

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA

ARTIA • SIGMA

**MÁSTER EN PRODUCCIÓN VEGETAL EN CULTIVOS
PROTEGIDOS**

TRABAJO FIN DE MASTER

**COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE ESTIMACIÓN DE VIABILIDAD
DEL POLEN DE *Cucurbita pepo*, L.**

ALUMNO

MANUEL MOYA MARTÍNEZ
ALMERÍA, DICIEMBRE 2012

DIRECTORES

Dra. VIRGINIA PINILLOS VILLATORO
Dr. PEDRO GOMEZ JIMENEZ DE CISNEROS

Comparación de dos métodos de estimación de viabilidad del polen de *Cucurbita pepo*, L.

Resumen

En mejora genética vegetal de calabacín, la baja fertilidad de las poblaciones de mutantes inducidos químicamente supone un hándicap por no poder disponer de esta fuente de variación genética inagotable ya que no se pueden reproducir las líneas obtenidas. Aunque ya se ha demostrado previamente que la viabilidad del polen de calabacín está relacionada con la capacidad de producción de fruto y semillas, introducir el análisis de la viabilidad para miles de líneas para una mayor producción de poblaciones mutantes precisa un método adaptado a las características del polen de esta especie y al manejo de estas poblaciones. En este trabajo se han evaluado en poblaciones control sin mutaciones dos métodos de estimación de viabilidad de polen comparando: el test de la reacción fluorocromática (FCR) y el test del Tetrazolium (TTC). Se ha valorado como se ve afectada la viabilidad del polen tras la conservación previa del mismo en alta humedad relativa, y se ha analizado la evolución de la tinción con el tiempo de incubación en ambos test. Los datos de la población control, una población muy homogénea en términos de viabilidad, permiten comprobar que estas muestras pueden conservarse sin grandes diferencias de viabilidad hasta una hora y la tinción, dependiendo el test, se puede llevar a cabo en menos de 30 minutos. Cuando se han llevado estos experimentos en poblaciones mutantes, se comprobó lo poco homogénea que es la población en términos de viabilidad y que el tiempo de incubación altera la estimación de viabilidad de forma más acusada que en las poblaciones control.

Summary

Populations of chemical induced mutants using in zucchini plant breeding, show low fertility which is a handicap because reduce the utility of this source of genetic variation reducing reproduction of breeding lines obtained. Although we have previously shown that zucchini pollen viability is related to the production of fruit and seed, introduce viability analysis for thousands mutant lines need a method adapted to the characteristics of pollen of this species and the management of these populations. We have evaluated control populations without mutation by two methods of estimation of pollen viability: the FCR reaction test and Tetrazolium test (TTC), and also how pollen viability is affected after storage at high relative humidity and the evolution of incubation of pollen with the tests. Data of the control population, a high homogeneous population in terms of viability, allow checking that these samples can be stored without significant differences until one hour and incubation time, depending on the test, may be carried out in less than 30 minutes. When those experiments were carried to mutant populations, it was found a high heterogeneity of the population in terms of viability and that incubation time can modify the estimation of viability in a sharply way than in control populations.

Introducción

El calabacín (*Cucurbita pepo* spp. *pepo zucchini*) es una especie monoica, es decir, presenta flores masculinas y femeninas en el mismo pie de planta. Las flores masculinas muestran tres estambres completos y todos ellos se fusionan a nivel de las anteras formando el cono estaminal, una estructura estriada, compleja y globular (fig. 1). El polen que producen estas anteras es esférico y muy grande (180-200 micras de diámetro), poliporado y cubierto por una estructura sólida con abundantes estructuras prominentes (Digonnet-Kerhoas et al, 1989). La corta vida del polen limita la polinización de esta especie, de forma que en las primeras 2 horas de apertura de la flor los polinizadores mueven más del 80% del total (Nepi et al, 2010).

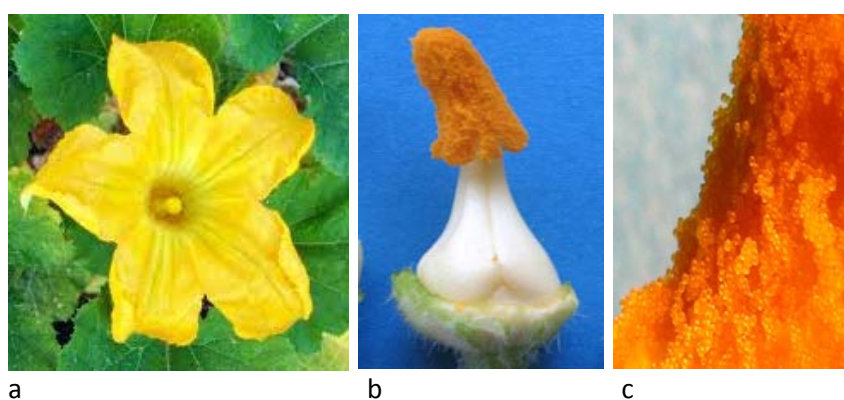


Figura 1. Flor y órganos masculinos de la planta de calabacín. a. Flor masculina de calabacín. b. Cono estaminal de flor masculina. c. Liberación de polen en antesis.

La producción y comercialización del cultivo de calabacín están en clara expansión. Durante los últimos 10 años ha supuesto el cultivo de mayor incremento de la producción hortícola nacional, pues ha aumentado por encima del 30% hasta las 362 mil toneladas en 2009 (MARM, 2010), dedicándose más del 55 % de las mismas a la exportación. Sin embargo, con esta elevada repercusión en la producción no presenta el mismo esfuerzo en desarrollo varietal que otras especies como tomate y pimiento. Una de las principales herramientas para suplir la necesidad de fuentes de variación genética útil son las poblaciones con mutaciones inducidas, con las que la mejora responde a nuevos retos agronómicos tan variados como los cambios en el ambiente de producción y los exigentes requerimientos de calidad de la industria agroalimentaria. Pero la viabilidad de las poblaciones mutantes como fuentes de nuevos materiales para mejora está limitada por la fertilidad de las plantas que las componen, que se ve reducida por las mutaciones en la población (Martin *et al*, 2009). Esta falta de fertilidad difiere dependiendo de la especie a la que se aplique, y en concreto en *Cucurbita pepo* constituye la principal dificultad para establecer la población mutante, pues reduce extremadamente la producción de fruto de la población (Vicente-Dólera *et al*, 2012). En estas

poblaciones, y aunque la flor femenina y la flor masculina no presentaban malformaciones aparentes, el cuajado del fruto se restringe hasta el 10% de toda la población para tratamientos estándar del agente mutante, lo cual se ha asociado a una disminución de la viabilidad de polen.

En general, el estudio de viabilidad del polen es necesario en muchos ámbitos, como es en el caso de las polinizaciones artificiales en programas de mejora genética vegetal (Rodríguez-Riano y Dafni, 2000), para monitorizar los problemas de esterilidad habituales en experimentos de mejora (Dent-Acosta *et al.*, 1995), estudios de incompatibilidad (Dafni y Firmage, 2000), y también, en el estudio de la evolución de ecosistemas (Thomson *et al.*, 1994). Por otra parte, las especies que precisan para la producción de semilla periodos largos de maduración y la determinación de la época de floración óptima, como es el caso del calabacín, encuentran en los métodos de estimación de polen una herramienta imprescindible para optimizar la producción de semillas. El polen de calabacín, a diferencia de la gran mayoría de polen, se clasifica como parcialmente hidratado, es decir, que se dispersa con un alto contenido en agua (cerca de un 50%) (Nepi *et al.*, 2010). En general, este tipo de polen presenta una longevidad muy corta, ya que pierde el agua muy rápidamente, no tolerando la deshidratación por debajo del 24%, por lo que su viabilidad decrece en sólo unas pocas horas desde la anthesis (Gay *et al.*, 1987; Nepi y Paccini, 1993). Aunque es de esperar que un polen tan sensible tenga dificultades para obtener frutos, se ha visto que la planta compensa la pobre viabilidad con dos estrategias adaptativas: evitar la pérdida de agua del polen cuando este se mantiene en la flor durante el periodo de apertura de ésta y potenciar la partenocarpia (Gay *et al.*, 1987).

Como se ha comentado antes, en poblaciones mutantes de calabacín, se ha encontrado una alta correlación de la viabilidad del polen con la capacidad de formación de semillas (Vicente-Dólera *et al.*, 2012). Estos estudios se han llevado a cabo en ensayos con poblaciones de pequeño tamaño utilizando el test de la reacción fluorocromática (FCR) según el protocolo descrito por Heslop-Harrison y Heslop-Harrison (1970). Con estos datos se ha conseguido implementar un protocolo de selección de plantas con mayor fertilidad para su aplicación al desarrollo de poblaciones mutantes más extensas. Para llevar a cabo análisis más extensos, es preciso adaptar de forma específica las técnicas de estimación de viabilidad al polen de esta especie. Con este fin en mente, en este trabajo se ha comparado el test FCR con otro test histoquímico, el test del Tetrazolium (TTC), para la estimación de viabilidad del polen en una variedad de calabacín (*Cucurbita pepo* var Mu-Cu 16), así como en una población mutante que, aunque derivada de ésta, presenta características bien diferentes. Ambos son test histoquímicos que se basan en una reacción colorimétrica enzimática. En el test TTC, el polen se incuba con una sal de tetrazolium (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolium) incolora, que en el interior de granos de polen y por la acción de deshidrogenasas activas, es transformado a formazán, un compuesto rojo (Dafni, 1992). El test FCR, uno de los test de uso más generalizado, evalúa dos propiedades esenciales para los granos de polen viables: la integridad de la membrana plasmática y la presencia de esterasas activas en el citoplasma de la célula vegetativa. La base de este test es que el diacetato de fluoresceína (FDA), molécula no polar que entra libremente en el interior del grano de polen, es hidrolizada a fluoresceína por la acción de esterasas del citoplasma; la fluoresceína es una molécula fluorescente y no polar,

que se acumulará en el citoplasma si la membrana está activa, tiñendo al polen de fluorescente.

Objetivos

Optimizar el uso de técnicas de estimación de viabilidad del polen para el análisis de viabilidad de poblaciones mutantes de calabacín de gran tamaño (más de 2000 individuos), ha requerido los siguientes objetivos:

- 1 Evaluar las ventajas e inconvenientes técnicos de los métodos de estimación de viabilidad de polen en estudio, test FCR y TTC, para el análisis de la viabilidad en poblaciones con un número elevado de individuos (más de 2000).
- 2 Optimizar el tiempo de conservación máximo previo a la determinación de la viabilidad del polen y el tiempo de tinción del polen, en ambos métodos para poder ser aplicados a una población de mutantes de gran tamaño y que permita realizar de forma solvente gran número de test.
- 3 Validación de los protocolos testados en poblaciones mutantes de calabacín que presentan una baja producción de semilla.

Materiales y métodos

El polen de calabacín utilizado para este estudio se obtuvo de dos poblaciones separadas de *Cucurbita pepo* morfotipo zuchinni, un cultivo de la variedad conservada *MU-CU 16* (COMAV), y la población mutante obtenida de aplicar a esta variedad etil-metano-sulfonato (0,5%). Ambas poblaciones se cultivaron en un invernadero del centro IFAPA de “La Mojonera” que presenta control de clima y de riego.

La recogida de muestras se llevó a cabo a las 8 de la mañana, seccionando los conos estaminales de flores masculinas abiertas que se colocaron en tubos eppendorf y estos a su vez en una cámara con atmósfera saturada de humedad.

Los parámetros que se evaluaron fueron dos:

- Variación de la viabilidad del polen durante la conservación previa en cámara húmeda: Para ello se tomó polen de los conos estaminales conservados durante 5, 30, 45, 60 y 90 minutos, y se determinó su viabilidad con ambos test. Se llevaron a cabo tres repeticiones de cada una de las condiciones testadas.
- Variación de la medida de viabilidad con el tiempo de incubación con el sustrato FDA o TTC: en cada una de las muestras anteriores se repitió la determinación de la viabilidad durante el desarrollo de la tinción: 5, 30, 60, 90 y 120 minutos.

En todos los casos el polen se tomaba de los conos estaminales con la ayuda de un pincel y se dispersaba sobre una gota de la solución de tinción correspondiente. En el test TTC se empleó una solución 0,5% de 2,3,5-Trifeniltetrazolium en 0,5 M de sacarosa (Dafni, 1992).

En este test los portaobjetos se colocaron sobre papel de filtro húmedo en el interior de una placa petri y se incubaron en oscuridad a 50°C. En el caso del test FCR, se utilizó una solución de tinción de diacetato de fluoresceína (FDA), preparada a partir de una solución stock de 2 mg/ml de FDA en acetona. Inmediatamente antes de su uso para cada medida, se preparaba solución de tinción fresca añadiendo 0,1 ml de la anterior solución stock en 2 ml de sacarosa 0,5 M (Heslop-Harrison et al., 1984). En este caso los portaobjetos se mantenían a temperatura ambiente.

Una vez pasado el tiempo de incubación las muestras se observaron al microscopio y se determinó el porcentaje de granos de polen viables en cada uno de los test, contándose al menos 300 granos de polen en cada muestra. En el test FCR los granos que presentaban fluorescencia verde fueron considerados viables, frente a los no viables que presentaban un color azulado. En el test TTC los granos de polen viables eran aquellos que presentaban una coloración roja. La observación de las muestras de FCR se realizó en un microscopio Olympus BX-40 provisto de un módulo de luz ultravioleta, tomándose las imágenes con cámara CCD Olympus DP-70 y el programa Olympus Manager. La observación de las muestras de TTC se realizó bajo luz visible en un microscopio Nikon H550S.

Los resultados obtenidos, como porcentaje de viabilidad de polen, fueron estudiados de diferente forma dada la diferente naturaleza de los resultados. En el caso de la viabilidad en poblaciones control, se encontraron diferencias significativamente estadísticas utilizando un test de análisis de varianza, y se compararon los resultados con el test de mínimas diferencias significativas. En el caso de la viabilidad de poblaciones mutantes, los datos no guardaban la homogeneidad necesaria para este tipo de análisis estadístico, por lo que se expresan los datos con la media y la desviación típica de las muestras. Por otra parte, para conseguir un análisis con una menor dispersión de los valores, se agruparon los datos obtenidos en dos conjuntos, uno el de aquellas muestras con viabilidad de polen por encima del 50% y otro con viabilidad del polen por debajo del 50%.

Resultados y discusión

El cultivo de las poblaciones mutantes requiere un alto número de individuos para poder conseguir una máxima representación de variaciones alélicas en el genoma de una especie. Generar variación alélica es relativamente sencillo por métodos químicos, pero para que sea útil debe ser transmisible de generación en generación. Las poblaciones mutantes de calabacín que se han desarrollado en el centro IFAPA de “La Mojonera” presentan una muy baja producción de fruto que impide la transmisión de la mayor parte de la variación genética generada.

En estudios anteriores se comprobó que se podía aumentar la producción de planta mutante de calabacín por medio de una selección previa de plantas con una alta viabilidad de polen. El sistema de análisis de viabilidad del polen es relativamente sencillo, pero el manejo de poblaciones relativamente grandes precisa que los métodos de análisis sean optimizados para una mayor productividad.

Optimización de los métodos de tinción con FCR y TTC en muestras de polen de una población de calabacín control:

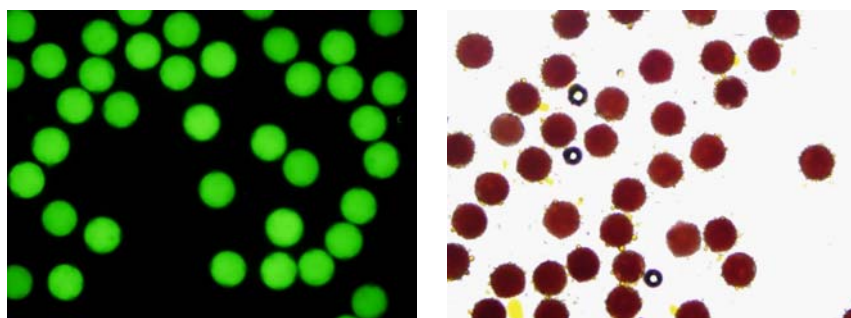
Se han comparado los test de estimación de viabilidad de polen FCR y TTC en la población control, en muestras de polen almacenado en atmosfera saturada de humedad durante distintos periodos de tiempo antes de ser evaluado, y a la vez variando el tiempo de incubación previo a la observación en microscopio. Con esto se pretendía por un lado conocer el tiempo que podemos mantener el polen antes de ser evaluado sin que pierda viabilidad y, por otro lado, establecer el tiempo de incubación óptimo para la determinación de la viabilidad en cada uno de los test. Asimismo, se pudo estudiar también si interaccionaban los efectos de conservación previa y tiempo de incubación.

El polen de las plantas de calabacín control recogidos al principio del periodo de antesis de la flor, presentaron una gran homogeneidad en los valores de viabilidad inicial que fue muy alta en general alrededor del 98%, evaluados con ambos test (Tabla I; Fig. 2). Otros autores han descrito valores similares de viabilidad en el polen de calabacín al inicio de la antesis utilizando el test FCR (Nepi et al., 2001).

Tabla I: Comparación de la viabilidad de muestras de polen de calabacín de la variedad MUCU 16 sometidas a conservación en cámara saturada de humedad entre 5 y 90 minutos y con tiempos de incubación crecientes de entre 5 y 120 minutos, mediante el test FCR y el test TTC.

		Tiempo de conservación previo									
		5 min		30 min		45 min		60 min		90 min	
	Tiempo Incubación	$\bar{X} \pm \sigma$		$\bar{X} \pm \sigma$		$\bar{X} \pm \sigma$		$\bar{X} \pm \sigma$		$\bar{X} \pm \sigma$	
FCR	5 min	98,68±0,13	AB	98,19±0,04	ABC	98,79±0,00	ABC	97,69±0,14	BC	96,60±0,15	DE
	30 min	98,92±0,01	A	98,89±0,03	A	98,51±0,15	ABC	97,89±0,76	ABC	96,40±0,11	EF
	60 min	97,99±0,48	ABC	98,29±0,07	ABC	98,37±0,07	ABC	98,06±0,01	ABC	95,37±0,18	E
	90 min	97,66±0,02	BCD	97,56±0,45	CD	98,47±0,29	ABC	97,61±0,25	BCD	96,34±0,44	EF
	120min	96,07±0,29	EF	97,66±0,16	BCD	97,65±0,38	BCD	98,02±0,02	ABC	95,71±0,08	EF
TTC	5 min	98,91±0,26	A	98,71±0,20	ABC	98,54±0,15	ABC	98,86±0,23	AB	98,31±0,28	ABCD
	30 min	98,65±0,15	ABC	98,69±0,08	ABC	97,90±0,40	ABCD	98,72±0,10	ABC	98,49±0,38	ABC
	60 min	98,62±0,11	ABC	97,48±0,47	CD	97,90±0,77	ABCD	98,26±0,69	ABCD	97,70±0,41	ABCD
	90 min	97,86±0,76	ABCD	97,95±0,57	ABCD	97,73±0,86	ABCD	97,57±0,77	BCD	98,32±0,19	ABCD
	120min	98,23±0,17	ABCD	98,19±0,38	ABCD	97,70±0,53	ABCD	97,57±0,79	BCD	97,04±1,03	D

Valores seguidos de distinta letra denotan significación estadística para un p-valor < 0,05 (LSD test)



a.

b.

Figura 2: Tinción de granos de polen viables de la variedad MUCU16. a. Tinción FCR. b. Tinción TTC.

Dependiendo del test empleado, el efecto del tiempo de conservación previo sobre la viabilidad fue ligeramente diferente. La conservación del polen en condiciones de saturación de humedad parece provocar una leve disminución del polen viable de las muestras tratadas en el test FCR. Es decir, hay una ligera tendencia de reducción de viabilidad a lo largo del tiempo desde las primeras medidas de viabilidad tomadas a cada una de las muestras, de forma que a mayor tiempo de conservación, menor proporción de polen viable (Tabla I). Sin embargo, esta reducción fue ligera, y no se encontró una disminución estadísticamente significativa hasta las muestras que se habían teñido tras 90 minutos de conservación previa, y si bien, siguieron mostrando valores muy elevados de viabilidad. Nepi et al. (2010), evaluando la viabilidad con el test FCR en polen de calabacín, encuentran también valores muy altos, alrededor del 90% en antesis, y observan una reducción de la viabilidad con el tiempo de conservación que depende de la humedad relativa de conservación. Así el polen conservado a 75% HR mantiene valores del 80% de viabilidad a los 90 minutos, mientras que conservado a 30%HR, en este mismo tiempo la viabilidad cae a valores del 40%. De la misma forma, los resultados de tinción con TTC tras diferentes tiempos de conservación previa, presentan diferencias aún menores que las resultantes con el método FCR, y no llega a mostrar diferencias significativas.

Respecto a las determinaciones de viabilidad realizadas a lo largo del tiempo de tinción, tanto en FCR y TTC, ya a los cinco minutos de incubación se obtuvieron los valores máximos de viabilidad, que permanecieron prácticamente constantes hasta los 120 minutos. El tiempo de incubación previo a la observación de las muestras de polen para el test FCR varía según autores y especies, entre los 10 minutos y 30 minutos (Dafni et al., 2005, Heslop-Harrison, 1992). Este sería el tiempo mínimo requerido para que la reacción fluorocromática tenga lugar. Sin embargo, en nuestro estudio en el periodo inicial entre 5 y 30 minutos no aparecieron diferencias en el porcentaje de partículas teñidas, lo que coincide también con lo encontrado para polen de olivo y chirimoyo (Pinillos y Cuevas, 2008). Al igual que en el test FCR, las muestras evaluadas con TTC, mostraron ya los valores máximos tras un periodo de

incubación de sólo cinco minutos, lo que contrasta grandemente con el periodo de incubación recomendado para otras especies que suele llegar a los 120 minutos (Dafni, 1992).

Uno de los problemas que se suele achacar al test FCR, es la rápida pérdida de la tinción lo que reduce el tiempo útil para evaluar las muestras preparadas (Pinillos y Cuevas, 2008). Esto es debido a que la fluoresceína, aunque lentamente, va saliendo del grano de polen con el tiempo, haciendo el medio cada vez más verde y haciendo difícil discriminar entre granos de polen viables y no viables (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1970). En este sentido, en olivo se recomienda no evaluar las muestras tras 60 minutos desde su preparación ya que muchos granos de polen pierden su fluorescencia pasado este tiempo, pudiendo llevar a medidas erróneas (Pinillos y Cuevas, 2008). Sin embargo, en nuestro trabajo, las medidas de viabilidad se mantuvieron sin diferencias significativas hasta los 90 min de incubación, y sólo descendieron ligeramente a los 120 minutos. En otras especies como el chirimoyo también se ha descrito un mantenimiento mayor de la fluorescencia en el grano de polen (Pinillos y Cuevas, 2008). Las diferencias en este sentido deben estar probablemente relacionadas con diferencias en propiedades específicas de la membrana plasmática entre especies.

Según los resultados anteriores, en concreto los valores altos de viabilidad mantenidos hasta prácticamente 90 minutos de almacenamiento, suponen que se puede determinar la viabilidad de una muestra de polen de calabacín recogido cercano a la antesis, al menos durante los 90 minutos posteriores, si éste es mantenido en condiciones de atmosfera saturada de humedad. Asimismo, la determinación de la viabilidad de una muestra de polen preparada en cualquiera de los dos test puede ser realizada con garantías hasta al menos 90 minutos tras su preparación. Los valores de viabilidad obtenidos así como el comportamiento similar en el tiempo que ha tenido el test TTC respecto al test FCR, hacen a ambos test igualmente idóneos para la estimación de viabilidad de polen de calabacín. Una ventaja para el test TTC sería la no necesidad de microscopios de fluorescencia.

Análisis de los métodos de tinción con FCR y TTC en muestras de polen de poblaciones mutantes de calabacín

El mismo diseño experimental que se ha usado en plantas control se ha aplicado a la población de mutantes de calabacín, para valorar si la estimación de la viabilidad del polen se ve alterada por la conservación previa en atmósfera saturada de humedad o el tiempo de tinción. A diferencia de la población control, la estimación de viabilidad fue muy variable entre las muestras que se escogían al azar, y aparecían muchos más granos de polen no viables (Fig 3) y la proporción de viabilidad fue siempre inferior al del polen de la población control (Tabla I y II). Al ser la muestra tan heterogénea, con valores muy distantes, y dado que el dato de viabilidad del polen se obtenía después del análisis, se amplió el número de muestras a analizar y se agruparon por el porcentaje de viabilidad inicial de las mismas, para disminuir la dispersión de datos: por debajo del 50% de viabilidad y por encima de este porcentaje (Tabla II). En este sentido, la poca homogeneidad de estas muestras ha impedido hacer un análisis de la varianza como el llevado a cabo en muestras control, aunque si se ha hecho un estudio descriptivo de los datos obtenidos. Además, la comparación de las muestras con diferente tiempo de conservación previo en humedad saturada muestra diferencias que en principio se

deben a diferencias en los porcentajes iniciales de viabilidad de las muestras obtenidas. Sin embargo, al igual que en el polen de la población control, los valores de viabilidad, aunque con una gran variabilidad entre muestras parecen mantenerse más o menos constantes, durante los 90 minutos de conservación en atmósfera saturada de humedad.

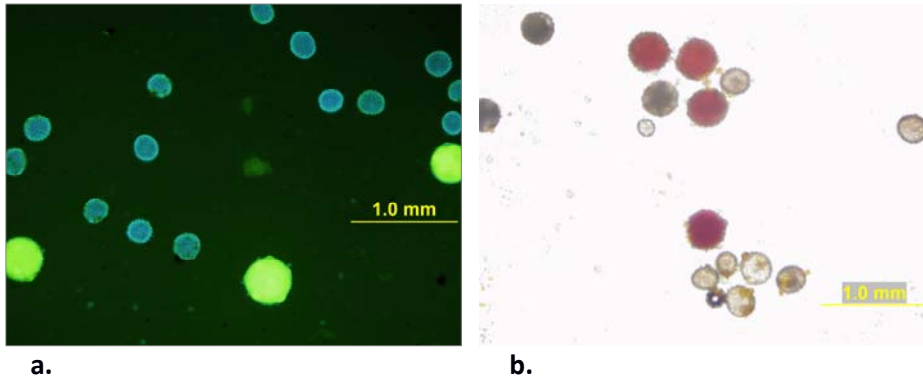


Figura 3: Muestras de polen de plantas mutantes de calabacín tratadas con el método FCR y TTC. a. Los granos viables emiten fluorescencia amarilla. b. Los granos viables adquieren color rojo.

Sin embargo, cuando se compara los valores de viabilidad determinados en unas mismas muestras en tiempos crecientes de incubación, se observó un comportamiento muy diferente con los resultados obtenidos en el polen de la población control. En este caso, en el test FCR se observó una disminución de la viabilidad considerable a lo largo del tiempo, tanto en el caso del polen con viabilidad inicial alta como en el de viabilidad baja. En el polen de la población mutante, el test TTC las medidas a lo largo del tiempo de incubación presentaron una menor variación de viabilidad que las obtenidas con el test FCR (Tabla II). En este sentido se confirma la mayor estabilidad en el tiempo de esta coloración respecto al FCR, si bien, y como ya se comentó en el caso de la población control apenas hay diferencias en la viabilidad entre los distintos tiempos de incubación con ninguno de los test. Este descenso de los valores de viabilidad obtenidos a lo largo del tiempo de incubación en esta población, podría limitar el tiempo disponible para la observación de las muestras del polen preparadas con FCR, haciendo por tanto, más aconsejable proceder a la evaluación de la viabilidad bajo microscopio en los primeros minutos después de su preparación.

La evolución de la fluorescencia de los granos de polen de calabacín control, que es muy estable, se ve muy modificada por los cambios en el genoma que suponen las mutaciones. Dado que la respuesta del polen a los test de estimación de viabilidad no es homogénea en la población mutante, se deduce que la introducción de mutaciones al azar en la población de calabacín puede alterar las interacciones vitales del grano de polen y provocar efectos en la viabilidad y en otras propiedades del mismo. Las mutaciones se producen al azar y la viabilidad del polen puede verse alterada por cambios muy diversos que pueden modificar la ultraestructura, el desarrollo de orgánulos, etc., y estos cambios de distinta naturaleza pueden suponer diferencias en la respuesta del grano de polen durante su permanencia en la cámara de ambiente húmedo.

Tabla II: Comparación de la viabilidad de muestras de polen de calabacín mutante sometidas a conservación en cámara saturada de humedad entre 5 y 90 minutos y con tiempos de incubación crecientes de entre 5 y 120 minutos, mediante el test FCR y el test TTC.

		Viabilidad superior al 50%					Viabilidad inferior al 50%				
		Tiempo de conservación previo					Tiempo de conservación previo				
		5 min	30 min	45 min	60 min	90 min	5 min	30 min	45 min	60 min	90 min
	Tiempo Incubación	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$	$\bar{X} \pm \sigma$
FCR	5 min	83,57±11,74	78,76±14,87	78,02 ±17,28	77,16±8,25	87,82±7,67	38,09±18,84	35,33±14,79	31,31±18,02	38,35±18,86	35,07±10,82
	30 min	74,67±11,71	77,10±18,36	66,25±20,27	69,68±14,03	81,39±12,67	19,82±2,48	34,41±11,60	26,02±22,07	35,88±14,49	28,17±9,02
	60 min	74,34±16,02	74,28±14,71	62,90±19,81	59,85±25,96	80,94±12,39	14,88±3,23	31,60±12,95	20,00±22,56	27,95±6,29	29,41±6,26
	90 min	64,60±29,52	67,34±13,70	62,05±19,52	56,65±23,88	80,00±15,98	11,17±2,14	25,97±13,85	15,25±17,87	30,22±7,89	21,87±7,64
	120min	59,18±34,03	59,17±17,89	57,96±21,15	55,13±23,77	69,97±21,17	9,31±4,04	26,40±11,74	12,37±13,62	20,64±12,03	17,87±9,10
TTC	5 min	72,15±17,45	68,29±21,08	71,98±11,34	62,31±11,85	73,93±12,85	37,96±7,31	34,44±3,24	24,65±6,36	24,01±14,22	29,45±12,34
	30 min	74,22±6,16	78,12±8,13	72,23±5,90	74,42±8,34	57,81±16,97	27,77±8,09	28,49±6,18	19,66±9,70	19,87±11,43	25,43±17,39
	60 min	73,74±6,18	70,49±2,03	70,67±3,49	68,57±7,63	53,45±24,97	24,29±4,24	29,50±4,76	19,96±9,26	16,21±8,34	23,19±10,60
	90 min	72,97±6,66	65,98 ± 4,75	66,60 ± 4,54	61,59±7,74	55,39 ± 15,71	23,94±7,13	25,60±6,48	19,65±5,93	13,11±7,81	21,51±12,82
	120min	65,99±16,00	64,15±2,70	58,56±3,61	56,17±9,07	53,74±18,09	20,79±8,09	21,30±6,31	17,73±4,13	11,34±5,61	20,80±10,07

Conclusiones

1. Los dos métodos de estimación de viabilidad del polen utilizados, FCR y TTC, presentan valores de viabilidad similares en polen de calabacín, pero el método TTC es más accesible porque no precisa fluorescencia.
2. Las poblaciones mutantes de calabacín presentan una enorme heterogeneidad en términos de viabilidad de polen, con una gran disminución de viabilidad respecto al control
3. El polen de calabacín control muestra que el tiempo de conservación previo en condiciones de saturación de humedad, puede alargarse hasta los 90 minutos sin encontrar disminución significativa de viabilidad
4. En cuanto al tiempo de incubación en ambos test, la viabilidad del polen se mantiene prácticamente constante entre los 5 y 120 minutos.
5. Para evaluar la viabilidad del polen en poblaciones de elevado número de individuos mutantes sugerimos aplicar como test más resolutivo el TTC, pudiendo mantener el polen conservado hasta unos 90 minutos en cámara húmeda, y realizando la observación de las muestras preparadas a partir de los 5 minutos de incubación.

|

Bibliografía

- Dafni A y Firmage D. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Syst. Evol.* 222:113-132.
- Dafni A, Pacini E y Nepi M. 2005. Pollen and stigma biology. En: *Practical Pollination Biology*. Enviroquest Ltd, Cambridge. Pp:83-146.
- Dafni A. 1992. *Pollination ecology: a practical approach*. Ed.: Rickwood D y Hames BD. IRL Press.
- Dent-Acosta SJ, Stone JL y Thomson JD. 1995. Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: a review. *American Journal of Botany*. 82:1186–1197
- Digonnet-Kerhoas C, Gay G, Duplan J y Dumas C. 1989. Viability of *Cucurbita pepo* Pollen: biophysical and structural data. *Planta*, 179:165-170.
- Gay G, Kerhoas C y Dumas C. 1987. Quality of a stress-sensitive *Cucurbita pepo* L Pollen. *Planta*. 171:82-87
- Heslop-Harrison J y Heslop-Harrison Y. 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence, intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technology* 45:115-120
- Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y y Shivanna KR. 1984. The evaluation of pollen quality and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theoretical and applied genetics*. 67: 367-375.
- Heslop-Harrison JS. 1992. Cytological techniques to assess pollen quality. In: *Sexual Plant Reproduction*. Springer-Verlag. 41-48
- Martín B, Ramiro M, Martínez-Zapater JM y Alonso-Blanco C. 2009. A high-density collection of EMS-induced mutations for TILLING in *Landsberg erecta* genetic background of *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 9:147.
- Nepi M y Pacini E. 1993. Pollination, Pollen Viability and Pistil Receptivity in *Cucurbita pepo*. *Annals of Botany* 72:527-536.
- Nepi M, Cresti M, Guarnieri y Pacini E. 2010. Effect of relative humidity on water content carbohydrate profile of *Petunia hybrida* and *Cucurbita pepo* pollen. *Plant Syst Evol* 284:57-64.
- Nepi M, Franchi GG y Pacini E. 2001. Pollen hydration status at dispersal: cytophysiological features and strategies. *Protoplasma* 216:171-180
- Pinillos V y Cuevas J. 2008. Standardization of the fluorochromatic reaction test to assess pollen viability 83:1, 15-21
- Rodríguez-Riano T y Dafni A. 2000. A new procedure to assess pollen viability. *Sex Plant Reprod* 12:241–244.
- Thomson JD, Rigney LP, Karoly KM y Thomson BA .1994. Pollen viability, vigor, and competitive ability in *Erythronium grandiflorum* (Liliaceae). *Am J Bot* 81:1257–1266
- Vicente-Dólera N, Pinillos V, Moya M, Rubira F, Martínez-Valdivieso D, Del Río-Celestino M, Román B y Gómez P. 2012. Early viability assessment in mutant populations of *Cucurbita pepo*. *Cucurbitaceae 2012: X EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae*. 50-55. Turkey.