



DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD Y FERTILIDAD DEL POLEN



STC
STC-INIA/CIP

En los programas de mejoramiento genético del cultivo de papa, la determinación de la viabilidad del polen es un factor esencial para iniciar el plan de cruzamientos, realizar hibridaciones dirigidas exitosas y obtener la semilla híbrida deseada.

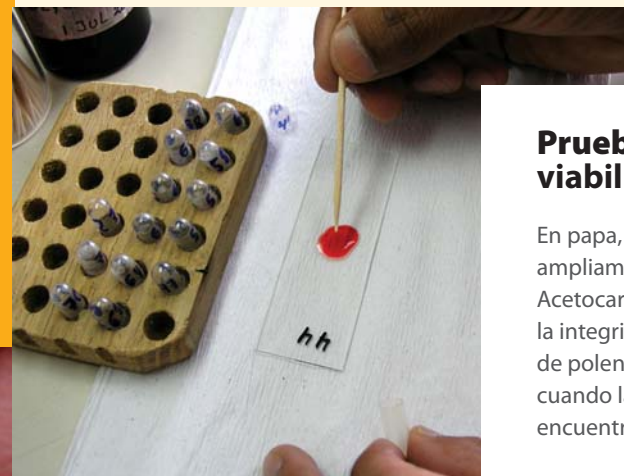
Existen distintos métodos para evaluar la viabilidad del polen. Entre los más rápidos y precisos destacan la tinción con colorantes vitales y la germinación en medios artificiales. Las pruebas de tinción tienen ventajas como indicadores de la viabilidad del polen, ya que son más rápidas y fáciles que la germinación del polen; sin embargo, tienden a sobreestimar la viabilidad y el poder germinativo real de los granos de polen. Por otro lado, la germinación *in vitro* depende del genotipo; las condiciones ambientales; la madurez del polen; la composición y el pH del medio, por lo que es necesario determinar las condiciones óptimas para la germinación del polen.



Toma de la muestra

Para realizar las evaluaciones se requiere coleccionar flores completamente abiertas, con las anteras próximas a la dehiscencia o completamente dehiscentes; se dejan secar a temperatura ambiente y posteriormente se procede a la extracción del polen en cápsulas de gelatina con la ayuda de un vibrador eléctrico (Fig. 1).

Fig. 1. Colecta de polen de una flor dehiscente, utilizando un vibrador eléctrico.



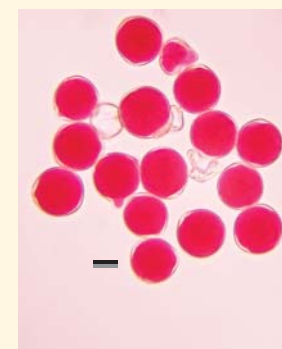
Prueba de tinción o viabilidad de polen

En papa, una de las técnicas de tinción ampliamente utilizada es la Gelatina de Acetocarmín Glicerol. Esta prueba mide la integridad del citoplasma: los granos de polen se colorean de color rojo cuando la membrana citoplasmática se encuentra íntegra (Marks, 1954).

Fig. 2. Esparcir suavemente el polen sobre el colorante con la ayuda de un palillo mondadientes.

Procedimiento

Al centro de un portaobjeto, previamente identificado, colocar 1 o 2 gotas de Gelatina de Acetocarmín Glicerol al 2% (Anexo 1a). Utilizando la punta de una aguja o con un palillo mondadientes de madera extraer el polen y colocarlo en la lámina portaobjeto, esparcir el polen en el colorante con ligeros movimientos circulares (Fig. 2). Dejar reposar la muestra por 1 minuto y cubrirla con una lámina cubreobjeto. Mantener las láminas montadas en posición horizontal por uno o dos días. Si se quiere guardar las muestras, colocarlas en cajas diseñadas para este propósito y refrigerarlas a 4°C.



Observar bajo un microscopio óptico a un aumento de 200 o 400. Una tinción de color rojo intenso y un citoplasma límpido es indicativo de un polen viable o fértil, mientras que un citoplasma no coloreado o de color rosa indica un polen no viable o estéril (Fig. 3). Comparados con los granos viables, los granos estériles son deformes, con el citoplasma granular y/o retraído (eclipse de esterilidad).

Fig. 3. Observación de granos de polen de papa, con tinción de Gelatina de Acetocarmín Glicerol a 200x. Barra = 20 μm

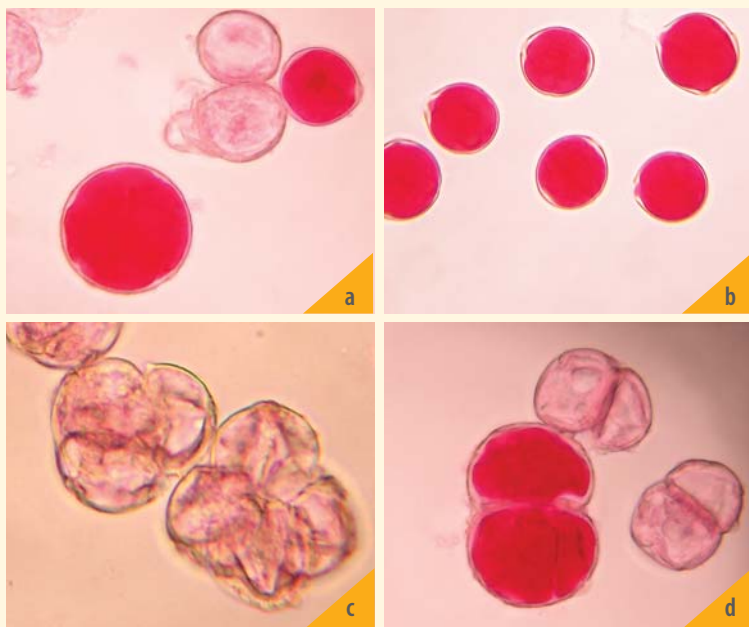


Fig. 4. Observación de anomalías a un aumento de 200x; a) Polen 2n, b) polen viable, c) tétradas estériles, d) Diadas estériles. Barra=20um

Si se observan anomalías, como tétradas o granos de polen con 4 núcleos, significa que la muestra de polen es infértil (Fig. 4 c, d). En muestras de polen de papas diploides, también podrán observarse granos de polen de un tamaño mayor al de un grano normal, que corresponden a polen con carga genética no reducida (polen 2n) (Fig. 4 a).

Los conteos se realizan en 250 granos de polen en toda la lámina, y los resultados se expresan como el porcentaje respecto al número total de granos de polen.

Además, se propone una escala basada en los rangos de la viabilidad de polen de genotipos promisorios a fin de determinar si pueden ser utilizados como parentales masculinos en los programas de mejoramiento (Tabla 1).

Tabla 1. Escala para determinar el grado de viabilidad de una muestra de polen de papa.

Escala	Rangos	Descripción de la viabilidad
1	0	Estéril
3	<50	Bajo
5	>50-80	Moderado
7	>80-100	Alto



Fig. 5. Colocar el polen sobre las gotas del medio de cultivo.

Germinación *in vitro*

La germinación del polen *in vitro* permite hacer estimaciones confiables de la fertilidad. Esta técnica simula el desarrollo del tubo polínico en los tejidos estilares, ya que el medio de cultivo utilizado semeja en su composición al mucílago del estigma (Rodríguez-Riano & Dafni, 2000; Van Marrewijk, 1993).

El medio de cultivo utilizado para la germinación y crecimiento del tubo polínico de genotipos de papa contiene sucrosa (sacarosa), ácido bórico y polisorbato 20 (Tween 20) (Anexo 1b).

Procedimiento

Colocar 4 gotas del medio de cultivo sobre el interior de la tapa de una placa de Petri de 5.5 cm de diámetro, distribuyéndolas en los vértices de un cuadrado imaginario. Con la punta de un palillo mondadientes adicionar pequeñísimas cantidades de polen de una misma muestra sobre cada gota, esparciendo el polen con ligeros movimientos circulares (Fig. 5). Preparar una cámara húmeda



colocando un papel filtro humedecido con agua destilada cubriendo el fondo de la placa de Petri. Cubrir la placa de Petri con la contratapa y dejar a una temperatura de 20 a 24 °C hasta el día siguiente.

Colocar una gota de solución de yodo-yoduro de potasio (I-KI) (Anexo 1c) en la tapa de la placa de Petri donde se colocó la muestra de polen. Cubrir con una lámina cubreobjeto de 22x40 mm, y proceder a la observación bajo un microscopio óptico a un aumento de 100. Se consideran granos de polen germinados solo aquellos que emitan un tubo con una longitud mayor o igual al diámetro del polen (Fig. 6).

El conteo de granos de polen germinados y no germinados debe realizarse en un mínimo de 10 campos, y los resultados se expresan como el porcentaje respecto al número total de granos de polen por campo. Un porcentaje promedio del 80% indicará un polen fértil. En la misma figura se puede observar granos de polen que no han germinado.

Fig. 6. Observación de polen germinando en el medio de cultivo a 100x. Barra=10um.

Referencias Bibliográficas

- Marks, G.E. 1954. An aceto-carmin glycerol jelly for use in pollen fertility counts. *Stain Technol.* 29:277.
- Van Marrewijk, G. A. Flowering biology and hybrid varieties. Hybrid varieties.- En: International Course on Applied Plant Breeding. The Netherlands. IAC. 80 p., 1993. 66(1):61-71.
- Rodríguez-Riano & Dafni, 2000: A new procedure to asses pollen viability. *Sex. Plant. Reprod.* 12: 241-244.

Anexos

1a) Preparación del colorante Gelatina de Acetocarmín Glicerol

El colorante Gelatina de Acetocarmín Glicerol se prepara utilizando una solución de 100 ml de ácido acético al 45%, se hierve hasta la ebullición, luego se agregan 2 g de carmín hasta que se disuelva por completo (aproximadamente cuando se tenga una solución con un volumen de 60 ml). Se deja enfriar y se filtra; finalmente, se agrega un volumen de glicerina igual a la solución final (aproximadamente 60 ml). Todo el proceso se realiza dentro de una campana extractora y bajo constante agitación.

1b) Medio de cultivo utilizado para la germinación y crecimiento del tubo polínico

En un vaso de precipitados agregar 5 ml de una solución "madre" de ácido bórico a 200 ppm, 20 g de sucrosa y 0.2 ml de polisorbato 20, conocido comercialmente como Tween 20, luego completar con agua destilada a 100 ml. Homogeneizar la solución (la cual debe estar a un pH de 5.5) con un agitador magnético.

1c) Solución de yodo-yoduro de potasio

Disolver 1 g de I₂ y 1g de KI en 100 ml de etanol al 70% y almacenar en un frasco de color oscuro o ámbar a temperatura ambiente.



STC
STC-INIA/CIP

Centro Internacional de la Papa

P.O. Box 1558, Lima 12, Perú
www.cipotato.org

El CIP autoriza el uso de este material, siempre y cuando se cite la fuente.

Citación correcta:

Ordoñez, B. 2014. Determinación de la Viabilidad y Fertilidad del Polen.
Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. 8p.

Colaboradores: M. Gastelo / C. Bastos