POLINIZACIÓN ESTIGMÁTICA IN VITRO DE FRESA (*FRAGARIA VESCA*) A PARTIR DE LAS VARIEDADES MONTEREY, ALBEÓN Y DIAMANTE CON MIRAS A LA OBTENCIÓN DE UN NUEVO GENOTIPO

Autoras:
Karla Rivera¹
Alejandra Rivera¹
Carlos Peña²

1. K. Rivera, A. Rivera
Facultad de Ciencias de la Ingeniería
Universidad Tecnológica Equinoccial, Av. Occidental y Av. Mariana de Jesús, Apartado
17-01-2764, Quito – Ecuador
krivera@ute.edu.ec - rumag4468@ute.edu.ec
2. C. Peña
Ingeniería en Biotecnología, Escuela Politécnica del Ejército, Quito-Ecuador.

**REVISTA DE
INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA**

Resumen

La siembra de fresa es promisoría en el Ecuador y sus cultivos se encuentran en crecimiento. Se ha visto la necesidad de contar con variedades propias para mejorar la producción interna; el objetivo de este estudio es la obtención de un nuevo genotipo, a partir de variedades existentes en campo. Se aisló plantas élite de las 3 variedades Monterey, Albeón y Diamante a condiciones de invernadero y se las sometió a floraciones continuas con ácido giberélico (AG), se emasculó flores semi-abiertas, y se las introdujo a condiciones *in vitro* con una desinfección previa evaluando los desinfectantes hipoclorito de sodio 0,5% y fungicida al 1,5% en tiempos de 6,8,10 y 15 minutos de inmersión de los pistilos. Posteriormente se eliminó los sépalos, pétalos y anteras, y se los introdujo *in vitro* en medios M&S, se valoró la oxidación y presencia de exudado en la base del estigma. En los gametos masculinos (polen), se realizó pruebas de viabilidad con la germinación del tubo polínico a partir de anteras que no habían sufrido dehiscencia, el polen in maduro fue capaz de germinar en una solución de medio BK con 50mg/L de H_3BO_3 y sacarosa al 10%, obteniéndose tubos polínicos largos y vitales a las 12 horas de incubación. Esta investigación constituye el punto de partida para la búsqueda de un nuevo genotipo por medio de una fertilización *in vitro* que podría permitir mezclar 2 variedades distintas para la obtención de un genotipo nuevo con características de los dos progenitores.

Palabras clave: estigma, polen, *in vitro*, polinización, tubo polínico

Abstract

The strawberry sowing is a really important issue in Ecuador, because these plantations are increasing around the country. It has seen the necessity to have an own variety to improve internal production. The goal of this investigation is to get a new genotype from varieties that already exist in camp. First of all three varieties of elit plants were isolated in greenhouse conditions and they were induced to following blooms with Giberelic acid. Regularly open Flowers were emasculated, later they were introduced to *in vitro* conditions. How ever, before they were disinfected with a sodium hypochlorite solution 0.5% and fungicide 1.5%. The pistils were evaluated in 6,8,10 and 15 minutes, later petals, sepals and anthers were eliminated; they were introduced in M&S *in vitro* médiums. The oxidation and the presence of exudate were valorated at the base of the stigma. Prove of viability were made in the male gamets (Pollen) with pollen tube germination. It was made from anthers with out dehiscence, the immature pollen was able to germinated in a BK medium with 500 mg/L of boron and sucrose 10%, getting polinic longers and helthly tubes at 12 hours of incubation, This investigation is the base to look for a new genotip from *in vitro* proces with two varities.

Keywords: stigma, pollen, *in vitro*, pollination, pollen tube

Recibido: Mayo 2012

Aprobado: Noviembre 2012

Introducción

El cultivo de fresa se ha visto incrementado en un 20% en los últimos años en el Ecuador, sin embargo los costos de cultivo son bastante altos debido a que las plantas deben ser importadas de Chile o Estados Unidos por sus patentes. Las técnicas de Fito mejoramiento para obtener variedades propias, como la polinización estigmática *in vitro* se han vuelto muy valederas para la obtención de híbridos inter específicos que pudieran desarrollarse dentro del país y de esta forma evitar la importación de plantas.

Son muchas las técnicas de Fito mejoramiento que se pueden utilizar, sin embargo una de las más utilizadas es la técnica de fertilización o polinización ovular *in vitro*, que fue desarrollada por Kanta., *et al* en 1962, quienes observaron que en algunas especies de papaveráceas, los granos de polen tenían la capacidad de germinar *in vitro* directamente sobre los óvulos en cultivo, dando lugar al crecimiento del tubo polínico hasta llegar al saco embrionario y lograr la fertilización, con la consiguiente formación de semilla normal en el mismo medio de cultivo.

La polinización estigmática consiste en someter un pistilo a condiciones *in vitro* y colocar el polen fresco o pre-germinado sobre el estigma una vez que este se encuentre receptivo, evitando de esta forma barreras de fertilización genéticas o fisiológicas, que podrían darse cuando los granos de polen no pueden germinar sobre la misma flor aunque ésta se halle receptiva (Picca, 2000).

Para que dicha técnica sea exitosa es indispensable realizar el aislamiento del polen y los pistilos en estados fisiológicos adecuados, y tener muy en claro los tiempos de antesis y dehiscencia de las anteras; precisar el momento en el que el estigma esté receptivo además de recoger el polen en el tiempo adecuado para pre-germinarlo y colocarlo sobre el estigma.

En este estudio se estandarizó una técnica de desinfección para emasculación e introducir pistilos *in vitro* libres de contaminación,

usando desinfectantes en bajas concentraciones para no afectar a la fisiología del pistilo y lograr su viabilidad, ya que la formación exitosa de un híbrido inter específico depende de la interacción adecuada entre el estigma y el polen. Dulberger (1994) indica que desinfecciones muy fuertes podrían afectar la presencia de tricomas en el estigma, estos han sido descritos como un mecanismo de prevención de la deshidratación del exudado estigmático. Se evaluó además el momento de aparición de dicho exudado que provoca la receptividad del estigma en su base al polen ya que esto facilita la germinación del tubo dentro del estigma haciendo el papel de una guía para producir una fecundación.

En los gametos masculinos (polen) se evaluó la viabilidad del polen una vez sacado de la antera para la polinización, esto mediante la estandarización *in vitro* de polen geminado en un medio de cultivo apropiado basado en Brewbaker y Kwack (1963) y con varias modificaciones para polen de fresa.

Stanley y Linskens (1974) indican que los factores primordiales que podrían afectar a la germinación del polen, son la temperatura, pH, oxígeno, presión osmótica, humedad, cationes como Ca^{++} , K^+ , metales pesados, aniones como BO_3 , PO_4 y carbohidratos; además de otros factores secundarios como hormonas de crecimiento, micronutrientes e irradiación. En este punto Hauser y Morrison (1964) indican que para pre germinar el polen es indispensable tomar en cuenta algunas variables como el nivel de pH, y sobre todo el contenido de boro-sacarosa que permitirán dar lugar a la formación del tubo polínico en un medio nutritivo; por su parte Johri y Vasil (1962) explican que deben ser considerados los efectos de la población del polen en el medio, su diseminación pues estos puntos en ocasiones dan resultados erráticos de la germinación.

Para la germinación del tubo polínico se varió en el medio nutritivo BK las concentraciones de boro y sacarosa específicamente ya que según Brewbaker y Kwack (1963) los granos de polen requieren una concentración de boro presente en la secreción del estigma para dar inicio a la germinación. Otros autores como Johri y Vasil, 1961

concluyeron que el boro juega un papel estratégico en la germinación ya que promueve la absorción y el metabolismo del azúcar formando complejos de azúcar y boro, además incrementa la captación de oxígeno y está envuelto en la síntesis de materiales pectídicos de la pared del tubo polínico que se alargará.

Aunque la presencia de sacarosa en el medio es discutida por algunos autores como Iwanami (1972) quien indica que en el momento de la dehiscencia los granos de polen contienen azúcares solo como alimento de reserva, otros autores como Brewbaker y Kwack (1963) postulan que usar azúcares en concentraciones mayores al 40% no ayuda al rendimiento, sin embargo concentraciones menores al 20% promueven el reventamiento del polen y los tubos.

El rol del calcio, potasio, magnesio y sodio son importantes en la germinación, ya que se relacionan con la formación de pectinas a lo largo de la pared del polen.

Materiales y métodos

Emasculación del estigma e introducción in vitro.

El material vegetal (flores) fue obtenido de plantas élite de fresa de las variedades Albeón, Monterey y Diamante, conservadas en condiciones de invernadero e inducidas a floración temprana con ácido giberélico.

Las flores semi abiertas fueron emasculadas antes de la antesis y sometidas a varios tratamientos de desinfección. Las variables independientes fueron el uso de una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% y un fungicida al 1,5% con tiempos de exposición de 6, 8, 10 y 15 minutos para el cloro y de 8, 10 y 15 para el fungicida.

Se eliminó sépalos, anteras y pétalos, a continuación se introdujo los pistilos con pedúnculos en tubos de ensayo con medio sólido M&S (Murashige & Skoog, 1962).

Para los análisis estadísticos se evaluó (variables dependientes), la presencia de contaminación bacteriana, fúngica (escala: 1 sin contaminación, 2 bacterias, 3 hongos); la oxidación (niveles 1-4) y el tiempo de aparición del exudado (horas) en el estigma. Se realizó un Anova con pruebas de tukey para variables de exudado y oxidación, Chi-cuadrado y tablas de contingencia para variables de contaminación, gráficas de todas las variables y combinación de variables.

Medio de germinación del polen, germinación in vitro y crecimiento del tubo polínico.

Las flores fueron receptadas cuando se encontraron cerradas antes de que las anteras hayan sufrido dehiscencia, se realizó un lavado en hipoclorito de sodio durante 2 minutos y se aisló dentro de la cámara de flujo laminar las anteras cerradas, el polen fue extraído con ayuda de una aguja en el estéreo microscopio y disgregado en 5 puntos directamente en la caja petri con medio BK modificado, se dejó las cajas petri a temperatura ambiente y luz difusa para las posteriores evaluaciones.

Se realizó 6 tratamientos en el medio BK con variaciones en la concentración boro-sacarosa (Tabla 1) tres repeticiones por tratamiento con 5 puntos en cada caja petri. Se evaluó el porcentaje de germinación del tubo polínico a las 4, 8, 12 y 24 horas después de la incubación, para lo cual se observó en el estéreo microscopio grupos de no más de 100 granos de polen para realizar los conteos.

VARIACIONES EN EL MEDIO BK				
concentración en el medio mg/L				
solución	Ca(NO ₃) 2H ₂ O	KNO ₃	H ₃ BO ₃	Sacarosa g/L
1	300	100	50	40
2	300	100	50	70
3	300	100	50	100
4	300	100	100	40
5	300	100	100	70
6	300	100	100	100

Tabla 1. Variaciones en el medio BK de boro y sacarosa mg/L

Para los análisis estadísticos se realizó un ANOVA utilizando un factorial entre la solución utilizada (6 soluciones) y el tiempo de germinación (4, 8, 12 y 24 horas), como variables independientes. La variable dependiente fue el porcentaje de germinación. Para ambos factores el valor de significancia fue menor al 5%, por lo que se realizaron pruebas de Tukey.

Resultados y discusión

Emasculación del estigma e introducción in vitro.

Tiempos de inmersión bajos en hipoclorito de sodio resultaron adecuados para evitar la oxidación de los pistilos, registrándose los menores niveles de oxidación con tiempos de inmersión de 8 minutos, en cuanto a la inmersión en fungicida no se encontró una diferencia estadística significativa entre las exposiciones de 8 y 15 minutos para la oxidación.

En cuanto al tiempo de aparición del exudado se observó que ha menores tiempos de inmersión de los pistilos en cloro y fungicida este aparece en menor tiempo, en este orden el mejor tratamiento fue el de 8 minutos en cloro 0.5% y 8 minutos en fungicida 1.5% dando un tiempo de aparición de 2.5 horas (figura 1).

Figura 1. Efecto del uso de cloro y fungicida en el tiempo de exudado

Al no encontrar una tendencia específica en cuanto a la contaminación y el uso de desinfectantes, se estableció una escala de contaminación. Se ubicó la contaminación fúngica en un nivel de contaminación 3, la contaminación bacteriana en el nivel 2 y la no contaminación en un nivel de 1, en la gráfica se observa una tendencia de disminuir la contaminación al aumentar las concentraciones de cloro y fungicida (Figura 2) se puede mencionar que los mejores tratamientos son tiempos en cloro (0.5%) de 6 y 8 min. y phyton (1.5%) de 8 y 10 min.

Figura 2. Efecto del uso de fungicida y cloro en la contaminación

Medio de germinación del polen, germinación in vitro y crecimiento del tubo polínico.

Se observó geminación del polen desde las 4 horas en todos los tratamientos, sin embargo en porcentaje hubo diferencias significativas, en la tabla 3. se observa en el subconjunto 4 que la mejor solución fue la 3 con una media de 53.52.

solución	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
solución 1	60	15.28			
solución 2	60		28.83		
solución 6	52			45.06	
solución 4	60			46.38	
solución 5	56			46.80	
solución 3	60				53.52
Significación		1.000	1.000	0.967	1.000

Tabla 3. Tukey para los porcentajes de germinación en las distintas soluciones nutritivas.

En la figura 3. Se observa que los mejores tiempos de germinación fueron a las 12 y 24 horas, encontrándose una germinación de más del 60% con la solución 3 que contiene 50mg/L de H_3BO_3 y 100 g/L de sacarosa.

Es importante tomar en cuenta que con estas concentraciones se observaron tubos polínicos más largos (figura 4) y vitales, que podría alcanzar el óvulo al germinar dentro del estigma en condiciones apropiadas.

En este aspecto se pudo determinar que la relación de las concentraciones de boro-sacarosa en el medio BK son determinantes para el crecimiento óptimo del tubo polínico, datos que se corroboran con la investigación realizada por Changong y McComb (1991) quienes observaron el crecimiento de polen de arroz en estas condiciones.

Figura 3. Es el porcentaje de germinación con respecto a las diferentes soluciones, tomando en cuenta el tiempo de incubación

- Germinación en más del 60% de granos de polen, se observan tubos polínicos bien diferenciados. Fotografía tomada en el microscopio 40X
- Se observa 2 granos de polen con sus tubos polínicos crecidos en más de 100 veces su tamaño, resultado obtenido con el tratamiento 3. Fotografía tomada en el microscopio 100X

Los tiempos de germinación son similares a los presentados por Kariya, 1989 en arroz, y por los presentados por Cook y Walden, 1965 en maíz.

Conclusiones

Con el uso de desinfectantes (cloro y fungicida Phyton), se puede lograr introducir pistilos viables *in vitro*, sin embargo entre mayor sea su concentración y tiempo de inmersión, mayor es la oxidación presente, por ello y tomando en cuenta las demás variables el mejor tratamiento es 6 min en cloro al 0.5% y 8 min phyton al 1.5%.

Los estigmas introducidos mostraron presencia de exudado entre las 2,5 y 5 horas después de su introducción, notándose mayores tiempos al aplicar desinfecciones más severas en el pistilo.

El estado de la antera no tiene mayor incidencia en la viabilidad del estigma, en lo posterior se trabajará solo con flores cuya antera se encuentre cerrada, para asegurar que el estigma no haya sido polinizado.

Los mejores resultados en cuanto a desinfección se obtienen cuando el estado fisiológico de la yema floral se encuentra cerrada o semi abierta.

Es posible aislar granos de polen estériles en condiciones asépticas y hacerlos germinar *in vitro* en un medio de cultivo BK, dicho medio tuvo que ser modificado en concentraciones de Boro y Sacarosa para determinar la relación adecuada para el crecimiento óptimo del tubo polínico en menor tiempo.

En conclusión aun a pesar de que por separado la estadística muestra que a mayores cantidades de boro y sacarosa se da una mayor germinación, en conjunto el accionar de los dos compuestos resultaron ser mejor en relación 1-2, es decir con la solución 3 (50mg/L boro- 100mg/L sacarosa).

El tamaño del tubo polínico depender de la relación boro-sacarosa, y es un factor importante y determinante para la fecundación, puesto que si el tubo polínico no llega al óvulo este abortará antes de tiempo, con esta técnica se logró obtener tubos polínicos crecidos en 100 veces el diámetro del polen.

Bibliografía

- Brewbaker, J. L & Kwack, B. H. (1963). "The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth" *American Journal of Botany*.
- Cook, F. S. & Walden, D. B. (1965). "The male genotype of Zea mays *In vitro* germination. *Canadian Journal of Botany*.
- Elleman, C.J. Franklin-Tong, V. & Dickson, H.G. (1992) "Pollination in species with dry stigmas: the nature of early stigmatic response and pathway taken by pollen tubes" *Department of Plant Sciences, University of Oxford, South UK*.
- Elleman, C.J & Dickson, H.G. (1995) "Identification of pollen components regulating pollination-specific responses in stigmatic papillae of *Brassica oleracea*" *Department of Plant Sciences, University of Oxford, South UK*.

Franklinton, V.E, Lawrence, J. & Franklin, H. (1988). "An *in vitro*

bioassay for the stigmatic product of the self-incompatibility gene in *Papaver rhoeas*". *Department of genetics, University of Birmingham*.

- Gómez, A. Martínez, V. Parra, L. & García, F. (2009). "Anther and stigma morphology in mirror-image flowers of *Chamaecrista chamaecristoides* (Fabaceae): implications for buzz pollination". *Pittsburg University, USA*.
- Gurusamy, V. Vandenberg, A. & Bett, K. (2006). "Manipulation of *in vivo* pollination techniques to improve the fertilization efficiency of interspecific crosses in the genus *Phaseolus*". *University of Saskatchewan, Berlin*.
- Holm, S. O. (1993). "Pollination density- effects on pollen germination and pollen tube growth in *Betula pubescens* Ehrh. In northern Sweden". *University of Umea, Sweden*.
- Kariya, K. (1989), "Sterility caused by cooling treatment at the flowering stage of rice plants. Establishment of a method of *in vitro* pollen germination". *Japanese Journal of Crop Science*.
- Vasil, I. K. (1964). "Effect of boron on pollen germination and pollen tube growth. In: *Pollen physiology and fertilization*". *North Holland Publishing Co., Amsterdam*.
- Zebrowska, J. (1997), "Influence of pollination modes on yield components in strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.)" *Department of genetics and horticultural Plant breeding, Faculty of horticulture, agricultural University of Lublin. Poland*.