

La Calidad del Polen: Requisito Indispensable del Mejoramiento Tradicional de la Papa en Cuba

María Elena González¹, Ana Estévez¹, Juan Castillo², Jorge Salomórr², Olivia Moré² y Ma. Margarita Hernández¹

Resumen

En el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas se realizaron estudios de la calidad del polen en diferentes especies y variedades de papa, para lo cual se utilizaron los métodos de tinción, y germinación *in vitro* e *in vivo* con polen fresco (primer día de colectado) y almacenado a 17°C y 4°C. Además se estimaron los porcentajes de viabilidad y germinación, y las ploidías a partir de las mediciones del diámetro del polen. Con polen del primer día de conservado a 4°C (por 10 y 20 días) se realizaron ocho combinaciones híbridas y se evaluaron el número de bayas, el porcentaje de fructificación y el número de semillas por fruto. Se comprobó que la tinción morfológica no es una técnica confiable para estimar la viabilidad polínica y que la germinación del polen *in vitro* e *in vivo* son métodos efectivos para la estimación de la calidad del polen, los cuales están correlacionados con el número de semillas por fruto. Se puso de manifiesto que la medición del diámetro del polen es un indicador de la ploidía en papa y constituye un método indirecto que permite la identificación de materiales diploides y tetraploides. Esos resultados brindaron la posibilidad de utilizar métodos rápidos, sencillos y confiables que hacen de estos indicadores herramientas útiles en los Programas de Mejoramiento.

Palabras claves adicionales: Viabilidad del polen, germinación del polen, ploidía

¹ Ph.D., Departamento de Genética y Mejoramiento, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Gaveta Postal No.1, C.P. 32700, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

² M.Sc., Departamento de Genética y Mejoramiento, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Gaveta Postal No.1, C.P. 32700, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

Pollen Quality: An Essential Requirement for the Traditional Potato Breeding in Cuba

Summary

Pollen quality studies of different potato species and varieties were carried out at the National Institute of Agriculture Sciences using stain, *in vivo* and *in vitro* germination methods with fresh pollen (first day of collection) stored at 17 and 4°C. The percentages of viability and germination were estimated, also ploidy levels were determined by pollen diameter. With the first-day-pollen stored at 4°C (for 10 and 20 days), eight hybrid combinations were made and the number of berries, fruiting percentage and seed number per fruit were evaluated. It was confirmed that morphological stain with acetocarmin is not a trusty technique to estimate pollen viability and that *in vitro* and *in vivo* pollen germination methods were adequate to estimate pollen quality, which are correlated with seed number per fruit. Pollen diameter is an indicator of potato ploidy level and this technique is an indirect method to identify diploid and tetraploid genotypes. The results enable the use of quick, simple and reliable methods to make these indicators useful tools for breeding programs.

Additional Index words: Pollen viability, pollen germination, ploidy

Introducción

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, pues permiten asegurar el éxito de las hibridaciones e incrementar la eficiencia del Mejoramiento.

Las condiciones ambientales adversas pueden causar la no funcionalidad polínica (14, 31) lo que está en dependencia del genotipo. Las altas temperaturas inhiben la floración, la producción de polen y su viabilidad, limitando la producción de semilla botánica. También es bloqueada la diferenciación, y el crecimiento del esporofito es reducido (5,1, 33).

Las variedades de la subsp. *tuberosum* usualmente no florecen bajo las condiciones existentes en Cuba. Además, algunas variedades, raramente

florece y, si lo hacen es por un período muy corto y la viabilidad del polen es baja. El estrés de calor y de humedad provocan una disminución de la cantidad y calidad del polen (33), lo que puede ser ocasionado por una menor cantidad de nutrientes presentes en la antera y la degeneración temprana del tapete, así como una reducción importante en el número de granos formados como consecuencia del elevado porcentaje de aborto de células madre de polen y de microsporas en diferentes etapas de su formación (9).

Dada la necesidad de incrementar la eficiencia de las hibridaciones en el Programa de Mejoramiento, el trabajo tuvo como objetivo el estudio de la calidad del polen en diferentes especies y variedades de papa.

Materiales y Métodos

Los experimentos se realizaron en el área central del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), San José de las Lajas, a 23°00' de latitud norte, 32°12' de longitud oeste y 130 metros snm, en la provincia de La Habana.

La colecta de flores de las variedades y especies se realizó en horas tempranas de la mañana en el momento de la antesis. Las flores se dejaron secar a temperatura ambiente posteriormente se procedió a la extracción del polen con ayuda de un vibrador eléctrico.

Los métodos que se utilizaron para estimar la calidad del polen fueron: tinción morfológica, germinación *in vitro* del polen y germinación *in vivo* del polen.

Tinción morfológica o viabilidad del polen

Se utilizó como colorante el acetocarmín al 1%. Los granos de polen redondeados y coloreados de rojo se consideraron viables y no viables los constreñidos y sin teñir (30). Se realizó una clasificación visual de los granos de polen basada en la forma y contenido, utilizándose para las tinciones acetocarmín y lactofenol.

Las observaciones se realizaron con un microscopio Karl Zeiss a 200x. Los conteos de polen se efectuaron en número de 200 granos por preparación en un total de cinco preparaciones. Se utilizó polen fresco (primer día de colectado) y almacenado por 150 días a 17°C y 4°C y se estimaron los porcentajes de viabilidad del polen fresco y almacenado, y se realizaron mediciones del diámetro del polen (μm) de algunas especies silvestres y cultivadas de papa.

Germinación *in vitro*

Se utilizó el medio de germinación compuesto por: sacarosa 12%, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 300 ppm, MgSO_4 200 ppm, KNO_3 100 ppm, ácido bórico 100 ppm, en solución acuosa pH=6. Solo se consideraron viables aquellos granos con un tubo de longitud mayor o igual al diámetro del polen. Los conteos se realizaron con polen recién colectado (primer día), polen conservado a 17°C (quinto y décimo días de almacenamiento) y conservado a 4°C al décimo y vigésimo días. Las observaciones al microscopio y los conteos fueron similares a lo descrito para la tinción morfológica.

Con el polen recién colectado (primer día) y conservado a 4°C (por 10 y 20 días) de las variedades Omega, Cardinal, Desirée y Baraka, se realizaron ocho combinaciones híbridas, polinizándose 30 flores de similares características. Se evaluó el número de bayas logradas, el porcentaje de fructificación y el número de semillas por fruto.

Germinación *in vivo*

Se emascularon y polinizaron 40 flores con características similares, de las ocho combinaciones híbridas que aparecen en la Tabla 1; se cortaron los estilos a las 36 horas y se dejó el ovario para que se desarrollara el fruto.

Los estilos se fijaron en una solución de ácido acético glacial (100%) y alcohol (96%) en una proporción de 1:3 y se almacenaron en condiciones refrigeradas (4°C) durante 48 horas. Tras la fijación, los estilos se lavaron con agua destilada y se sumergieron en NaOH 8N durante seis horas. La tinción de los tubos polínicos se llevó a cabo con una solución al 0.1% de azul de anilina hidrosoluble en 0.1M de K_3PO_4 . Las observaciones se realizaron en un microscopio Karl Zeiss de fluorescencia con luz de excitación ultravioleta, con un objetivo tipo Jena, observándose a 100x.

En cinco estilos por cada cruzamiento se evaluaron: el porcentaje de germinación del polen en el estigma, el número de tubos polínicos que alcanzaron la base del estilo y el número de semillas por fruto.

Análisis estadístico

Para realizar los análisis de variancia, los porcentajes de viabilidad y germinación del polen *in vitro* e *in vivo* de las variedades fueron transformadas a arcoseno $\sqrt{\%}$ y los caracteres numéricos a \sqrt{x}

Los datos de los porcentajes de viabilidad y germinación *in vitro* del polen se procesaron a partir de un análisis de variancia de efecto fijo bajo un diseño completamente aleatorizado en arreglo factorial (7x2x2) y (7x2) respectivamente, donde los factores fueron variedades, días de

almacenamiento y temperatura de conservación para el primero y variedades y días de almacenamiento para el segundo. Con los caracteres evaluados por el método de germinación *in vivo* se realizaron análisis de variancia bajo un diseño completamente aleatorizado. Las medias fueron comparadas según la prueba de rangos múltiples de Duncan para $p < 0.05$. Para comparar la eficiencia de los métodos de germinación del polen, se hallaron las correlaciones lineales entre la germinación del polen *in vitro* y el número de frutos y semillas por fruto, y entre la germinación del polen *in vivo* y el número de tubos en la base del estilo y el número de semillas por fruto.

Resultados y Discusión

Tinciones morfológicas o viabilidad del polen

En la Tabla 1 se aprecian los porcentajes de tinción del polen de algunas especies silvestres y cultivadas de papa. Estas especies en su mayoría presentaron valores de tinción superiores al 90%, solamente las especies *Solanum hougassi*, *Solanum guerreroense* Corr., *Solanum brevicaule* Bitt, *Solanum knappei* Yuz et Buk., *Solanum schickii* Yuz et Buk, *Solanum subtilius*, *Solanum ochoanum* Lechn y *Solanum garciae* Yuz et Buk obtuvieron menores porcentajes. Pandey y Gupta (26) señalaron que la fertilidad del polen es muy superior cuando proviene de la subsp. *andigena* que cuando proviene de la subsp. *tuberosum*.

Tabla 1. Porcentajes de tinción del polen de especies de papa.

Especies	% tinción	Especies	% tinción
<i>S. cardiophyllum</i> Lindl.	99	<i>S. vallis-mexici</i> Yuz.	96
<i>S. demissum</i> Lindl.	99	<i>S. lechnoviczii</i> Hawk.	96
<i>S. arrac-papa</i> Yuz.	99	<i>S. sparsipilum</i> (Bitt) Yuz et Buk.	96
<i>S. leptophyes</i> Bitt.	99	<i>S. simplicifolium</i> Bitt.	96
<i>S. tarigense</i> Hawk.	99	<i>S. chacoense</i> Bitt. PI 275136	96
<i>S. chacoense</i> Bitt Oka.	99	<i>S. chacoense</i> Bitt. PI 275141	96
<i>S. bulbocastanum</i> Dun.	98	<i>S. phureja</i> Yuz y Buk.	96
<i>S. polytrichon</i> Rydb.	98	<i>S. chacoense</i> Bitt. PI 217451	94
<i>S. acaule</i> Bitt.	98	<i>S. laplaticum</i> Buk.	93
<i>S. parodii</i> Yuz y Buk.	98	Runa Redonda	92
<i>S. saltemse</i> Hawk.	98	<i>S. commersonii</i> Dun.	91
<i>S. brachicarpum</i> Cor.	97	<i>S. subtilius</i>	89
<i>S. ajuscoense</i> Buk.	97	<i>S. ochoanum</i> Lechn.	85
<i>S. brachistotrichum</i> (Bitt) Rydb.	97	<i>S. brevicaule</i> Bitt.	82
<i>S. multidissectum</i> Hawk.	97	<i>S. guerreroense</i> Cor.r	77
<i>S. spegazzini</i> Bitt.	97	<i>S. schickii</i> Yuz y Buk.	77
<i>S. macolae</i> Buk.	97	<i>S. knappei</i> Yuz y Buk.	72
<i>S. chacoense</i> Bitt.	97	<i>S. hougassii</i>	71
<i>S. semidemissum</i> Yus.	96	<i>S. garciae</i> Yuz y Buk	68
<i>S. fendleri</i> Gray.	96	<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i>	

Tabla 2. Porcentaje de tinción del polen de variedades de papa

Variedades	% Viabilidad
Larga	47
Cascade	54
Desirée	51
Spunta	40
Atlantic	15
Monona	72
Crystal	34
F-72090	65
Maradonna	45
Redsen	87
Romano	69
Delcora	59
Phyne Red	31
Lutetia	23
Rosa	21
Lady Rosetta	91
Bienmond 79-157	75

El porcentaje de tinción de polen de las variedades presenta en la Tabla 2, destacándose las variedades Lady Rosseta y Redsen con 91 y 87% respectivamente. Las variedades Larga, Spunta, Atlantic, Crystal, Maradonna, Phyne Red, Lutetia y Rosa presentaron porcentajes de tinción inferiores al 50%, siendo la variedad Atlantic la que alcanzó el menor valor (15%).

Es de resaltar que la variedad Spunta presentó anteras pálidas, lo cual a veces coincide con la esterilidad masculina. Las plantas con citoplasma de *tuberosum* con frecuencia muestran baja fertilidad del polen debido a la esterilidad masculina genético-citoplasmática (11).

Los estadígrafos de variedades y especies estudiadas (Tabla 3) evidenciaron una media del 93%, para las especies y de 51% para las variedades, con rango que osciló entre 71 y 99% y 15 y 91% respectivamente; así como, una mayor variabilidad entre variedades con un coeficiente de variación de 41.8%. Estévez (10) en estudios de viabilidad del polen en 5 variedades de papa, encontró que los valores oscilaban entre 30 y 80%.

Tabla 3. Estadígrafos de variedades y especies de papa.

Genotipos	Media	Desviación estándar (%)	Coefficiente de variación (%)	Rango
Especies	93	8.6	9.2	71-99
Variedades	51	21.3	41.8	15-91

Para el polen conservado que normalmente mantiene su capacidad de hidratación y su morfología normal aunque va perdiendo su potencialidad para germinar en el tiempo, se ha probado que las tinciones morfológicas no son una buena técnica de medida de la fertilidad real (29, 24, 31).

En la Tabla 4 se observa que el porcentaje de tinción del polen, de nueve especies de papa a los 150 días de conservación, se mantuvo superior al

95%. Si se comparan estos valores con los obtenidos al primer día de colectado el polen (Tabla 1), se aprecia que casi no hubo variación. En investigaciones realizadas en cinco variedades de papa, se pudo apreciar un comportamiento diferencial con valores más bajos para el porcentaje de viabilidad, que disminuyó con el tiempo de forma más marcada, lo cual puede deberse a que son diferentes genotipos y otras condiciones de almacenamiento del polen.

Tabla 4. Porcentajes de tinción del polen de nueve especies de papa a los 150 días de almacenamiento a 17°C.

Especies	% Tinción
<i>S. brachistotrichum</i> (Bill) Rvdb.	96
<i>S. vallis mexici</i> Yuz.	96
<i>S. ajuscoense</i> Buk.	97
<i>S. flenderi</i> Grav.	97
<i>S. multidissectum</i> Hawk.	96
<i>S. brachycarpum</i> Corr.	97
<i>S. simplicifolium</i> Bitt.	95
<i>S. chacoense</i> Bitt.	98
<i>S. phureja</i> Jus y Buk.	96

En la Tabla 5 se muestra, la apreciación visual de los granos de polen viables para el método de tinción morfológica con acetocarmín y lactofenol-carmín. Con carmín son teñidos de rojo, los granos redondos vivos, redondos con citoplasma muerto y redondos con degeneración del citoplasma. Con lactofenol-carmín son teñidos de rojo brillante, los granos vivos y redondos con citoplasma muerto.

Tabla 5. Apreciación visual de los granos de polen viables para dos tinciones. Clasificación basada en la forma y el contenido de los granos de polen.

Tinciones	Características fenotípicas del grano de polen		
	Redondos con citoplasma Vivo	Redondos con citoplasma muerto	Redondos con degeneración del citoplasma
Carmín	+	+	+
Lactofenol	+	+	-

El carmín y el lactofenol tiñeron citoplasma vivo y muerto, donde se realiza una sobre estimación de la fertilidad del polen. Esto se evidencia en la Tabla 6, donde se observan valores muy similares para los dos métodos, aunque

hay que resaltar que el lactofenol no coloreó los granos de polen con degeneración del citoplasma, sin embargo, estos granos se presentaron en muy baja frecuencia es por ello que no aportaron mucho al porcentaje total. Janssen y Hermsen (21) encontraron porcentajes de viabilidad del polen para *S. phureja* superiores al 80% y valores menores de 40% en *S. tuberosum*, logrando los mismos resultados de viabilidad utilizando acetocarmín y fucsina.

Estos métodos son muy fáciles y rápidos pero dan solamente una indicación de la fertilidad masculina.

Los análisis de proporciones realizados para cada variedad, tinciones y días de almacenamiento se presentan en la Tabla 6, donde no se encontraron diferencias significativas entre colorantes y sus valores fueron muy parecidos. Las variedades Marinea y Kondor presentaron los mayores porcentajes de viabilidad del polen, mientras que la variedad Atlantic alcanzó muy bajos valores, lo que la limita como progenitor masculino. La esterilidad masculina es más común que la femenina en los cultivares de *S. tuberosum* (11).

Tabla 6. Porcentaje de tinción de polen fresco y almacenado por diferentes días a 4°C.

Variedades	Días	Tinciones	
		Carmín	Lactofenol-carmín
Marinea	1	78	77
	5	82	81
	10	86	84
Kondor	1	78	75
	5	83	80
	10	80	78
Aninca	1	55	54
	5	56	55
	10	59	57
Desirée	1	49	50
	5	52	50
	10	50	51
Atlantic	1	10	10
	5	12	9
	10	9	8

En polen fresco las tinciones tampoco expresan con exactitud la capacidad germinativa ya que estas técnicas se basan en la determinación de variabilidad mas no germinabilidad; proceso un tanto alejado de la

germinación, y aún más de la fertilización, sobrestimando la viabilidad polínica real (32, 18, 23), ya que una parte de los granos no abortados pueden haber perdido la facultad de germinar sin que ello se traduzca en malformaciones morfológicas (30, 22).

Los resultados del análisis de variancia para el porcentaje de viabilidad del polen evidenciaron la inexistencia de interacción entre variedades, temperatura de conservación y días de almacenamiento. Los resultados de la prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$) mostraron la existencia de diferencias significativas entre las variedades con valores que oscilaron entre 34.7 y 53.7%, destacándose la Omega y la Cardinal con los porcentajes más elevados y diferencias significativas entre ellas y el resto de las variedades (Tabla 7)

Tabla 7. Porcentajes de Tinción del polen de variedades utilizadas como progenitores

Variedades	Medias
Omega	53.7a (64.9)
Cardinal	50.9 b (60.2)
Baraka	49.2 c (57.3)
Desirée	46.8 d (53.3)
Lizen	39.3 e (40.2)
Marlene	36.6 f (35.5)
Spunta	34.7 g (32.5)
$\bar{x} \pm Es$	44.5 \pm 0.3***

() valor original *** significativo para $p < 0.001$

Medias con letras en común no presentan diferencias significativas según prueba de Duncan $p < 0.05$

El polen conservado mantuvo su morfología normal a través del tiempo y fue capaz de colorearse, no apreciándose variación para las dos temperaturas de conservación y días de almacenamiento; sin embargo, el polen va perdiendo su potencial para germinar con el tiempo (31). Estos resultados coinciden con lo encontrado por otros autores (19, 25), donde se menciona porcentajes de tinción similares para polen fresco y almacenado.

El acetocarmín sobrestima la viabilidad del polen, pero da información adicional de la morfología nuclear (32). Este método se puede utilizar para la discriminación cuando se tienen muchos genotipos, pues tiene la ventaja de permitir hacer predicciones rápidas de la fertilidad masculina.

Las tinciones sólo permiten detectar diferencias entre granos de polen abortados y no abortados y su utilidad es fundamentalmente en los estudios de androesterilidad (31,15), para conocer el diámetro del polen (4, 7, 26,17, 8) y para conocer la dotación cromosómica (21).

En la Tabla 8 se aprecian las mediciones del diámetro del polen de especies utilizadas como progenitores así como los niveles de ploidía informados y estimados. Las especies diploides $2n=2x=24$, presentaron medias muy similares, que oscilaron entre 21.10 y 22.84 μ m respectivamente. Sin embargo, la especie tetraploide presentó un valor de 25.51 μ m. Brown et al. (7) plantearon un diámetro de 20 μ m para polen "n" y 26 μ m para "2n".

Tabla 8. Mediciones del diámetro del polen y niveles de ploidía de algunas especies silvestres y cultivadas de papa.

Especies	Diámetro del polen (μm) $\bar{x} \pm E s$	Ploidía	
		Informada	Estimada
<i>S. leptophyes</i> BIT.	21.10 \pm 0.23	2x	2x
<i>S. tarijense</i> Hawkes	22.37 \pm 0.16	2x	2x
<i>S. verrucosum</i> Schlechtd	22.20 + 0.20	2x	2x
<i>S. commersonii</i> Dun.	22.70 + 0.19	2x	2x
<i>S. chacoense</i> Bitt.	22.12 + 0.18	2x	2x
<i>S. multidisectum</i> Hawkes	20.57 + 0.14	2x	2x
<i>S. politychon</i> Rydb..	25.51 \pm 0.17	4x	4x
<i>S. stenotomum</i> Jus. y Buk	22.84 \pm 0.23	2x	2x
<i>S. phureja</i> Jus. y Buk.	22.72 + 0.19	2x	2x

De acuerdo con los resultados encontrados se pudo determinar que existió coincidencia total entre los niveles de ploidía informados y observados, pudiéndose determinar el nivel de ploidía de las especies silvestres diploides ($2n=2x=24$) y tetraploides ($4n=4x=48$) según el diámetro del polen, lo que corrobora la efectividad del método de medición del diámetro del polen para la estimación del nivel de ploidía.

Los resultados obtenidos al analizar el diámetro del polen estimado de un tetraploide a partir de la relación $\sqrt[3]{n \cdot dx}$ difiere de lo observado en $0.18\mu\text{m}$ con una coincidencia de 99.5% y una correlación de 0.98 (Tabla 9), lo que confirma para este caso que el método es válido. Esta relación entre ploidía y diámetro del polen de papa coincide con lo señalado por Brown et al (7). Por otra parte, Bamberg y Hanneman (3) afirmaron que este método es válido para distinguir diploides de tetraploides, sin tener en cuenta sus antecedentes taxonómicos.

Tabla 9. Resultados obtenidos al analizar el diámetro del polen (μm)

Ploidía del donante	2x	4x
Ploidía del polen	1x	2x
Diámetro observado	22.23	26.49
Diámetro estimado	-	26.67
Diferencia	-	0.18
% de coincidencia	-	99.50
Coeficiente de correlación	-	0.98

Germinación *in vitro*

En la Tabla 10 se muestra el porcentaje de germinación de especies de papa en diferentes días de almacenamiento, el cual disminuyó a medida que transcurrió el tiempo, no existiendo a los diez días ningún polen germinado. Se observó un comportamiento muy similar entre las especies silvestres, solamente la especie cultivada, *S. phureja*, fue la que presentó un comportamiento diferencial, perdiendo rápidamente su potencialidad para germinar.

Los resultados encontrados evidencian que no se debe almacenar el polen a 17°C por más de cinco días.

Tabla 10. Porcentajes de germinación del polen de nueve especies de papa en diferentes días de almacenamiento a 17°C

Especies	% germinación		
	Días		
	1	5	10
<i>S. brachistotrichum</i> (Bill) Rvdb.	75	28	0
<i>S. vallis mexici</i> Yuz.	74	26	0
<i>S. ajuscoense</i> Buk.	72	25	0
<i>S. flenderi</i> Grav.	75	26	0
<i>S. multidissectum</i> Hawk.	79	19	0
<i>S. brachycarpum</i> Corr.	77	20	0
<i>S. simplicifolium</i> Bitt.	80	22	0
<i>S. chacoense</i> Bitt.	76	26	0
<i>S. phureja</i> Jus. y Buk.	73	5	0

El análisis de variancia para los porcentajes de germinación del polen en dos temperaturas de conservación (17°C y 4°C) puso de manifiesto la existencia de interacción entre las variedades y los días de almacenamiento del polen.

En las Tablas 11 y 12 se muestran las medias después de efectuada la prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05$). El polen de las variedades Omega, Cardinal, Baraka y Desirée al primer día, presentaron los porcentajes más elevados de germinación *in vitro*, con valores de 33.6, 32.7, 32 y 30.1% respectivamente. Para las dos temperaturas de conservación, existió una disminución de forma significativa a través del tiempo, pero de forma más marcada para el polen conservado a mayor temperatura. Cuando se conservó a 17°C, a los 10 días no se registró ningún grano de polen germinado, lo que coincide con estudios de conservación del polen a 17°C en especies silvestres y cultivadas de papa (19); sin embargo, a 4°C, todavía hubo porcentajes de germinación superiores al 18%.

Al comparar estos resultados con los obtenidos por las técnicas de tinción (Tabla 7), se aprecia una marcada disminución en los valores, lo que evidencia que este método es más confiable para estimar la viabilidad del polen. En papa ha sido recomendado por Bamberg y Kearns (2, 22) los que plantearon que es el método más directo y que aporta resultados más precisos, correspondiéndose en gran medida con los éxitos en los cruzamientos.

Estos resultados evidencian un incremento en valor cuando se disminuye la temperatura, lo que coincide con reportes anteriores que plantean una mayor germinación del polen con la disminución de la temperatura (16).

Tabla 11. Porcentajes de germinación in vitro del polen fresco y almacenado por diferentes días a 17°C.

	Días	Conservación a 17°C	
Omega	1	33 a	(30.70)
	5	9.1 f	(2.50)
	10	0 i	(0)
Cardinal	1	32.7 ab	(29.20)
	5	8.9 f	(2.40)
	10	0 i	(0)
Baraka	1	32.0 b	(28.10)
	5	8.7 f	(2.40)
	10	0 i	(0)
Desirée	1	30.1 c	(25.20)
	5	5.6 h	(0.96)
	10	0 i	(0)
Lizen	1	29.1 c	(23.70)
	5	6.7 g	(1.40)
	10	0 i	(0)
Marlene	1	27.8 d	(21.80)
	5	5.6 gh	(0.96)
	10	0 i	(0)
Spunta	1	25.6 e	(18.70)
	5	5.3 h	(0.86)
	10	0 i	(0)
x ± Es		12.42 ±	0.4 ***

(i) Valor original *** Significativo para $p < 0.001$

Medias con letras en común no presentan diferencias significativas según prueba de Duncan para $p < 0.05$

El resultado de los cruzamientos con polen de diferentes días de almacenamiento a 4°C se aprecia en la Tabla 13. Cuando se utilizaron como progenitores masculinos las variedades Baraka, Omega y Cardinal, se logró la mayor cantidad de frutos, así como los mejores porcentajes de fructificación, destacándose la combinación Desirée x Baraka con 33.3 %.

En cambio, con polen del primer día de colectado, se alcanzaron los menores valores (20 %) en la combinación Marlene x Desirée.

Resultados similares señalan que el polen de papa mantiene una buena viabilidad de dos a tres semanas, si es conservado en ambiente seco y temperatura próxima a los 5°C (11).

Tabla 12. Porcentajes de germinación in vitro del polen fresco y almacenado por diferentes días a 4°C.

Variedades	Días	Conservación a 4°C
Omega	1	33.6 a (30.70)
	10	24.2 ef (16.70)
	20	3.1 i (0.3)
Cardinal	1	32.7 a (29.20)
	10	22.9 f (15.20)
	20	3.6 i (0.40)
Baraka	1	32.0 b (28.10)
	10	24.0 ef (16.60)
	20	1.6 i (0.80)
Desirée	1	30.1 b (25.20)
	10	20.6 gh (12.40)
	20	1.6 ijk (0.80)
Lizen	1	29.1 c (23.70)
	10	22.2 fg (14.30)
	20	1.1 jk (0.40)
Marlene	1	27.8 d (21.80)
	10	19.4 h (11.00)
	20	0.8 k (0.02)
Spunta	1	25.6 e (18.70)
	10	18.3 h (9.90)
	20	0 k (0)
x + Es		17.82 + 0.7***

() Valor original *** Significativo para p<0.001.

Medias con letras en común no presentan diferencias significativas según prueba de Duncan para p<0.05

En los trópicos húmedos la producción de semilla botánica es afectada seriamente, con una disminución del número de bayas, la producción de polen y su fertilidad (1).

El mayor número de semillas por fruto se encontró en la combinación Desirée x Omega (35), seguido de Desirée x Cardinal (33) y Desirée x

Baraka (28), lo que se corresponde con los resultados encontrados anteriormente para la germinación del polen (Tabla 13). Las combinaciones híbridas donde Desirée fue el progenitor masculino presentaron valores muy similares, oscilando entre 22 y 24 semillas por fruto. Se pudo apreciar que a medida que aumentaron los días de almacenamiento fueron disminuyendo los valores de las variables estudiadas, por lo que no es recomendable utilizar el polen conservado a 4°C por más de 10 días para realizar las polinizaciones.

En la Tabla 14 se observan los valores de los coeficientes de correlación entre la germinación del polen *in vitro* de las variedades utilizadas como progenitores masculinos y el número de bayas y semillas por fruto. Un normal desarrollo de las bayas es debido a polinizaciones con polen compatible, que permite una abundante formación de semillas (6).

Se encontraron correlaciones positivas y altamente significativas entre las variables, alcanzándose una correlación de 0.80 ** entre la germinación del polen *in vitro* y el número de semillas por fruto. Resultados similares se encontraron señalando que este método da resultados confiables para planificar los cruzamientos, así como que la germinación del polen *in vitro* está significativamente correlacionada con el número de frutos y semillas por fruto, brindando un estimado confiable de la fertilidad masculina (12, 20, 22).

Los resultados encontrados pueden ser de utilidad para los mejoradores, pues es necesario conocer la viabilidad del polen, para determinar el tipo a emplear como progenitores masculino y femenino en los programas de mejoramiento tradicional de cultivo.

Germinación *in vivo*

En estudios realizados sobre el comportamiento del crecimiento de los tubos polínicos a través del pistilo en las ocho combinaciones híbridas intraespecíficas, se pudo determinar que después de las 24 horas de polinizadas las flores, los tubos polínicos sobrepasaron la base del estilo y penetraron al ovario; esto permitió la utilización de los estilos para estimar la germinación del polen sin afectar el ovario, el cual puede continuar desarrollándose y formar el fruto.

La Tabla 15 muestra los porcentajes de germinación *in vivo* del polen en el estigma, el número de tubos polínicos en la base del estilo y el número de semillas por fruto de las combinaciones híbridas estudiadas. El mayor porcentaje de germinación lo presentó la variedad Omega con 41.7, que no difirió significativamente de la Cardinal (36.5) pero sí del resto de las variedades, que a su vez no difirieron entre sí.

Teniendo en consideración los porcentajes alcanzados anteriormente por el método de germinación del polen *in vitro* (Tabla 10 y 11), se apreció un

incremento para las variedades Omega y Cardinal; sin embargo, disminuyó en las variedades Baraka y Desirée con excepción de la combinación Marlene x Desirée, lo que pudiera deberse a las condiciones ambientales.

La determinación de la germinación del polen *in vivo* posibilita hacer estimaciones confiables de la fertilidad, además de utilizarse para el estudio de incompatibilidades en los cruzamientos (13, 34).

Tabla 13 Resultados de las combinaciones híbridas con polen conservado a 4°C en diferentes días de almacenamiento

Combinaciones híbridas	Días	Número de polinizaciones	Número de frutos	Porcentaje de fructificación	Número de semillas por fruto
Desirée	1	30	9	30.0	35
X	10	30	7	23.3	20
Omega	20	30	1	3.3	5
Desirée	1	30	9	30.0	33
X	10	30	6	20.0	22
Cardinal	20	30	1	3.3	7
Cardinal	1	30	8	26.7	24
X	10	30	6	20.0	14
Desirée	20	30	0	-	-
Baraka	1	30	7	23.3	22
X	10	30	6	20.0	16
Desirée	20	30	0	-	-
Desirée	1	30	10	33.3	28
X	10	30	9	30.0	18
Baraka	20	30	0	-	-
Spunta	1	30	10	33.3	22
X	10	30	8	26.7	15
Desirée	20	30	0	-	-
Lizen	1	30	7	23.3	23
X	10	30	5	16.7	11
Desirée	20	30	0	-	-
Marlene	1	30	6	20.0	22
X	10	30	5	16.7	10
Desirée	20	30	0	-	-
	1	240	64	26.2	26.7
Total	10	240	54	22.5	16.1
	20	240	2	0.8	6

Tabla 14. Correlaciones lineales entre la germinación del polen *in vitro*, el número de frutos y el número de semillas por fruto.

Caracteres	Germinación del polen <i>in vitro</i>	Número de frutos
Número de semillas por fruto	0.80**	0.73**
Número de frutos	0.78**	

** Significativo para $p < 0.01$

Con respecto al número de tubos polínicos en la base del estilo, se pudo apreciar que las combinaciones Desirée x Omega, Desirée x Cardinal y Desirée x Baraka presentaron los mayores valores, con 4, 3.4 y 3.2 respectivamente, los que no difirieron significativamente entre sí. Los cruzamientos donde se utilizó a Desirée como progenitor masculino presentaron los menores valores, sin diferencias significativas entre ellos. Es de resaltar que el cruce Marlene x Desirée a pesar de tener un valor de 31.1 de porcentaje de germinación, alcanzó el menor número de tubos polínicos en la base (2.1), lo que pudiera deberse a problemas en la compatibilidad de los alelos S entre estos progenitores (34, 28).

El número de semillas por fruto presentó un comportamiento similar al número de tubos en la base del estilo, oscilando entre 4.4 y 6.5. Presentó el valor más alto el cruce Desirée x Omega, seguido por Desirée x Baraka y Desirée x Cardinal. Se logra una abundante formación de semillas cuando existe compatibilidad polen-pistilo (6).

Tabla 15. Porcentaje de germinación in vivo del polen en el estigma, número de tubos polínicos en la base del estilo y número de semillas por fruto.

Combinaciones híbridas	Germinación del polen in vivo	Número de tubos polínicos	Número de semillas por fruto
Desirée x Omega	41.7a (44.2)	4.0a (16.0)	6.5 a (42.2)
Desirée x Cardinal	36.5 ab (35.4)	3.4 ab (11.8)	5.7 abc (32.6)
Marlene x Desirée	31.1 bc (27.0)	2.1 d (4.8)	4.4 c (20.2)
Spunta x Desirée	29.2 bc (25.0)	2.4 cd (6.2)	4.8 bc (24.4)
Desirée x Baraka	28.1 bc (22.2)	3.2 abc (10.6)	6.0 ab (37.0)
Lizen x Desirée	27.9 bc (23.0)	2.4 cd (6.2)	4.7 c (22.8)
Cardinal x Desirée	26.7 c (20.6)	2.7 bcd (7.8)	4.8 bc (23.6)
Baraka x Desirée	25.5 c (19.2)	2.2d (5.4)	4.5 c (20.8)
x + Es	30.8 ± 2.7**	2.8 + 0.3***	5.2 +0.4**

() valor original **significativo para p<0.01 ***significativo para p<0.001

Medias con letras en común en la misma columna no presentan diferencias significativas según prueba de Duncan para p<0.05

En la Tabla 16 se presentan los valores de los coeficientes de correlación lineal entre la germinación del polen *in vivo* en el estigma, el número de tubos en la base del estilo y el número de semillas por fruto. Se aprecian correlaciones positivas y altamente significativas entre las variables, presentándose la asociación más alta (0.95 **) entre el número de semillas por fruto y el número de tubos en la base del estilo.

Fernández (13) encontró que el número de tubos polínicos al final del estilo fue la variable que más correlacionó con el número de semillas por fruto, recomendándolo como un buen indicador para estimar la eficiencia en las hibridaciones.

Tabla 16. Correlaciones lineales entre la germinación del polen in vivo en el estigma, el número de tubos polínicos en la base del estilo y el número de semillas por fruto.

Caracteres	Germinación del polen <i>in vivo</i>	Número de tubos polínicos
Número de semillas por fruto	0.89 **	0.95 **
Número de tubos polínicos	0.90 **	

** Significativo para p<0.01

Conclusiones

En general se pudo apreciar que los métodos estudiados para la estimación de la calidad del polen no presentan la misma confiabilidad.

Se comprobó que la tinción morfológica no es una técnica confiable para estimar la viabilidad del polen fresco y almacenado de papa pues sobrestima la viabilidad polínica, no expresando con exactitud la capacidad germinativa, ya que se basan en determinar la viabilidad mas no la germinabilidad y pudiera ser que granos no abortados perdieran la capacidad de germinar, sin que ello se traduzca en malformaciones morfológicas. No obstante puede ser usado para la discriminación cuando se tienen muchos genotipos.

Se pudo comprobar que la germinación del polen *in vitro* e *in vivo* son métodos efectivos para la estimación de la calidad del polen, los cuales están correlacionados con el número de semillas por fruto, permitiendo estimados confiables de fertilidad masculina y de esta forma seleccionar al que será utilizado como progenitor masculino o femenino. Sin embargo, la germinación *in vitro* es un método mas fácil y aporta resultados confiables.

Se comprobó que el polen no debe conservarse a 4°C y 17°C por más de 10 y 5 días respectivamente para ser utilizado en las polinizaciones, así como que la variedad Atlantic no debe utilizarse como progenitor masculino, por su baja viabilidad del polen en las condiciones cubanas.

En las pruebas de germinación *in vivo* se cuenta el número de semillas o el número de tubos polínicos en la base del estilo; estas medidas son las que están más cerca de una auténtica estimación de la fertilidad del polen. Es un proceso laborioso, que requiere de tiempo y de microscopio de fluorescencia con luz ultravioleta, aunque presenta la ventaja de que una vez fijados los estilos puede conservarse el material hasta el momento de su tinción y observación.

El trabajo también puso de manifiesto que la medición del diámetro del polen es un indicador eficiente de la ploidía en papa y constituye un método indirecto que permite la identificación de materiales diploides y tetraploides.

Referencias Bibliográficas

1. Almekinders, C.G. 1995. On flowering and Botanical seed production in potato (*Solanum tuberosum* L). Doctoral thesis, Wageningen Agricultural University. The Netherlands, 133 p.
2. Bamberg, J.B., R.E. Hanneman. 1991a. An effective method for culturing pollen tubes of potato. *Am. Pot. Journal.* 68 (6): 373-379.
3. Bamberg, J.B., R.E. Hanneman. 1991b. Characterization of a new gibberelin related Dwarfing locus in potato. *Am. Pot. Journal.* 68(1): 45-52.
4. Bamberg, J.B., R.E. Hanneman. 1991c. Rapid ploidy screening of tuber-bearing *Solanum* (potato) species through pollen diameter measurement. *Am. Pot. Journal.* 68: 279-285.

5. Bamberg, J.B. 1995. Screening potato (*Solanum*) species for male fertility under stress. Am. Pot. Journal 72(1) :23-33.
6. Brown, C.R., K.D. Adiwilaga. 1991. Use of rescue pollination to make a complex interspecific cross in potato. Am. Pot. Journal. 68: 813-820.
7. Brown, C.R., C.P. Yang, K. Wiatkowski, K.D. Adiwilaga. 1991. Insert cry number, chromosome number, pollen stainability, and crossability of *Agrobacterium* transformed diploid potato. Am. Pot. Journal 68: 813-820.
8. De Maine, M.J. 1997. The male fertility of primary first generation dihaploids of *Solanum tuberosum*. Potato Research. 40(1): 59-68.
9. Domínguez E. 2000. Mejora Genética de la fertilidad del polen de tomate (*Lycopersicon Mill.* spp.) a bajas temperaturas: Aprovechamiento de la selección gametofítica. Tesis de grado. Universidad de Malaga, España. 180 p.
10. Estévez, A. 1985. Estudio de la viabilidad del polen en cinco variedades de papa (*S. tuberosum*). Cultivos Tropicales. 7 (3): 75-80.
11. Estrada N. 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa.
12. Ermishin, A.P., A.V. Savchuk, N.V. Kalashnikova. 1997. Effect of general and specific crossability of parental forms on hybridization efficiency of potato dihaploids. Vestsi-Akademii-Navuk-Belarusi. -Seryya-biyalagich navuk (Belarus). Jul-sep No. 3: 37-40.
13. Fernández, R.F. 1990. Fructificación a bajas temperaturas en *Lycopersicon Mill.* Tesis de grado. Universidad de Malaga, España. 228p.
14. Fernández-Muñoz, R., J.J. González-Fernández, J. Cuartero. 1995. Genetics of the viability of pollen grain produced at low temperature in *Lycopersicon Mill.* Euphytica. 84: 139-144.
15. Filotico, F., D. Carputo, A. Barone. 1995. 2n pollen production in *Solanum phureja* *S. tuberosum* hybrids. J. Gent and Breed 49: 255-260.
16. Ganeshan, S. 1985. Viability and fertilizing capacity of onion pollen stored in liquid nitrogen. Tropical Agriculture. 63: 46-48.
17. García, G., M.E. González, O. Sam. 1996. Algunas características asociadas con la ploidía en papa. Cultivos Tropicales. 17(1): 65-75.
18. González, M.E., A. Estévez. 1991. Porcentaje de fertilidad del polen en especies y variedades de la papa. Cultivos Tropicales. 12(1): 5-7.
19. González, M.E., A. Estévez, T. Rodríguez, M. Alvarez. 1992. Estudio de la fertilidad del polen en especies de papa. Cultivos Tropicales. 13(1):70-73.

20. Huaman, Z. 1995. Técnicas citológicas para determinar el número cromosómico y la fertilidad de las papas. Guía de investigación. CIP Circular. 10: 30.
21. Janssen, A.W.B., J.C. Hermsen. 1976. Estimating pollen fertility in *Solanum* species and haploids. *Euphytica*. 25: 575-586.
22. Kearns, C.A., D.W. Inouye. 1993. Techniques for pollination biologists. Colorado, University Press of Colorado. 203 p.
23. Moreno, E., M.C. Mendoza, L.E. Mendoza. 1992. Relación de la fertilidad del polen y la posición de muestreo en la panoja de sorgo. *Chapingo*. 26(79/80): 74-98.
24. Origo, J., C. Hershey. 1984. Almacenamiento del polen de yuca por medio de liofilización y varios regímenes de humedad y temperatura. *Acta Agronómica*. 34(1): 21-25.
25. Ortiz, R.Y., E. Camadro 1994. Utilización potencial de clones de papa obtenidos por autofecundación como inductores de haploidía en cruzamientos 4Xx 2X. *Revista latinoamericana de la papa* 5-6(1):46-53.
26. Pandey, S.K., P.K. Gupta. 1995. Comparison of andigena and tuberosum for enhancing TPS production. *Journal of The Indian Potato Association* 22 (3-4): 122-128.
27. Shicttenhelm, S., R. Hoestra. 1995. Recommended isolation for the field multiplication of diploid tuber-bearing *Solanum* species. *Plant Breeding*. 114(4): 369-371.
28. Shivanna, K.D., H.F. Linskens, M. Cresti. 1991. Pollen viability and pollen vigor. *Theor. Applied Genetic*. 81: 38-42.
29. Stanley, G.R., H.F. Linskens. 1974. Pollen biology, biochemistry, and management. Berlín, Springen-Verlag 307p. Steel, R.G.D., J. Torrie. (1990). *Bioestadística: Principios y procedimientos*. México: Mc Graw Interamericana de México, p. 328-333.
30. Stone, J.L., J.D. Thomson, S.J. Dent-Acosta. 1995. Assessment of pollen viability in Hand-pollination experiments: A Review. *Am. Jour. of Botany*. 82(9): 1186-1197.
31. Tanner, G.J., M. Piccirilli, A.E. Moore, P.J. Lardin, S. Arcioni. 1990. Initiation of non-physiological division in cultured microspores of *Medicago* sp. *Protoplasma*. 158:165-167.
32. Towill, E., C. Walster, C. 2000. Cryopreservation of pollen. Pgs. 115-129 in cryopreservation of Tropical Plant Germoplasm (IPGRI). Florent Engelmann and Hiroko Takigi (eds). Tsukuba, Japan.
33. Van Marrewijk, G.A. 1993. Flowenng biology and hybrid varieties. Hybrid varieties. In: *International Course on Applied Plant Breeding*. The Netherlands, IAC. 80p.