamiento de 45°C, previo a la germinación, a partir del cual esta diferencia disminuyó, hasta que desapareció con el tratamiento de 60°C, que afectó a ambas variedades en magnitudes estadísticamente similares.

Es notable que a pesar de los bajos porcentajes de germinación obtenidos con el tratamiento de 60°C, se obtuvieron semillas viables cuando se polinizó con polen tratado a esa temperatura (Marta Alvarez, 1993; resultados no publicados). Resultados similares fueron obtenidos por Rao, Jain y Shivanna (1992), quienes aplicaron tratamientos más drásticos a polen de *Brassica* (60°C durante cuatro horas), los cuales afectaron la germinación del polen y la longitud del tubo polínico, aunque conservaron su capacidad para germinar sobre el estigma y producir frutos con semillas. El hecho de que determinados tratamientos afecten la germinación y la longitud del tubo polínico *in vitro* y no así su fertilidad *in vivo*, fue planteado por Janssen y Hermsen, 1976, citados por Fernández (1990), quienes argumentaron que la germinación *in vitro* es una medida cuantitativa que, en ocasiones, subestima la fertilidad real del polen, ya que no todos los granos capaces de germinar sobre el estigma, tendrían la facultad de hacerlo en el medio de cultivo *in vitro*, aunque esto no constituye de por sí un obstáculo para su utilización como indicador de la calidad del polen.

En cambio, los tratamientos de calor dados al polen no afectaron de igual forma la longitud del tubo polínico (Fig. 2), afectándose este carácter a partir de los 45°C y, en el resto de los tratamientos, las diferencias varietales se mantuvieron o disminuyeron, aunque debe tenerse en cuenta que la longitud del tubo polínico de estas variedades difirió en aproximadamente 100$\mu$m en el control.

Una de las recomendaciones de Zamir (1983), trabajando a bajas temperaturas, fue aplicar la presión de selección al polen durante la germinación y el desarrollo del tubo polínico, lo cual se corroboró con los resultados de este trabajo, en que se encontraron diferencias muy notables cuando el calor se aplicó durante el proceso de germinación *in vitro*, con el tratamiento de 35°C a partir de los 60 minutos (Figura 3), ocurriendo la mayor diferenciación a los 60 y 90 minutos, siendo

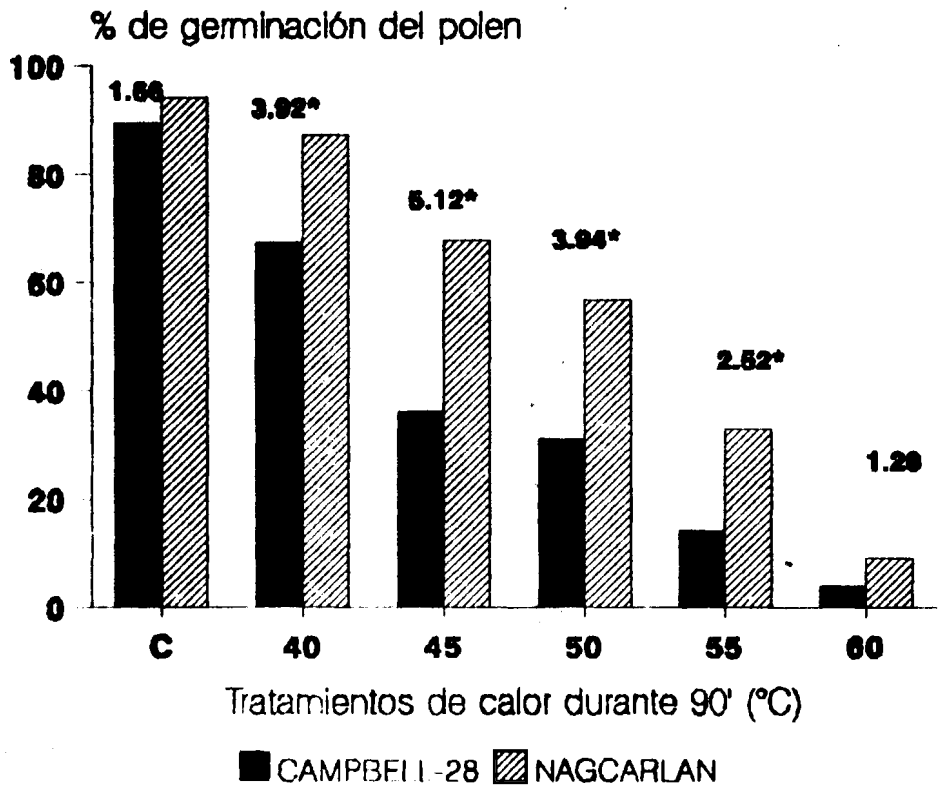


**Figura 1. Efecto de diferentes tratamientos de calor sobre el porcentaje de germinación del polen**

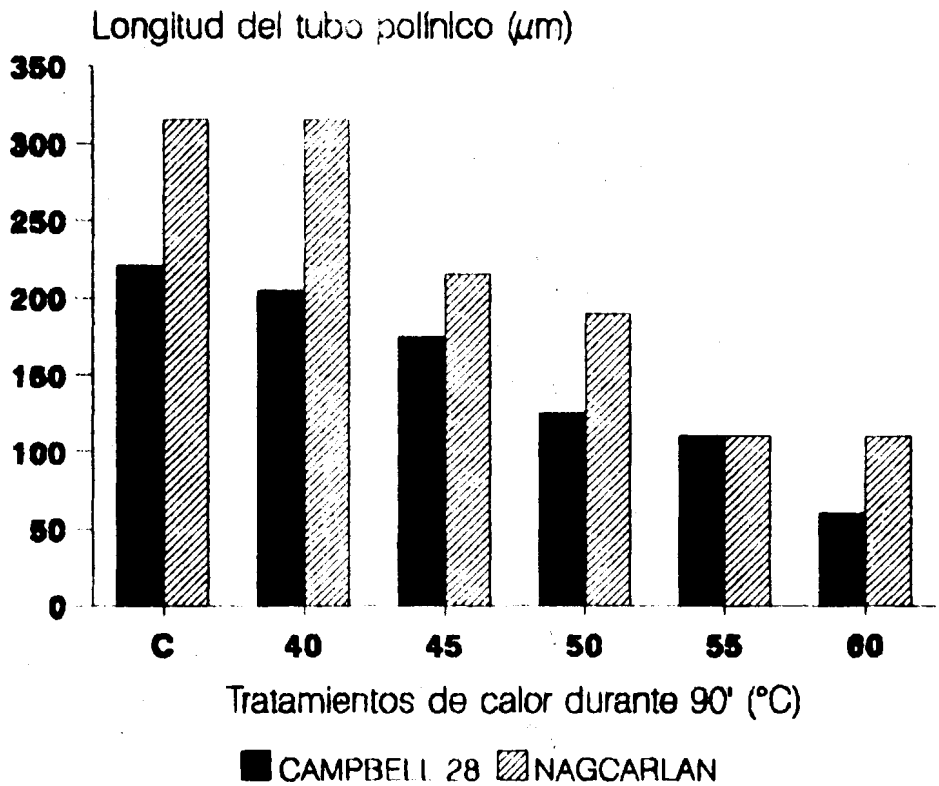


**Figura 2. Efecto de diferentes tratamientos de calor sobre la longitud del tubo polínico**

esta de una mayor magnitud que cuando el calor se aplicó previo a la germinación, por lo que esta fase parece ser más susceptible al estrés provocado por las altas temperaturas. De igual forma que con los tratamientos previos a la germinación (a), el calor aplicado durante la germinación afectó en mayor medida el porcentaje de germinación en la variedad Campbell-28 que en el tipo silvestre Nagcarlán.

En cuanto al crecimiento del tubo polínico, se observó primeramente un incremento en la longitud de este en ambas variedades, fundamentalmente en el tratamiento de 30 minutos, a partir del cual disminuyó gradualmente con el tiempo, aunque en menor magnitud que el porcentaje de germinación (Fig. 4).

En trabajos anteriores (Marta Alvarez *et al.*, 1993), se comprobó que el polen de Nagcarlán tuvo mayores germinación y crecimiento del tubo polínico que el de

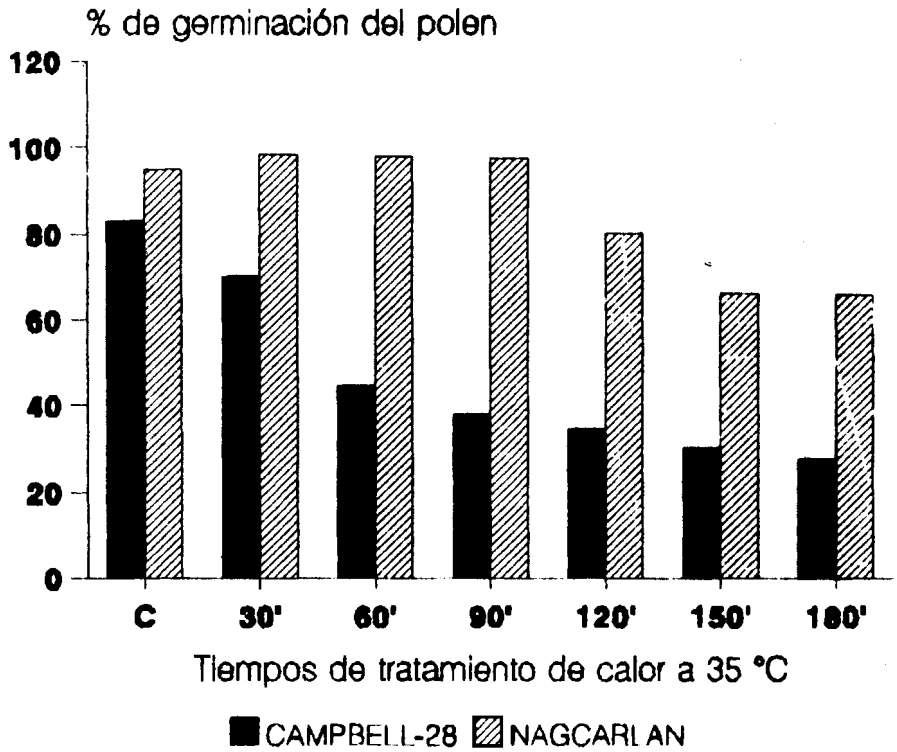


**Figura 3. Efecto de tratamientos de calor durante la germinación *in vitro* sobre el porcentaje de germinación del polen**

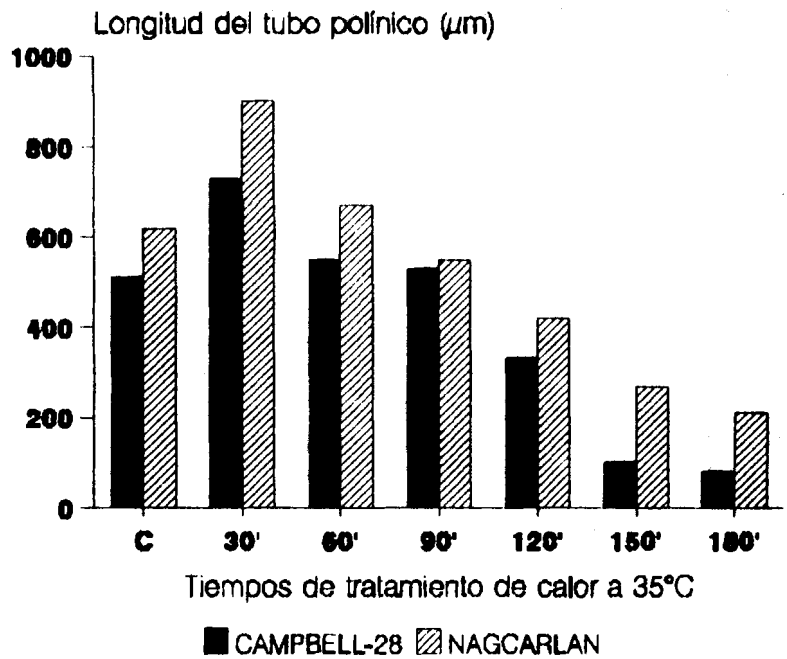


**Figura 4. Efecto de tratamientos de calor durante la germinación *in vitro* sobre la longitud del tubo polínico**

la variedad Campbell-28, cuando su formación y desarrollo tuvieron lugar en condiciones de altas temperaturas y humedad propias de los meses de verano; asimismo, con los resultados de este trabajo se ha probado que aunque estos se hayan desarrollado en condiciones favorables, con porcentajes de germinación similares *in vitro*, los tratamientos de calor aplicados en estadio de polen maduro (posmelótico) afectaron en mayor magnitud el polen de la variedad Campbell-28 que el del tipo silvestre Nagcarlán, lográndose con determinados tratamientos una alta diferenciación varietal, sobre todo durante el proceso de germinación.

Se puso de manifiesto, asimismo, que el porcentaje de germinación del polen fue más afectado por el calor que la longitud del tubo polínico. Con relación a esto, Du Bey (1981) y Chancy y Strickland (1984), citados por Walters y Martens (1987), consideraron el porcentaje de germinación del polen como una medida importante, para valorar el efecto de la toxicidad causada por agentes contaminantes y la longitud del tubo polínico como una medida adicional.

A partir de los resultados obtenidos, se está investigando el efecto de algunos de estos tratamientos previo a la polinización y su posterior repercusión en la progenie, lo cual permitirá conocer si es efectivo este tipo de tratamiento como forma de selección a nivel de polen, así como el establecimiento de métodos de screening de variedades por su tolerancia al calor, utilizando los tratamientos que ocasionan una mayor diferenciación varietal, lo cual reviste una gran importancia para el estudio del germoplasma y los trabajos de mejoramiento genético que se vienen desarrollando en nuestro país.

## BIBLIOGRAFIA


Alvarez, Marta. Estudio de la viabilidad del polen en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Cultivos Tropicales** (La Habana) 4(2): 241-248, 1982.

Alvarez, Marta *et al*. Herencia de la germinación del polen y la fructificación del tomate en condiciones tropicales. **Cultivos Tropicales**. (La Habana) 15(1): 56-59, 1994.

Bino, R. J. *et al*. Effects of *Alternaria alternata*f. sp. *Lycopersicon* Toxins on Pollen. **Theor. Appl. Genet.** (Nueva York) 76:204-208, 1988.

Cuba. Ministerio de la Agricultura. Instructivo técnico del cultivo del tomate, 1984.

Fernández, R. Fructificación a bajas temperaturas en *Lycopersicon esculentum* Mill. spp. / R. Fernández; J. Cuartero Zueco, tutor.- (Dr. en Ciencias Agrícolas); Universidad de Málaga, España, 1990.-228 p.

Hernández, A. *et al*. Segunda Clasificación Genética de los Suelos de Cuba. **Academia de Ciencias de Cuba. Suelos** (La Habana) 23:1-25, 1975.

Ottaviano, E. y D. L. Mulcahy. Genetics of Angiosperm Pollen. **Adv. Genet.** 26:1-64, 1989.

Rao, C. R. Advanced Statistical Methods in Biometrical Research / C. R. Rao.- New York: John Wiley and Sons, 1952.-390 p.

Rao, G. U., A. Jain y K. R. Shivanna. Effects of High Temperature Stress on *Brassica* pollen: Viability, Germination and Ability to Set Fruits and Seeds. **Annals of Botany** (Nueva York) 68:193-198, 1992.

Searcy, K. B. y D. L. Mulcahy. Comparison of The Response to Aluminum Toxicity in Gametophyte and Sporophyte of Four Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Cultivars. **Theor. Appl. Genet.** (Nueva York) 80:289-295, 1990.

Snedecor, G. W., W. G. Cochran. Statistical Methods. / G. W. Snedecor, W. G. Cochran.- 6ed.- Iowa: State University Press, 1967.

Tankeley, S. D., D. Zamir y C. M. Rick. Evidence For Extensive Overlap of Sporophytic and Gametophytic Gene Expression in *Lycopersicon esculentum* Mill. **Science** 213:453-455, 1981.

Weaver, M. L. y H. Timm. Screening Tomato for High Temperature Tolerance Through Pollen Viability Tests. **Hort Science** (Washington) 24(3):493-495, 1989.

Walters, J. H. B. y M. J. M. Martens. Effects of Air Pollutants on Pollen. **The botanical review** (Nueva York) 53(3):372-414, 1987.

Zamir, D. Pollen Gene Expression and Selection: Applications in Plant Breeding. / D. Zamir.- **En**: Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Amsterdam: Elsevier, 1983.- p313-330.

Zamir, D. e I. Yadish. Pollen Selection For Low Temperature adaptation in Tomato. **Theor. Appl. Genetics** (Nueva York) 74:545-548, 1987.



Recibido: 16 de julio de 1993
Aceptado: 15 de octubre de 1993



**Reducción de la NORMA de RIEGO en TOMATE**

En el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) se ha probado, en condiciones experimentales, que el cultivo del tomate es capaz de desarrollarse y producir satisfactoriamente, con sólo aplicarle el riego hasta los 15 o 20 días después de trasplantadas las posturas. Una vez que las plantas se establecen en el campo y se le suspende el riego, éstas logran adaptarse bien y alcanzar rendimientos buenos, manteniendo una buena calidad de la cosecha.

La aplicación correcta de este logro científico permite además, mejorar la calidad externa e interna de los frutos, disminuye la incidencia de plagas, enfermedades y de la vegetación espontánea; así como un considerable ahorro de agua, combustible y fuerza de trabajo que pueden ser utilizadas con otros fines en la agricultura.

Sin embargo, es oportuno señalar que para obtener resultados óptimos es necesario garantizar una buena preparación del suelo, posturas de alta calidad y sobre todo, desarrollar una correcta labor de trasplante.

INCA

*INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRICOLAS.*
Subdirección de Desarrollo Técnico. Gaveta Postal No. 1, Telef. 6-3773 y 6-3867.
Télex: 056115 INCA CU, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.