

**Evaluación de la viabilidad del polen
almacenado de genotipos de arándano
(*Vaccinium* spp.)**

Ixchel Manuela Hernández Ochoa

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2010

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

**Evaluación de la viabilidad del polen
almacenado de genotipos de arándano
(*Vaccinium* spp.)**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera Agrónoma en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por

Ixchel Manuela Hernández Ochoa

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2010

Evaluación de la viabilidad del polen almacenado de genotipos de arándano (*Vaccinium* spp.)

Presentado por:

Ixchel Manuela Hernández Ochoa

Aprobado:

Juan Carlos Rosas, Ph.D.
Asesor principal

Abel Gernat, Ph.D.
Director
Carrera de Ciencia y Producción
Agropecuaria

Nils Berger, Dr. Sc. Agr.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Abelino Pitty, Ph.D.
Coordinador de Fitotecnia

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

RESUMEN

Hernández, I. Evaluación de la viabilidad del polen almacenado de genotipos de arándano (*Vaccinium* spp.). Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería Agronómica, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 17p.

Los arándanos pertenecen al género *Vaccinium* de la familia Ericaceae, y a la sección Cyanococcus. El arbusto alto es un híbrido derivado de *V. corymbosum* y otras especies de *Vaccinium*, que han sido seleccionadas por sus bajas exigencias de periodos con bajas temperaturas durante el invierno. Generalmente, el polen utilizado para las cruza es recolectado y utilizado en el momento de las cruza o algunos días después. Sin embargo, teniendo en cuenta la fenología de la floración en las especies, algunas de estas fuera de la sección Cyanococcus, que presentan diferentes tiempos de floración, se hace necesario buscar un método eficiente y práctico para medir la viabilidad del polen almacenado. El objetivo de este estudio fue encontrar un método para verificar la efectividad del almacenamiento y conservación de polen de arándanos (*Vaccinium* spp.), para su utilización en hibridaciones entre selecciones en las que el período de floración no coinciden. Se realizaron tres ensayos, un ensayo preliminar para conocer la variabilidad de este carácter en el reservorio genético con el que se cuenta en el programa. Un segundo ensayo (ensayo 1) para evaluar el método más eficiente para medir la viabilidad del polen almacenado, utilizando dos pruebas de tinción, la de Acetocarmín, la cual mide el potencial de la viabilidad del polen, y el método de Tetrazolio, que ha mostrado una buena correlación con la germinación *in vitro* del polen. El tetrazolio detecta la presencia de la dehidrogenasa, una enzima producto de la respiración celular. Para la evaluación directa de la germinación de polen (tubo polínico y tétrada) se utilizó la metodología de Brewbaker y Kwack, la cual simula el exudado estigmático. Los genotipos utilizados para este ensayo fueron las selecciones 06-362, 06-562, CO3-87 y 08-508. El ensayo 2 se condujo para evaluar la viabilidad del polen con el método de Tetrazolio hasta las 16 semanas de almacenado; los genotipos utilizados para este ensayo fueron las variedades Jewel y Emerald, y las selecciones 06-362 y 08-508. En el ensayo preliminar, se pudo identificar que 50% de los genotipos tenían alta viabilidad, 27% viabilidad media y 23% viabilidad baja. En el ensayo 1, se determinó que el método más eficiente fue el del tetrazolio ($P=0.000$). En el ensayo 2, no se encontraron diferencias significativas ($P=0.24$) en la viabilidad del polen almacenado de los cuatro genotipos a lo largo de las 16 semanas.

Palabras clave: Acetocarmín, polen almacenado, tetrazolio, tinción, *Vaccinium corymbosum*.

CONTENIDO

Portadilla.....	ii
Página de firmas	iii
Resumen	iv
Contenido	v
Índice de cuadros	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4. CONCLUSIONES	14
5. RECOMENDACIONES	15
6. LITERATURA CITADA.....	16

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Viabilidad de polen de genotipos de arándano con el método de Tetrazolio.	7
2. Efectos de los métodos y los genotipos en la viabilidad del polen de cuatro genotipos de arándano.	9
3. Efectos de la interacción Método × Genotipo en la germinación de polen de cuatro genotipos de <i>Vaccinium</i>	9
4. Efectos del método y del genotipo en la viabilidad del polen en la semana 0 (antes de ser almacenado) de cuatro genotipos de arándano.	10
5. Efectos de la interacción método × genotipo en la viabilidad de polen de cuatro genotipos de arándano.	11
6. Cuadro resumen de la viabilidad del polen de los cuatro genotipos utilizados hasta las 16 semanas de almacenamiento.	11
7. Efecto de los métodos y genotipos en la viabilidad del polen a las 16 semanas de almacenamiento.	12
8. Cuadro resumen de la viabilidad de polen de los genotipos almacenados a -20°C durante las 16 semanas.	13

1. INTRODUCCIÓN

Los arándanos pertenecen a la familia Ericaceae del género *Vaccinium.*, de la sección Cyanococcus. Algunas especies de importancia económica en esta familia incluyen las azaleas (género *Rhododendron*) y frambuesas (género *Vaccinium*).

Los arándanos cultivados incluyen una gama de diferentes especies incluyendo las de arbusto bajo (*V. angustifolium*), la cual es nativa del noreste de Estados Unidos y partes de Canadá; arbusto alto (*V. corymbosum*) nativo de Michigan al este de Nueva Escocia; y rabbiteye (*V. virgatum*) distribuido en la parte sur de Georgia y el norte de Florida de Estados Unidos (Camp, 1945). El arbusto alto es un híbrido derivado de *V. corymbosum* y otras especies de *Vaccinium* que ha sido seleccionado por sus exigencias de bajas temperaturas durante el invierno (Darnell 2006).

En 1975, la Universidad de Florida desarrolló los primeros cultivares de arbusto alto de arándanos para la zona sur de Florida. Como resultado, se han liberado 30 cultivares que han sido desarrollados por el programa de mejoramiento de esta universidad. Los objetivos del programa de mejoramiento son el desarrollo de variedades que amplíen el período de madurez en el frío bajo las condiciones de temperatura del cultivo, con una mejor supervivencia en las condiciones de crecimiento de la Florida. En la actualidad, el programa de mejoramiento emplea un método de selección recurrente con aproximadamente 100 selecciones usadas como padres en cada ciclo de cruce. Estos padres son básicamente de selecciones avanzadas dentro del programa de mejoramiento. También se incluyen algunos cultivares y especies afines de *Vaccinium*.

Generalmente el polen utilizado para las cruza en el programa de mejoramiento es recolectado y utilizado en el momento de las cruza, o a los pocos días. Sin embargo, teniendo en cuenta la fenología de la floración en las diferentes especies, algunas de estas fuera de la sección Cyanococcus, se presentan diferentes tiempos de floración. Por ejemplo, selecciones silvestres de *V. arboreum*, una especie de la sección Batodendron, tienden a tener un período de floración más tardío y prolongado en comparación con el arbusto alto del sur. Por lo que sería deseable poder almacenar el polen a largo plazo, para que estén disponibles para su uso en otras especies de floración tardía.

Existen diferentes métodos para recolectar polen, algunos de estos son el cepillado de polen, en el cual se cepillan las flores frescas emasculadas con anteras dehiscentes, separar las anteras dehiscentes de la planta, secarlas y luego utilizar el polen para polinizar otras flores. En las especies *Vaccinium*, el método de extracción de la flor individual es el más utilizado, este método consiste en tomar la flor y agitarla sobre una superficie lisa para tomar el polen. La cantidad y calidad de polen recolectado depende de las especies

vegetales, el genotipo, la estación, temperatura, humedad, hora del día y la luz (Stanley y Linskens, 1974). El polen se recoge de las flores recién abiertas en superficies planas o en los contenedores como platos Petri (Galletta, 1983).

Muchas de las especies que comprenden el nivel secundario y terciario del reservorio genético disponible para los cultivares de arándanos tienen diferentes niveles de ploidía, por lo que se deben duplicar artificialmente o coleccionar suficiente polen para hacer posible la hibridación. Por lo tanto, se hace necesario una prueba de rutina de viabilidad de polen para su uso en diversas especies de *Vaccinium* en el programa de mejoramiento. Además, a medida que los arándanos se cultivan en el hemisferio sur, existe la oportunidad para el intercambio de polen con especies de la parte norte de Estados Unidos y Canadá de diferente tiempo de floración.

Hay diferentes métodos para evaluar la viabilidad del polen, los cuales miden el porcentaje de germinación, crecimiento y estimación del grado de fertilidad del grano de polen. El Método Directo se prefiere al Método Indirecto ya que las pruebas de tinción pueden sobrestimar o subestimar la viabilidad, debido a que el polen puede tener suficientes enzimas para aceptar la tinción (Galletta 1983). Otro problema es que algunas tinciones no se encuentran fácilmente disponibles en los laboratorios. Para la evaluación directa de germinación de polen se puede lograr utilizando la metodología de Brewbaker y Kwack (1963). Este ensayo simula el exudado estigmático y proporciona un sustrato para que la germinación del polen se lleve a cabo; posteriormente, se hace un conteo de los tubos polínicos y su extensión.

El objetivo del siguiente trabajo fue encontrar un método eficiente para verificar la efectividad del almacenamiento y conservación de polen de arándanos (*Vaccinium* spp.), para su utilización en hibridaciones entre selecciones en las que el período de floración no coinciden. Para llegar a este objetivo se identificó el método más adecuado para medir la viabilidad del polen para el arándano (*V. corymbosum*), con el método más efectivo se midió la viabilidad del polen en cuatro genotipos de arándano (*V. corymbosum*) y finalmente se midió la pérdida de viabilidad del polen en almacenamiento durante 16 semanas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ENSAYO PRELIMINAR: VARIACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL POLEN DE GENOTIPOS DE *VACCINIUM*.

Se realizó un ensayo preliminar de la viabilidad de polen con el método de tetrazolio (solución al 1% bromuro de 2,5-difenil tetrazolio en 5% de sucrosa) en 47 genotipos de *Vaccinium*, para conocer las variaciones de esta característica de esta colección, y seleccionar los genotipos más adecuados para pruebas posteriores.

Se recolectaron 100 mg de polen de cada genotipo para la evaluación. Las plantas de los genotipos para las cruces se encuentran bajo invernadero y a una temperatura de 18°C con baja humedad relativa.

2.2 ENSAYO 1: EVALUACIÓN DE MÉTODOS PARA MEDIR LA VIABILIDAD DE POLEN ALMACENADO.

Se evaluaron tres métodos para medir la viabilidad de polen almacenado de los genotipos de *Vaccinium*, estos fueron:

1. Medio de germinación de polen (MGP tubo polínico y MGP Tétrada) utilizando el medio de germinación de Brewbaker y Kwack (1963). La solución consistió en agar con 10% de sucrosa, 100 ppm de H_3BO_3 , 300 ppm de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 200 ppm de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 100 ppm de KNO_3 . El medio se colocó en platos Petri, añadiéndose 100 granos de polen por plato y se taparon para evitar evaporación del medio. Los platos se dejaron reposar durante cuatro horas en una incubadora a 25° C, para luego realizar el conteo de los tubos polínicos germinados. En el MGP tubo polínico, el conteo se realizó tomando como viables sólo los granos de polen que han germinado; en el MGP tétrada se consideraron viables los cuatro granos cuando la tétrada tuviera al menos un grano de polen germinado.

2. Evaluación de la viabilidad con agua pura. El agua pura es utilizada como sustituto de la tinción de acetocarmín, ya que se puede lograr un efecto similar al de la mezcla de la tinción. El conteo para esta prueba se puede realizar al momento de aplicar el agua. El conteo se realizó contando cada grano de polen.

3. Método de tetrazolio (bromuro de 2,5-difenil tetrazolio). La solución de prueba consiste en una concentración de 1% de 2,5 - bromuro difenil de tetrazolio (o tiazolil) diluidos en una solución de sacarosa al 5%. El polen se considera viable cuando se vuelve color rosa

intenso o si se presenta líneas irregulares negras sobre la superficie (Rodríguez y Dafni 2000). Se colocó una gota de la tinción en una lámina porta-objetos, se agregaron aproximadamente 100 granos de polen, se esperó de 7 a 10 minutos para su lectura. El conteo se realizó con cada grano de polen.

Se recolectaron 500 mg de polen de cuatro genotipos de *Vaccinium*: tres de alta viabilidad (06-362, 06-562 y CO3-87) y uno de viabilidad media (08-508). Para cada genotipo se midió el porcentaje de viabilidad con cada uno de los tres métodos utilizando tres repeticiones. Se utilizó un control negativo el cual fue polen muerto por tratamiento térmico (80° C durante 4 horas).

El mejor método fue determinado por la confiabilidad, practicidad, precisión y el tiempo necesario para analizar la muestra.

2.3 ENSAYO 2: VIABILIDAD DE POLEN ALMACENADO DE VACCINIUM CON EL MÉTODO DE TETRAZOLIO.

Se evaluó la viabilidad del polen almacenado de las variedades Jewel y Emerald, y las selecciones 06-362 y 08-508, utilizando el mejor del ensayo 1. Se recolectaron 500 mg de polen de plantas bajo condiciones de invernadero. Posteriormente, las muestras de polen fueron almacenadas en seco en tubos de micro centrífuga a -20° C. Los tubos fueron depositados en un recipiente con drierita desecante, la cual absorbe la humedad evitando el exceso de humedad relativa en los tubos. Finalmente, se cuantificaron las diferencias relativas entre genotipos de *Vaccinium* para la viabilidad del polen.

Se evaluó la viabilidad de polen por cinco semanas consecutivas, una vez por semana y una prueba final a las 16 semanas. En la semana de inicio (semana 0) y la última semana (semana 16) se emplearon tres pruebas: Tetrazolio, medio de germinación de polen con conteo de tétrada (MGP tétrada) y germinación del tubo polínico con conteo del tubo polínico (MGP tubo polínico). En las semanas 1, 2, 3, 4 y 5, sólo se usó el método de tetrazolio para medir la viabilidad del polen almacenado.

2.4 VARIABLES MEDIDAS

Medición del porcentaje de viabilidad del polen de 47 genotipos de *Vaccinium* con el método de tetrazolio. Se contó cada grano de polen de la tétrada (ensayo preliminar).

Medición del porcentaje de viabilidad del polen de tres selecciones de *Vaccinium* con cuatro métodos. Se contó cada grano de polen de la tétrada (ensayo 1 y 2).

Medición del porcentaje de viabilidad del polen almacenado de los cuatro genotipos de *Vaccinium* con el método de tetrazolio por 5 semanas consecutivas, una vez por semana y la prueba final a las 16 semanas.

2.5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

2.5.1 Ensayo preliminar: Variación de la viabilidad del polen almacenado en *Vaccinium*.

No se utilizó un diseño específico ya que no se tuvieron repeticiones. Se determinaron las variables estadísticas promedio, mínimo, máximo, varianza y desviación estándar de los datos del porcentaje de viabilidad de polen en las muestras de los 47 genotipos de *Vaccinium*.

2.5.2 Ensayo 1: Métodos para medir la viabilidad de polen almacenado.

Se utilizó un arreglo factorial 3×3 (tres métodos y tres genotipos) distribuidos en Bloques Completamente al Azar (BCA) con tres repeticiones. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con separación de medias por Tukey HSD de los datos, con un valor $P \leq 0.05$ utilizando el programa estadístico Statistix® para determinar diferencias entre los tratamientos. La primera comparación fue entre los métodos de agua pura (sustituto de Acetocarmín), Tetrazolio y Medio de germinación de polen (MGP). Los factores del experimento fueron los genotipos (fuente de polen) y los métodos para medir la viabilidad del polen. Se buscaron diferencias significativas entre los métodos, genotipos, y la interacción Método \times Genotipo.

2.5.3 Ensayo 2: Viabilidad de polen almacenado de *Vaccinium* con el método de Tetrazolio.

Se utilizaron cuatro genotipos y tres repeticiones distribuidos en un diseño de Bloques Completos al Azar (BCA). Cada semana se analizaron los datos de viabilidad por separado con ANOVA. Para el análisis, se hizo uso del programa estadístico Statistix®.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ENSAYO PRELIMINAR: VARIACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL POLEN FRESCO EN GENOTIPOS DE *VACCINIUM*.

Los resultados del análisis de la viabilidad del polen de los 47 genotipos de arándano del programa de mejoramiento de la Universidad de Florida, se presenta en el Cuadro 1. Los resultados permitieron identificar que 50% de los genotipos tenían alta viabilidad (75-100%), 27% con viabilidad media (50-75%), y 23% con viabilidad baja (<50%). Los datos de viabilidad de polen presentaron una variabilidad amplia (desviación estándar de 38.7%). Este rango se debe a la variación genética con que se cuenta en esta colección; ya que entre las accesiones se incluyen variedades mejoradas, selecciones de cruce e híbridos resultantes de cruces interespecíficos e intraespecíficos.

En esta colección de arándanos se observó un promedio de 67% de viabilidad. Los genotipos de mayor viabilidad fueron Farthing (variedad mejorada), CO3-87 y 09-216 (selecciones de cruce entre accesiones de *V. corymbosum*) con 96% de viabilidad. El menor porcentaje de viabilidad se encontró en los híbridos de *V. corymbosum* × *V. arboreum*, incluyendo a las accesiones 10-506, 08-449 y 08-441 con 9%, 10% y 12% de viabilidad, respectivamente. De acuerdo a estos resultados, se escogieron los genotipos para el siguiente ensayo.

Cuadro 1. Viabilidad de polen de genotipos de arándano con el método de Tetrazolio.

Genotipo	Procedencia	Viabilidad (%)	Genotipo	Procedencia	Viabilidad (%)
Farthing	Variedad	96	08-453	Híbrido	70
CO3-87	Selección	96	08-444	Híbrido	69
09-216	Selección	96	08-498	Híbrido	68
06-778	Selección	95	06-503	Híbrido	67
Windsor	Variedad	94	08-508	Híbrido	63
Sunshine	Variedad	94	04-103	Híbrido	61
04-173	Selección	94	08-503	Híbrido	61
08-400	Selección	93	96-43	Híbrido	56
01-173	Selección	93	08-445	Híbrido	55
10-545	Selección	92	08-468	Híbrido	53
08-404	Selección	92	10-513	Híbrido	52
05-185	Selección	92	08-467	Híbrido	52
Jewel	Variedad	91	08-454	Híbrido	48
Emerald	Variedad	91	08-440	Híbrido	44
08-539	Selección	91	06-561	Híbrido	40
04-245	Selección	91	08-463	Híbrido	39
06-362	Selección	89	08-502	Híbrido	37
09 39	Selección	80	10-507	Híbrido	27
08-539	Selección	80	10-514	Híbrido	25
06-562	Selección	80	10-510	Híbrido	22
05-603	Selección	80	08-441	Híbrido	12
10-516	Selección	76	08-449	Híbrido	10
03-291	Selección	76	10-506	Híbrido	9
06-740	Selección	73			
Promedio			68%		
Desviación estándar			26%		

3.2 ENSAYO 1: MÉTODOS PARA MEDIR LA VIABILIDAD DE POLEN.

De acuerdo a los resultados del ensayo preliminar, se evaluaron los genotipos de viabilidad alta 06-362,06- 562 y CO3-87 (*V. corymbosum* × *V. corymbosum.*), y el de viabilidad media 08-508 (*V. corymbosum* × *V. arboreum*), con tres métodos: medio de germinación de polen (MGP tubo polínico), agua pura y tetrazolio.

Para la MGP tubo polínico se utilizó agua como base del medio para mezclar con los demás componentes; sin embargo no se logró observar ningún crecimiento en el tubo polínico por lo que se procedió a utilizar agar como base para el medio, este sí dio el

resultado esperado de germinación. Esto concuerda con el estudio de Lang y Parrie (1992), quienes utilizaron agar para la mezcla y obtuvieron un resultado de germinación entre 79.5 y 94.3%. Sin embargo, en otro estudio (Huang y Johnson 1996) se utilizó agua para la mezcla del medio y se lograron los resultados de germinación entre un 78.5 y 93%. Para el método de Tetrazolio se utilizó la mezcla prevista.

En el cuadro 2, se observan las diferencias significativas entre los métodos y entre los genotipos. El mejor método fue el de agua pura, el cual presentó una mayor viabilidad de polen. Estos resultados son debido a que el método de agua pura sólo mide el potencial de viabilidad; siendo factible que un grano esté bien formado con todas sus características favorables (tamaño, forma), sin embargo esto no asegura que esté vivo y que estén ocurriendo procesos metabólicos en él. En el método de tetrazolio los valores son inferiores a los de la prueba de agua pura, aunque son relativamente altos. En una prueba con 12 sales de tetrazolio (Norton 1966) incluyendo la utilizada en el ensayo 1, se tuvo la correlación confiable ($r = 0.99$) entre la germinación *in vitro* y el polen teñido.

En el caso de la prueba de MGP tubo polínico la viabilidad fue baja, debido al método de conteo. Por lo general, los conteos se hacen midiendo la viabilidad de la tétrada, no del grano de polen en sí (Huang y Johnson 1996); es debido a esto que los porcentajes de germinación que se observan son bajos. Todos los granos de polen son capaces de germinar y formar grano de tubo (Camp 1945; Stushnoff y Palser 1969); sin embargo, esta fenología ha sido poco estudiada. En un estudio de Brewer y Dobson (1969), el 98% de los granos de polen germinaron; y el otro 2% produjo en tétradas con uno, dos o tres granos germinados. Sin embargo, en otro estudio realizado por Vander Kloet (1983), resultó imposible determinar cuáles tétradas tenían uno, dos o tres tubos polínicos. Los ensayos en viabilidad de polen de arándanos, no muestran una clara diferencia entre viabilidad de tubo y viabilidad de tétrada en los granos de polen. Debido a estas razones, se decidió agregar un conteo de tétrada para hacer comparaciones con las pruebas de tetrazolio en la siguiente prueba.

Con relación a los genotipos, se observaron diferencias significativas, siendo el más alto el de la selección 06-362. El valor más bajo se presentó en la accesión CO3-87, debido a que el polen almacenado a -20°C a bajas temperaturas, fue expuesto a temperatura ambiente por dos días antes de la prueba; posiblemente se afectó a la viabilidad en este tiempo, ya que el polen sólo puede mantenerse a temperatura ambiente por 24 horas.

Cuadro 2. Efectos de los métodos y los genotipos en la viabilidad del polen de cuatro genotipos de arándano¹.

Factores	Viabilidad (%)
Métodos	
Agua pura	78 a
Tetrazolio	50 b
MGP tubo polínico	22 c
Genotipos	
06-362	70 a
06-562	52 b
08-508	46 b
CO3-87	32 c

Valores en la misma columna con letra distinta, difieren estadísticamente entre sí, de acuerdo a la prueba de Tukey con 5% de probabilidad.

Los valores más altos de las interacciones se observan en las interacciones del método de agua pura en el genotipo CO3-87 y el del tetrazolio en el genotipo 06-362 (Cuadro 3). En general, los valores de viabilidad de polen más altos se observaron con el método de agua pura a través de los genotipos; pero en los métodos de tetrazolio y MGP tubo polínico se presentaron diferencias más marcadas en interacciones con los genotipos. Las interacciones más bajas se presentaron con el genotipo CO3-87 debido a que el polen de este genotipo no estaba viable por mal almacenamiento, como se explicó anteriormente, siendo nulas las mediciones con tetrazolio y MGP de tubo polínico.

Cuadro 3. Efectos de la interacción Método × Genotipo en la germinación de polen de cuatro genotipos de *Vaccinium*¹.

Genotipo	Métodos		
	Agua	Tetrazolio	MGP Tubo polínico
06-362	79 bc	83 ab	47 d
06-562	79 bc	65 cd	12 f
08-508	56 d	52 d	29 e
CO3-87	97 a	1f	1 f

Valores en la misma fila con letra distinta, difieren estadísticamente entre sí, de acuerdo a la prueba de Tukey con 5% de probabilidad.

3.3 ENSAYO 2: VIABILIDAD DE POLEN EN GENOTIPOS DE VACCINIUM CON LA PRUEBA DE TETRAZOLIO.

3.3.1 Semana 0 (inicio)

Se realizaron pruebas con polen fresco usando los métodos de MGP tubo polínico, MGP tétrada y tetrazolio, y se observaron diferencias significativas entre los métodos y los genotipos (cuadro 4). El mejor método de evaluación resultó ser el de MGP tétrada, y los genotipos con más alta germinación de polen fueron Emerald y Jewel. También se presentaron diferencias debidas a la interacción método \times genotipo (Cuadro 5), aunque la tendencia fue de una mayor viabilidad de polen con el método MGP Tétrada a través de todos los genotipos, por lo cual debe ser considerado como el método más eficiente. Las mejores interacciones se encontraron con el método PGM Tétrada por la naturaleza del conteo. El tetrazolio presentó un valor intermedio entre los genotipos; y el MGP tubo polínico presenta los porcentajes más bajos. La interacción entre los métodos y los genotipos fue altamente significativa.

Cuadro 4. Efectos del método y del genotipo en la viabilidad del polen en la semana 0 (antes de ser almacenado) de cuatro genotipos de arándano¹.

Fuentes	Viabilidad (%)
Métodos	
MGP Tétrada	97 a
Tetrazolio	71 b
MGP tubo polínico	43 c
Genotipos	
Emerald	80 a
Jewel	77 a
08-508	66 b
06-503	58 c

¹Valores en la misma columna con letra distinta, difieren estadísticamente entre sí, de acuerdo a la prueba de Tukey con 5% de probabilidad.

Cuadro 5. Efectos de la interacción método × genotipo en la viabilidad de polen de cuatro genotipos de arándano¹.

Genotipo	Método (%)		
	MGP Tétrada	Tetrazolio	MGP Tubo polínico
Emerald	100 a	89 ab	47 d
Jewel	100 a	83 b	50 cd
08-508	97 a	62 c	39 de
06-503	92 ab	49 d	35 e

¹Valores en la misma columna con letra distinta, difieren estadísticamente entre sí, de acuerdo a la prueba de Tukey con 5% de probabilidad.

3.3.2 Semana 1 a semana 5

Se encontraron diferencias significativas entre los genotipos (cuadro 6). No existen diferencias significativas entre Jewel y Emerald, pero estos genotipos presentaron mejor viabilidad de polen que los otros dos. Las selecciones 08-508 y 06-503 fueron diferentes entre sí debido a que las muestras iniciaron con diferente grado de viabilidad.

3.3.3 Semana 16

Se encontraron diferencias significativas entre genotipos, (cuadro 6). No existen diferencias significativas entre Jewel y Emerald, sin embargo se mantienen las diferencias significativas estos dos en relación a 08-508 y 06-503. En comparación a las primeras 5 semanas de almacenamiento tampoco se encontraron diferencias significativas en la viabilidad del polen almacenado.

Cuadro 6. Cuadro resumen de la viabilidad del polen de los cuatro genotipos utilizados hasta las 16 semanas de almacenamiento¹.

Genotipos	Semanas					
	1	2	3	4	5	16
Jewel	89 a	93 a	89 a	91 a	91 a	91 a
Emerald	83 a	88 a	92 a	92 a	91 a	89 a
08-508	62 b	58 b	55 b	50 b	49 b	58 b
06-503	49 c	52 c	47 b	44 b	48 b	52 b

¹Valores en la misma columna con letra distinta, difieren estadísticamente entre sí, de acuerdo a la prueba de Tukey con 5% de probabilidad.

En el cuadro 7 se presentan los resultados de la evaluación de la viabilidad del polen de la semana 16 empleando tres métodos: Se presentaron efectos significativos de los métodos y de los genotipos. El mejor método fue el de MGP Tétrada, seguido por el método de Tetrazolio. El método MGP tubo polínico tuvo el menor porcentaje debido a la naturaleza del conteo. Estos datos son similares a la prueba realizada al iniciar este ensayo. Por lo que se puede asumir que en general a las 16 semanas todavía no se veía efecto del tiempo y las condiciones de almacenamiento; y que las diferencias al inicio del experimento se mantuvieron hasta el conteo final a las 16 semanas, por lo que se puede indicar que las condiciones de almacenamiento fueron favorables en las 16 semanas del estudio.

Cuadro 7. Efecto de los métodos y genotipos en la viabilidad del polen a las 16 semanas de almacenamiento¹.

Fuentes	Viabilidad (%)
Métodos	
PGM Tétrada	92 a
Tetrazolio	73 b
PGM tubo polínico	39 c
Genotipos	
Emerald	81 a
Jewel	78 a
08-508	60 b
06-503	51 c

¹Valores en la misma columna con letra distinta, difieren estadísticamente entre sí, de acuerdo a la prueba de Tukey con 5% de probabilidad.

3.3.4 Viabilidad en el tiempo.

No existió una diferencia significativa en el cambio de viabilidad del polen de los genotipos en las 16 semanas que se mantuvieron almacenados (cuadro 8). Las diferencias observadas se debieron a la viabilidad al inicio del estudio, el cual no varió a lo largo del tiempo por lo que se puede deducir que la fuente de polen (genotipo) no afecta la viabilidad de los genotipos en el tiempo. Con esta información también se puede decir que la temperatura usada para el almacenamiento fue la adecuada, ya que el polen no sufrió ningún cambio significativo en su viabilidad.

Cuadro 8. Cuadro resumen de la viabilidad de polen de los genotipos almacenados a - 20°C durante las 16 semanas.

Semana	Viabilidad de polen (%)			
	Emerald	Jewel	08-508	06-503
0	80	77	66	58
1	83	89	62	47
2	88	93	58	52
3	92	89	65	47
4	92	91	50	44
5	91	91	49	48
16	89	91	58	52
Promedio	89	91	55	49
Tukey 5%	5.11 ^{ns}			

^{ns}= no significativo.

Estos datos coinciden con el estudio de Huang y Johnson (1996) quienes almacenaron polen de variedades de arándanos a 0°C y con control de la humedad relativa por 8 meses, sin encontrar diferencias significativas en la viabilidad del polen durante todo el estudio. Duis y Childs (1940) utilizaron polen de 5 especies de arándanos; el polen se almacenó a temperaturas entre 0 - 20 ° C y 0-50% de humedad relativa durante cuatro años y medio, con intervalos de medición cada 6 meses y concluyó que la mejor condición de almacenamiento de polen fue entre 0-2° C y 12.5-50% de humedad relativa, para conservar la viabilidad por casi 2 años para la mayoría de las especies.

4. CONCLUSIONES

- En la colección de arándanos de la Universidad de Florida existe una buena diversidad en la viabilidad de polen de las selecciones que la conforman.
- La prueba de Tetrazolio es un método confiable, eficiente y práctico para medir la viabilidad del polen de genotipos de arándano.
- La variación en la duración del polen de los genotipos de arándanos en almacenamiento depende de la viabilidad inicial y de las condiciones en las que se les almacena.
- El polen de arándano puede conservarse a 16 semanas bajo condiciones favorables, baja temperatura y humedad relativa.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar el costo de las pruebas de Tetrazolio y de Medio de germinación del tubo polínico que fueron las más efectivas en el estudio.
- Para los híbridos con baja viabilidad se recomienda almacenar mayor cantidad de polen en comparación a las variedades mejoradas y selecciones de cruza, para así asegurar disponer de polen viable cuando se le vaya a utilizar después de estar almacenado por varios meses.
- Realizar evaluaciones de la efectividad de otras pruebas de tinción que existan para la viabilidad del polen.

6. LITERATURA CITADA

- Brewbaker J., Kwack B. 1963. The essential role of Calcium Ion in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany* 50:859- 865.
- Brewer, J.W., Dobson, R.C. 1969. Pollen analysis of two highbush blueberry varieties *V. corymbosum*. *Journal of American Society of Horticultural Science* 94:251-252.
- Camp, W.H. 1945. The North American blueberry with notes on other groups of *Vacciniaceae*. *Brittonia* 5:203-275.
- Darnell, R. 2006. Blueberry Botany/ Environmental Physiology. Blueberries for growers, gardeners, and promoters children. N. F. y Lyrene, P. M. (ed) Gainesville, Florida. Norman F. Childers Horticultural Publications. p-5-13.
- Florida and Writers' Program (Fla.). 1945. Blueberries: With special reference to Florida culture. Tallahassee, Florida, Florida State Dept. of Agriculture. p 9-17.
- Galleta, G.J. 1975. Blueberries and cranberries. *In*: Janick J. y Moore J. N. (ed) *Advances in Fruit Breeding*. W. Lafayette, Indiana. Purdue University Press. p 154- 185.
- Galleta, G. J. 1983. Pollen and seed management. *In*: Janick J. y Moore J. N. (ed) *Methods in fruit breeding*. W. Lafayette, Indiana. Purdue University Press. p 23- 47.
- Huang Y., Johnson Ch. 1996. A convenient and reliable method to evaluate blueberry pollen viability. *HortScience* 31: 1235.
- Lang, G., Parrie J. 1992. Pollen viability and vigor in hybrid Southern Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L. x spp.). *HortScience* 27: 425-427.
- Ortiz, R., Vorsa. N., Bruederle L.P., Lavery. 1998. Pollen viability in natural populations of three North American diploid species of blueberry (*Vaccinium*, Section *Cyanococcus*). *Scientia Horticulturae* 80:39- 48.
- Rodriguez, T., Dafni A. 2000. A new procedure to assess pollen viability. *Sexual Plant Reproduction* 12:241- 244.
- Stone, J., Thomson J., Dent-Acosta S. 1995. Assessment of pollen viability in hand pollination experiments: A review. *American Journal of Botany* 82:1186-1197.
- Stushnoff, C., Hough, B.F. 1969. Embryology of five *Vaccinium* taxa including diploid,

tetraploid and hexaploid species or cultivars. *Phytomorphology* 19:312:321.

Stanley, R. G. and Liskens H. F. 1974. *Pollen, biology, biochemistry management*. New York Springer-Verlag. p 1 – 85.

Vander, K., S.P. 1983. The relationship between seed number and pollen viability in *Vaccinium corymbosum*. *HortScience* 18: 225-226.