

HORTICULTURA

Efecto de los medios de cultivo sobre la germinación *in vitro* de granos de polen en poblaciones de *Cucurbita maxima*

G.V. Marini; R.O. Arenas y L.S. Togno

INTA EEA La Consulta. gmarini@laconsulta.inta.gov.ar

Recibido: 30/06/10

Aceptado: 11/11/10

Resumen

Marini, G.V.; Arenas, R.O. y Togno, L.S. 2010. Efecto de los medios de cultivo sobre la germinación *in vitro* de granos de polen en poblaciones de *Cucurbita maxima*. Horticultura Argentina 29(70): 18-21

Se evaluó la germinación de polen de poblaciones de *C. maxima* en 24 medios de cultivo combinando tres niveles de sacarosa, dos de nitrato de calcio y cuatro de ácido bórico. Niveles

intermedios de sacarosa, presencia de calcio, y bajos contenidos de ácido bórico es la cantidad de nutriente requerido para evaluar la viabilidad de los granos de polen de poblaciones de *C. maxima*. Se propone protocolizar el uso del medio mencionado como método para el análisis rutinario del poder germinativo de granos de polen en las poblaciones evaluadas.

Palabras clave adicionales: zapallo, floración, polinización.

Abstract

Marini, G.V.; Arenas, R.O. and Togno, L.S. 2010. Effect of culture media on *in vitro* pollen grains germination in populations of *Cucurbita maxima*. Horticultura Argentina 29(70): 18-21

Pollen germination populations of *C. maxima* was evaluated in 24 culture media combining three levels of sucrose, two levels of calcium nitrate and four levels of boric acid was evaluated. The medium containing intermediate levels of sucrose, presen-

ce of calcium, and low content of boric acid showed the best results on pollen grains germination of populations of *C. maxima*. It is proposed to formalize the use of this medium as a method for routine analysis of pollen grains germination of these populations.

Additional keywords: pumpkin, flowering, pollination.

1. Introducción

El zapallo, una hortaliza muy cultivada en la República Argentina para la alimentación humana, es importante en la zona del Valle de Uco dado que sus características agroecológicas permiten cultivar variedades de buenos rendimientos y conservación, aptas para el transporte y la industria del deshidratado (Galmarini, 1992). Por ello, el estudio de poblaciones de zapallo (*C. maxima*) tiene particular importancia para el Banco de Germoplasma de Hortalizas de la Estación Experimental La Consulta INTA (BGLC), centro donde se desarrollan programas de mejoramiento genético de esta especie.

El zapallo pertenece al Orden Cucurbitales, a la familia Cucurbitáceas. Dentro del género *Cucurbita* existen varias especies cultivadas, como *C. maxima*, *C. moschata* y *C. pepo*. Se trata de plantas anuales, herbáceas, diclino-monoicas o dioicas, rara vez con flores hermafroditas, de color amarillo y solitarias, estambres con distinto grado de unión entre sí, ovario ínfero y semillas exalbuminadas (Siddoti Hartman & Konijnenburg, 2005).

En las variedades rastreras, las flores masculinas están situadas cerca del centro de la enredadera y son llevadas por pedúnculos delgados. Las flores femeninas son sostenidas por pedicelos cortos y acanalados, y están colocados distalmente con respecto a las masculinas. En las plantas arbustivas, las flores femeninas se encuentran cerca de la base de la planta. Las características del pedúnculo son distintas de cada especie (Della Gaspera, 2002).

Estas especies son de polinización entomófila y manifiestan el fenómeno de protandria, es decir, los estambres maduran y liberan el polen antes que el estigma esté receptivo. Primero aparecen las flores masculinas y unas dos semanas después, las flores femeninas (Della Gaspera, 2002).

Es común que se tenga una baja eficiencia en la obtención de frutos de algunas variedades, e incluso especies, y por consiguiente quede a menudo impedida la posibilidad de utilizar y manipular el germoplasma. Esto probablemente se deba al manejo de la polinización, vulnerabilidad del estigma y estilo, a la corta vida del polen o distintas fechas de floración, entre otros factores (Martínez Zambrano

Tabla 1. Medios de cultivo utilizados para la germinación de polen.

Medio N°	Sacarosa (g)	Nitrato de calcio (g)	Ácido bórico (g)
1			0,005
2			0,003
3		0,0432	0,001
4			0,01
5	5		0,005
6		0	0,003
7			0,001
8			0,01
9			0,005
10		0,0432	0,003
11			0,001
12			0,01
13	10		0,005
14		0	0,003
15			0,001
16			0,01
17			0,005
18		0,0432	0,003
19			0,001
20			0,01
21	20		0,005
22		0	0,003
23			0,001
24			0,01

& Andrade Flores, 2004).

Distintos factores como la luz, la temperatura y la humedad relativa del ambiente pueden influir en la cantidad y calidad del polen (Towill & Walters, 1993). El éxito de la polinización depende de que el

polen sea viable, es decir, que esté vivo y maduro cuando esté receptivo el estigma (Zwanzger Sánchez, 2006). Esto no sólo aumenta la producción de frutos, sino además, la cantidad de semillas por fruto, lo que representa una característica deseable para los trabajos que deben realizarse en un Banco de Germoplasma (Tighe, 2005).

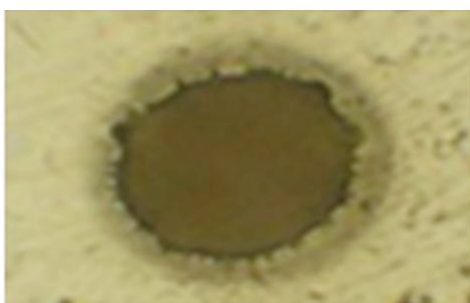
Se debe determinar el poder germinativo del polen para utilizar el recurso eficazmente. Para ello es necesario aplicar métodos adecuados para determinar su habilidad para fertilizar los óvulos. Existen diferentes técnicas de germinación *in vitro* que son consideradas como las más exactas, ya que permiten contabilizar la cantidad de polen germinado, a diferencia de las técnicas de tinción, en las que se pueden teñir granos de polen muertos mostrándolos como viables (Ochoa, 1991).

Los medios de cultivos en condición líquida y sólida, enriquecidos con sacarosa, calcio o boro son componentes de importancia para la germinación. Además, ensayos a diferentes concentraciones de estos nutrientes permiten abordar con mayor propiedad pruebas de viabilidad (Zwanzger Sánchez, 2006).

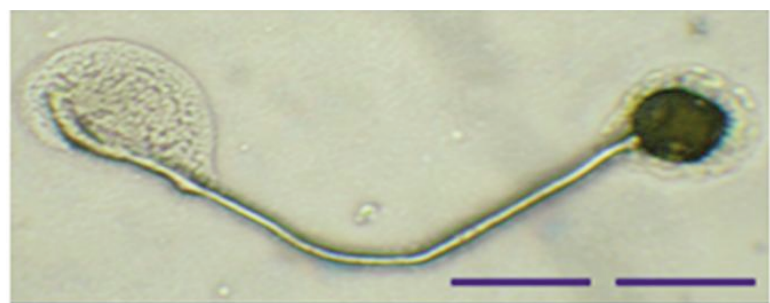
El objetivo de este trabajo fue realizar una evaluación exploratoria para medir la eficacia de distintos medios de cultivos en la germinación de granos de polen en poblaciones de *Cucurbita maxima*.

2. Materiales y métodos

El 21 de noviembre de 2006 se sembraron, con distribución completamente aleatorizada, 30 poblaciones de *C. maxima*, originarias del noroeste argentino (NOA), pertenecientes al BGLC, de las cuales se seleccionaron las poblaciones designadas con los números 361 (Catamarca), 445 (Jujuy) y 676 (Tucumán). Durante las primeras semanas de enero de 2007 se evaluaron 24 medios de cultivo combinados con tres niveles de sacarosa, dos niveles de ni-



Grano de polen no germinado



Grano de polen germinado

Figura 1. Criterio de evaluación de granos de polen no germinados y germinados.

trato de calcio y cuatro niveles de ácido bórico, diluidos en 100 mL de agua destilada (Tabla 1).

El día 28 de enero, un día anterior a la antesis, se cerraron mediante atadura, los pétalos de las flores masculinas. Al día siguiente, a primera hora de la mañana, se cortaron las flores masculinas de cada una de las poblaciones, posteriormente en condiciones de laboratorio se retiraron los pétalos de las mismas y se extrajo el polen de forma manual, golpeando suavemente el cáliz y dejándolo caer en portaobjetos con 2 mL de medio de cultivo y campos de recuento de 1 cm².

Los portaobjetos se mantuvieron durante 18 horas a 20 °C, oportunidad en que se realizó la lectura de germinación, bajo el microscopio a 40 X de aumento.

El método utilizado para evaluar los granos de polen como germinados fue cuando el tubo polínico alcanzaba un tamaño mayor o igual al ancho del grano de polen (Figura 1).

Los resultados fueron analizados mediante el programa estadístico Info-Gen, mediante análisis de varianza y test de Tukey ($P \leq 0,05$) (InfoGen/P, 2008).

3. Resultados y discusión

El medio de cultivo N° 10 (10 g de sacarosa, 0,0432 g de NO₃Ca y 0,003 g de ácido bórico) fue el de mejores resultados, con un promedio de 28,69 % de granos de polen germinados, seguido por el N° 9 (10 g

de sacarosa, 0,0432 g de NO₃Ca y 0,005 g de ácido bórico) con un promedio de 9,49 % y el N° 11 (10 g de sacarosa, 0,0432 g de NO₃Ca y 0,001 g de ácido bórico) con un promedio de 3,65 %. Los tres medios se diferenciaron significativamente entre sí y de los demás en el análisis de varianza y el test de Tukey ($P \leq 0,05$) (Figura 2).

No hubo diferencias significativas entre las poblaciones. El medio fue efectivo para las tres introducciones.

Se repitió el análisis de viabilidad de polen de las líneas seleccionadas a los 15 días y no se observaron variaciones significativas en el porcentaje de granos de polen germinados.

Bajo las condiciones en que se realizó el ensayo se puede inferir lo siguiente: niveles intermedios de sacarosa, presencia de calcio y bajos contenidos de ácido bórico permiten evaluar el poder germinativo de los granos de polen de poblaciones de *C. maxima*, pudiéndose protocolizar el uso del medio N° 10 como método para el análisis de poder germinativo de granos de polen de dichas poblaciones.

El ambiente requerido para la germinación de polen *in vitro* se relaciona con la composición genética e incluso con la calidad y la cantidad de reservas de nutrientes del polen, por lo que algunas especies requieren de medios de cultivos más complejos para la germinación (Zwanzger Sánchez, 2006).

Según Parés-Martínez *et al.* (2006), en otras especies como papaya se ha obtenido entre un 85 % y

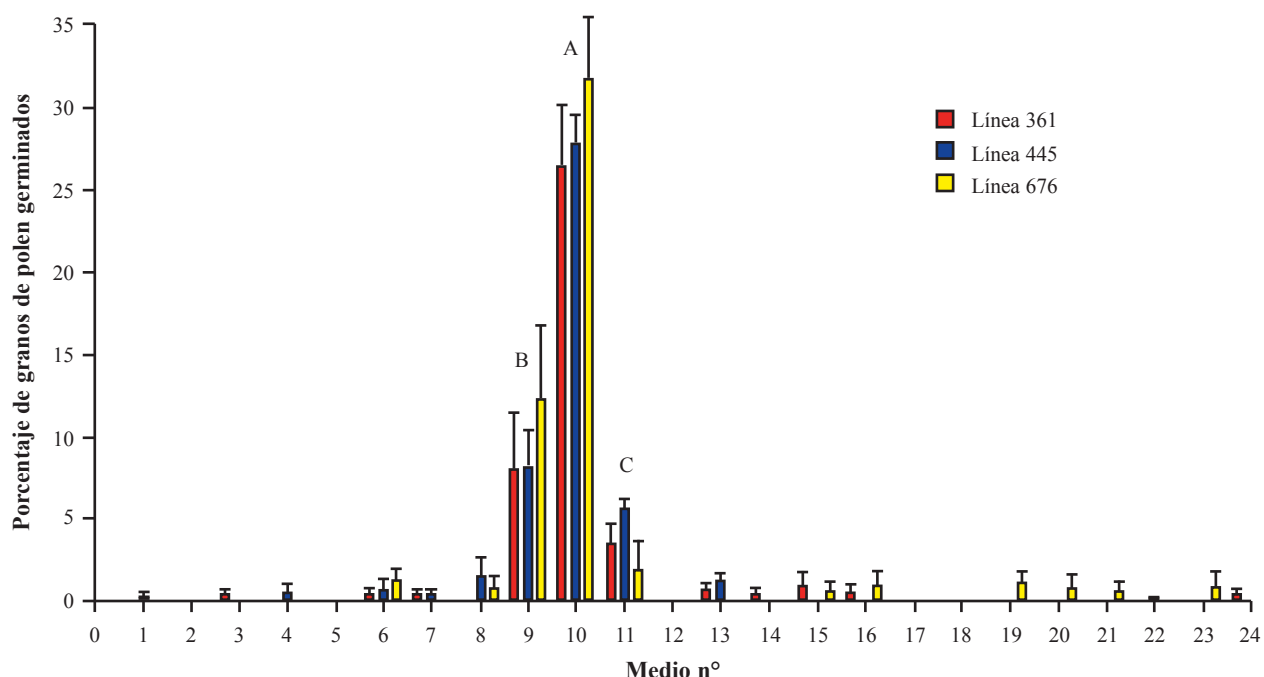


Figura 2. Porcentaje de granos de polen germinados de poblaciones de *C. maxima* en los diferentes medios de cultivo.

90 % de germinación de los granos, una hora después de ser colocados en un medio con agar y sacarosa. Por el contrario en el presente trabajo, la germinación no superó el 30 % de granos de polen germinados, pudiéndose determinar su viabilidad 18 horas después de ser colocados en el medio de cultivo, siendo necesaria la presencia de nutrientes adicionales como el boro y el nitrato de calcio.

Este medio prueba la viabilidad del polen en poblaciones de *C. maxima*, provenientes del NOA y permite la determinación del poder germinativo del polen utilizando el recurso eficazmente, ya que permite contabilizar la cantidad de polen germinado, al igual que los estudios realizados por Ochoa (1991) para estimar la viabilidad del polen en *Lolium*.

4. Conclusiones

Se propone un medio de cultivo adecuado y confiable para evaluar la viabilidad del polen que combina sacarosa con otros nutrientes como nitrato, calcio y ácido bórico.

Se determinó la necesidad de adicionar al medio de cultivo nutrientes, como el calcio y el boro, para que los granos de polen germinaran.

Los factores de importancia en la germinación de polen determinados en este estudio fueron el marcado de las flores masculinas, la extracción de polen y la siembra.

Se planteó un protocolo para la extracción y siembra de polen de estas poblaciones de zapallo, que consistió en marcar las flores masculinas antes de la anthesis, cortarlas al siguiente día y extraer el polen para sembrarlo en portaobjetos con el medio propuesto para evaluar la viabilidad.

5. Bibliografía

Della Gaspera, P.G. 2002. Cucurbitáceas 2002. Estación Experimental Agropecuaria INTA La Consulta. Mimeografiado. p 3-40.
Galmarini, C.R. 1992. El Cultivo de Zapallo. Estación Experimental Agropecuaria INTA La Consulta.

Mimeografiado. LC006. p 1-6.
Martínez Zambrano, G. & Andrade Flores, I. 2004. Técnicas de cruzamiento en Chile serrano. Memorias de la Primera Convención Mundial del Chile 2004. Proceedings of the First World Pepper Convention 2004. Mejoramiento y Recursos Genéticos. Breeding and Genetic Resources. p 29.
Infogen/P, 2008. Software para la estadística genómica y aplicaciones en mejoramiento genético. Estadística y Biometría. UNC. Actualización: 12/05/2008. Vigencia hasta: 20/05/2009. Disponible en: <http://www.info-gen.com.ar>
Ochoa, H. 1991. Evaluación de técnicas de estimación de la viabilidad del polen en *Lolium* y desarrollo de una metodología para la conservación del mismo. Universidad Nacional de Mar del Plata. Facultad de Ciencias Agrarias. Balcarce. Marzo p 1-74.
Parés-Martínez, J.; Basso, C.; Jáuregui, D. & Meléndez, L. 2006. Cantidad, viabilidad y germinabilidad de los granos de polen de *Carica papaya* L. Rev. Fac. Agron., Junio 2006, vol. 23, No. 2, p. 172 – 180. ISSN 0378-7818.
Sidotti Hartmann, B. & Konijnenburg, A., 2005. Zapallos: producción de semillas. Estación Experimental Valle Inferior del Río Negro. INTA. Comunicaciones Revista 48: p 1-4.
Tighe, M.E. 2005. Comparison of 5 Pollen Storage Protocols for Subtropical Pine Species. Tesis (M. Sc) North Carolina State University. 74 p.
Towill, L.E. & Walters, C. 1993. Cryopreservation of pollen. USDA, ARS National Seed Storage Laboratory, Fort Collins, USA. p 115-129.
Zwanzger Sánchez, C. 2006. Factores de importancia en la germinación de polen de Vid (*Vitis vinifera* L.) para ensayos de viabilidad y verificación varietal de arándanos (*Vaccinium corymbosum*) mediante microsátélites. Tesis (Ing. Agr.) Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Departamento de Fruticultura y Enología.