



**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR Y FACULTAD DE
CIENCIAS EXPERIMENTALES**

**MÁSTER EN PRODUCCIÓN VEGETAL EN CULTIVOS
PROTEGIDOS
PROYECTO FIN DE MÁSTER**

**ESTUDIO DE DISTINTOS MÉTODOS DE
CONSERVACIÓN DE POLEN DE CALABACÍN
(*Cucurbita pepo* L.)
JULIO 2013**

ALUMNA: TERESA POMARES VICIANA

DIRECTORES:

DRA. VIRGINIA PINILLOS VILLATORO

DR. PEDRO GÓMEZ JIMÉNEZ DE CISNEROS

ÍNDICE

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. MATERIALES Y MÉTODOS	6
2.1 Material Vegetal	6
2.2 Condiciones de conservación	6
2.3 Viabilidad del polen	6
2.4. Análisis estadístico	7
2.5 Cuajado de frutos y producción de semillas	7
3. RESULTADOS	8
3.1. Comparación del test TTC con el test FCR en la estimación de la viabilidad del polen	8
3.2. Viabilidad del polen en los distintos métodos de conservación	8
3.3. Cuajado y producción de semillas en polen conservado	11
4. DISCUSIÓN	12
5. CONCLUSIONES	14
6. BIBLIOGRAFÍA	15
7. AGRADECIMIENTOS	18

RESUMEN

Las líneas de investigación que complementan los programas de mejora de calabacín se dirigen hacia la obtención de variabilidad genética mediante colecciones de mutantes inducidas por el uso de agentes químicos como el etil-metanosulfonato. Este agente químico produce cambios morfológicos y fisiológicos que pueden alterar el patrón de floración característico de *Cucurbita pepo*, impidiendo la autofecundación. Una de las estrategias que permitirían llevar a cabo la autofecundación, de forma artificial, en plantas mutantes con anomalías en el patrón de floración, es la conservación de polen de dichos mutantes. El polen de calabacín es un polen de muy reducida longevidad y en la actualidad no existen muchos estudios sobre métodos de conservación. En este trabajo, se ha llevado a cabo la comparación de diferentes condiciones de conservación (temperatura, humedad e inmersión en solventes orgánicos) de polen recogido en dos estadios de desarrollo, anthesis y anthesis-1 (un día antes de anthesis), con el objetivo de prolongar su viabilidad. La viabilidad del polen conservado ha sido evaluada mediante el test histoquímico TTC y se ha determinado también la capacidad de inducir el cuajado de fruto y producción de semillas. La conservación de la flor intacta en anthesis a 4°C permitió mantener la viabilidad del polen hasta 96 horas, sin embargo, sólo el polen conservado hasta 48 horas fue capaz de producir frutos semillados. El polen recogido de flores antes de su anthesis aunque indujo el cuajado de frutos no dio lugar a la formación de semillas.

ABSTRACT

Breeding programmes in zucchini (*Cucurbita pepo*) are focused in obtaining genetic variability by mutant population induced with chemical agent as ethyl methanesulfonate. This chemical agent causes morphological and physiological changes that may alter flowering pattern of *C. pepo*, preventing selfing. Pollen storage may allow artificially selfing in mutant plants with abnormal flowering pattern. *Cucurbita pepo* pollen has a short longevity and nowadays there are few studies on storage methods. In this work, we have compared different storage conditions (temperature, humidity and immersion in organic solvents) of pollen collected in two development stages, anthesis and anthesis-1 (one day before anthesis), with the aim of extending pollen viability. Viability of stored pollen was assessed by histochemical test TTC and fruit set and seed production. Storage of complete flowers in anthesis stage at 4°C maintained pollen viability up 96 hours, however, only stored pollen up 48 hours was able to produce seeded fruits. Pollen from flower in a stage previous to anthesis, set fruits, but these fruits had not seeds.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de calabacín (*Curcubita pepo* L.) ha incrementado su superficie, su producción (169%) y su valor económico (111%) de forma significativa durante los últimos veinte años (MAGRAMA, 2012). Sin embargo, este aumento no se ha visto acompañado de un incremento en la obtención de nuevas variedades como ha ocurrido en otros cultivos.

El desarrollo de estas nuevas variedades depende de la mejora genética de la especie, y por tanto de la combinación y estudio de los genes de interés. En la actualidad, las líneas de investigación que complementan los programas de mejora de calabacín se dirigen hacia la secuenciación del genoma (Gong et al, 2012), el estudio del transcriptoma (Obrero, 2013) y hacia la obtención de colecciones de mutantes mediante el uso de agentes químicos (Vicente-Dólera et al, 2012b).

La obtención de poblaciones mutagenizadas de *Cucúrbita pepo* por agentes químicos como el etil-metanosulfonato (EMS) permite asignar funciones a los genes mediante el uso de plataformas TILLING (Martín et al, 2009; Henikoff et al, 2004) y la asociación fenotipo-genotipo (Martínez-Valdivieso et al, 2012). Sin embargo, las mutaciones producidas alteran los patrones morfológicos y fisiológicos, que caracterizan a esta especie (Vicente-Dólera et al, 2012a), concretamente afectan a la morfología de la hojas, al estado de desarrollo, a la arquitectura de la planta y a la floración.

El calabacín presenta flores grandes, solitarias, axilares, acampanadas y de color amarillo. Éstas pueden ser masculinas y femeninas (Fig.1A), coexistiendo en una misma planta monoica. En los primeros estadios del desarrollo, la mayoría de las flores son masculinas. Posterior a este primer estadio, aumenta progresivamente el número de flores femeninas y ocurre una mayor sincronía entre la floración masculina y femenina. Este aumento de floración femenina continua durante el envejecimiento del cultivo en detrimento de la floración masculina, aunque depende de la variedad y la época de cultivo (Reche, 1997).

Las mutaciones que produce el EMS afectan a la morfología de la hojas, al estado de desarrollo, a la arquitectura de la planta y a la floración, concretamente al desarrollo del ovario, al desarrollo de las anteras y al estadio de sincronía entre la floración femenina y masculina (Vicente-Dólera et al, 2012b). Esta última alteración puede impedir la autofecundación, necesaria para el mantenimiento y obtención de nuevas variedades.

Una de las estrategias que permitirían llevar a cabo la fecundación, de forma artificial, en plantas mutantes con anomalías en el patrón de floración, es la conservación de polen de dichos mutantes en espera de la floración femenina.

El polen se conserva con éxito en multitud de especies de interés hortícola y frutícola (Volk, 2011; Yates, 1991), disminuyendo la temperatura y la humedad relativa, ya que se ralentiza el metabolismo y se prolonga la viabilidad (Shivanna y

Johri, 1985). Esta conservación permite llevar a cabo programas de polinización artificial en muchas especies.

La conservación de polen a corto plazo (durante horas o días) suele ser posible con temperaturas entre 0-4° C (Lora et al, 2006; Holcroft y Allan, 1994). Sin embargo, estas temperaturas no suelen permitir el mantenimiento de la viabilidad durante largos periodos de tiempo (Luza y Polito, 1985; Van der Walt y Littlejohn, 1996). A estas temperaturas, una reducción de la humedad relativa mejora la capacidad de conservación de polen (Volk, 2011). En *Protea*, el polen conservado mantiene la viabilidad durante 90 días cuando se almacena entre 0% -30% de humedad relativa, mientras que la viabilidad disminuye rápidamente en polen conservado a un 60% de humedad relativa (Van der Walt y Littlejohn, 1996). Además, en algunas especies, una gran reducción de la humedad relativa permite la conservación de polen a largo plazo, como por ejemplo en peral y manzano, cuyo polen se almacena con éxito durante dos años a 2 °C con humedad relativa del 10% (Visser, 1955).

Otras formas de conservación de polen, se basan en la conservación en solventes orgánicos, como el glicerol o la acetona (Shivanna y Johri, 1985). Ciertos estudios en *Ricinus communis* (Vargas et al, 2011) demuestran que la conservación de polen en diferentes diluciones de glicerol permiten mantener la longevidad del polen durante meses.

En la actualidad, no son muchos los estudios sobre conservación de polen en *Cucurbita pepo*. El polen de esta especie, es un polen parcialmente hidratado, que a diferencia de la mayor parte de pólenes, es liberado con un alto contenido de humedad, cercano al 50% (Nepi et al, 2010). Este tipo de polen pierde humedad rápidamente, una vez que la antera abre, y su viabilidad decrece bruscamente en unas pocas horas (Pacini et al, 1997). A diferencia, por tanto, de la mayoría de tipos de polen, la reducción de la humedad relativa no puede ser empleada en la conservación de polen de calabacín, ya que éste no tolera la deshidratación por debajo del 24% del contenido de humedad (Gay et al, 1987).

En este trabajo, se tiene como principal objetivo el poner a punto un método de conservación que permita alargar la longevidad del polen de calabacín para su uso en programas de mejora. Para ello, se determinará y comparará la viabilidad del polen conservado en diferentes condiciones de temperatura y humedad relativa. Asimismo, se verificará el método de conservación mediante la determinación de la capacidad de fecundar y producir frutos semillados del polen conservado. También se analizará la influencia del estado de madurez del polen en su capacidad de conservación.

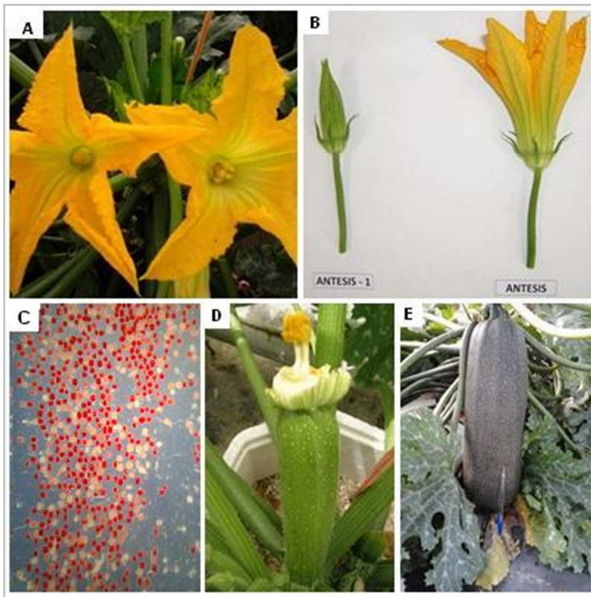


Figura 1. Morfología de órganos reproductivos implicados en la conservación de polen de *Cucurbita pepo*
A) Flor femenina y flor masculina de *Cucurbita pepo* en antesis. **B)** Estadios de desarrollo de la flor masculina de *Cucurbita pepo*. **C)** Polen teñido mediante TTC de *Cucurbita pepo*: **D)** Flor femenina de *Cucurbita pepo* polinizada con polen conservado. **E)** Fruto de *Cucurbita pepo* cuajado con polen conservado. El fruto se observa a los 30 días de crecimiento.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Se utilizó polen procedente de flores masculinas en dos estadios de desarrollo (Fig. 1B), antesis y antesis -1 (flores un día antes de antesis). Las flores fueron recogidas a primera hora de la mañana de una población de *Cucurbita pepo* L. cv *Zuchinni*, en concreto una variedad de polinización abierta de la región de Murcia identificada como *MU-CU16* en el banco de germoplasma de hortícolas del IFAPA. El cultivo tuvo lugar durante los meses de febrero a mayo en ciclo de invierno-primavera en el Centro IFAPA “La Mojonera”. Las flores fueron seleccionadas al azar y se colocaron en atmósfera saturada de humedad (cámara húmeda) para mantener un ambiente húmedo durante el traslado al laboratorio, donde se procesaron.

2.2. Condiciones de conservación

Durante el ensayo, se compararon diferentes condiciones de conservación, que fueron las siguientes:

1. Conservación de la flor completa a temperatura ambiente.
2. Conservación de la flor completa a temperatura ambiente en atmósfera saturada de humedad.
3. Conservación de la flor completa a 4°C.

4. Conservación de la flor completa a 4°C en atmósfera saturada de humedad.
5. Conservación en acetona: el polen fue extraído de las anteras y depositado en un vial que contiene 500 µl de acetona.
6. Conservación en glicerol 30%: el polen fue extraído de las anteras y almacenado en una solución de sacarosa 0,5 M con un 30 % de glicerol a 4°C.
7. Conservación a -20°C: se extrajeron los granos de polen de las anteras y se depositaron en un vial a -20° C.

2.3. Viabilidad del polen

Para comparar las diferentes condiciones de conservación, se estimó la viabilidad del polen conservado mediante el test histoquímico TTC (cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolium) siguiendo las indicaciones de Shivanna y Johri (1985). Los granos de polen fueron dispersados sobre una gota de solución de 0,5 % de TTC en sacarosa 0,5 M, situada en un portaobjetos y se incubaron durante 2 horas en oscuridad a 50°C. Posteriormente, las muestras se observaron bajo lupa binocular (*Leica ZOOM 2000*). Los granos de polen de color rojo intenso fueron considerados viables y los granos de polen de color amarillo no viables (Fig. 1C), contando al menos 100 granos de polen en cada portaobjetos. La viabilidad de una muestra se determinó como el porcentaje de granos viables utilizando tres repeticiones (portaobjetos). Para cada condición de conservación se determinó la viabilidad del polen de 6 flores masculinas cada 24 horas, hasta la pérdida completa de la misma.

Previamente, para comprobar la bondad del test TTC se comparó con el test FCR (Heslop-Harrison, 1970) usado frecuentemente para la estimación de la viabilidad del polen de *C.pepo* (Nepi y Pacini, 1993; Nepi et al, 1997). Para ello, se determinó la viabilidad del polen de diez flores en antesis con ambos test. Asimismo, se utilizó como control negativo polen muerto, que había sido expuesto a 100 °C durante 2 horas.

2.4. Análisis estadístico

Los datos de viabilidad del polen se sometieron a análisis de la varianza, comparando en cada tiempo la viabilidad del polen almacenado en las distintas condiciones de conservación mediante el test Tukey, con un nivel de significación de $p < 0.05$, usando el software estadístico *Statistix 9.0*.

2.5. Cuajado de frutos y producción de semillas

Se determinó la capacidad del polen conservado de inducir el cuajado de fruto y de producir semillas viables. Para ello, se polinizaron cuatro flores de cuatro plantas distintas para cada condición y tiempo de conservación. Previo a la polinización, se seleccionaron las flores femeninas en estadio de antesis-1 y se embolsaron. El polen conservado, en los diferentes métodos, se trasladó a primera hora de la mañana al invernadero, donde se realizó la polinización (Fig.1D). Las

flores femeninas polinizadas fueron embolsadas durante un día más para evitar la transferencia de polen externo. Se observó el crecimiento del fruto, determinando como frutos cuajados aquellos que presentaban un crecimiento cilíndrico en el ápice y como frutos no cuajados aquellos que presentaban un crecimiento apuntado. Los frutos se cortaron a los 30 días tras la polinización (Fig.1E) y se almacenaron durante 30 días. Tras este periodo, se procedió a la extracción de las semillas, determinándose el número medio de semillas por fruto.

3. RESULTADOS

3.1. Comparación del test TTC con el test FCR en la estimación de la viabilidad del polen

La tinción de polen de diez flores masculinas en antesis con ambos test (TTC y FCR) proporcionó valores de viabilidad de polen muy similares, en torno al 95%, presentando un coeficiente de correlación de *Pearson* de 0.997 entre las medidas de ambos test. Además, en ambos test, la viabilidad del polen muerto, tratado a 100°C durante 2 horas, fue nula. Se confirmó, por tanto, la bondad del test TTC para su uso en *Cucurbita pepo*.

3.2. Viabilidad del polen en los distintos métodos de conservación

Se probaron hasta 7 condiciones de conservación del polen de *Cucurbita pepo*. Dos de ellas consistieron en la inmersión del polen en solventes orgánicos, glicerol y acetona, y el resto, fueron combinaciones de diferentes temperaturas y humedad relativa de conservación. Estas siete condiciones se aplicaron a polen procedente de flores en dos estadios de desarrollo antesis y antesis-1.

Las flores en antesis presentaban las anteras abiertas (Fig. 2A) con polen de mayor tamaño y con capacidad germinativa (Fig. 2B) a diferencia del estadio antesis-1, donde las anteras se encontraban parcialmente cerradas o cerradas completamente (Fig.2D) con polen inmaduro, incapaz de germinar y de menor tamaño (Fig. 2C).

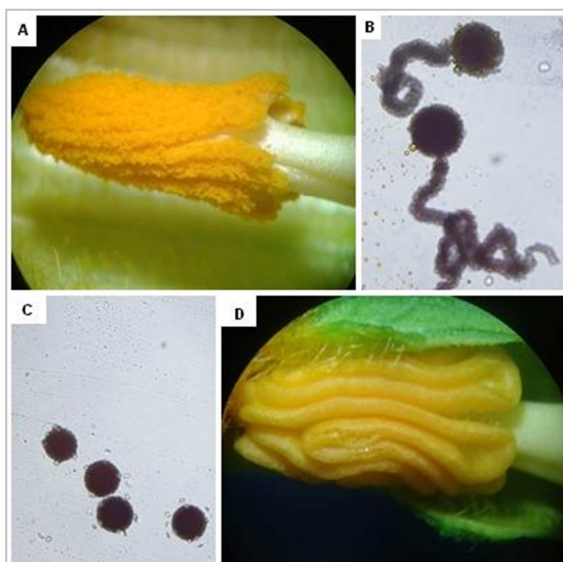


Figura 2. Estadios de desarrollo antesis y antesis -1 del polen y anteras de *Cucurbita pepo*. A) Anteras abiertas de flores masculinas del estadio de antesis. B) Polen con capacidad germinativa procedente de flores en estadio de antesis. C) Polen sin capacidad germinativa procedente de flores masculinas en estadio de antesis -1. D) Anteras cerradas de flores masculinas en estadio de antesis-1.

La conservación, tanto en los dos solventes orgánicos testados como a -20°C , produjo la pérdida total de viabilidad del polen a las 24 horas, independientemente del estado de desarrollo de la flor (antesis y antesis-1) de la que se obtuvo éste, a pesar de que la viabilidad media inicial del polen fue del 93%. Posteriormente, se comprobó que la viabilidad del polen se pierde inmediatamente después de la inmersión del polen en glicerol y acetona, y tras dos horas en la conservación a -20°C . La observación de granos de polen sometidos a estas condiciones demostró que se altera la morfología típica redondeada del grano de polen (Fig. 3.A-B).

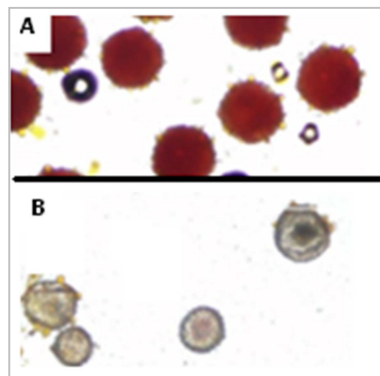


Figura 3. Aplicación de solventes orgánicos en la conservación de polen de *C. pepo*. A) Observación al microscopio de granos de polen de flor en antesis y teñidos con TTC. B) Observación al microscopio de granos de polen teñidos con TTC tras su inmersión en glicerol (igual resultado cuando son inmersos en acetona)

El polen recogido en antesis, y conservado en el interior de la flor a temperatura ambiente mantuvo su viabilidad hasta las 24 h, independientemente del almacenamiento o no en la cámara con atmósfera saturada de humedad, ya que no se produjeron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambas condiciones. La pérdida completa de la viabilidad del polen conservado a temperatura ambiente se produjo a las 48 horas (Fig.4A).

La conservación a 4°C , sin embargo, prolongó la viabilidad del polen más allá de las 24 horas. (Fig.4A). Hasta las 96 horas de conservación, la viabilidad media del polen se mantuvo en valores similares a los iniciales y siempre mayores del 80%, cuando las flores fueron conservadas sin cámara de humedad, y sólo hasta las 72 horas cuando las flores estaban situadas en el interior de la cámara de humedad. A las 96 y 120 horas de conservación, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la viabilidad del polen de flores conservadas al aire libre o en el interior de la cámara de humedad, mostrando mayor viabilidad aquellas muestras de polen conservadas sin atmósfera saturada de humedad. A partir de las 96 horas de conservación, la viabilidad del polen sufrió una caída brusca, desde un 70% de viabilidad media a las 96 horas hasta un 30% a las 120 horas de conservación, produciéndose la pérdida completa de la viabilidad a las 144 horas.

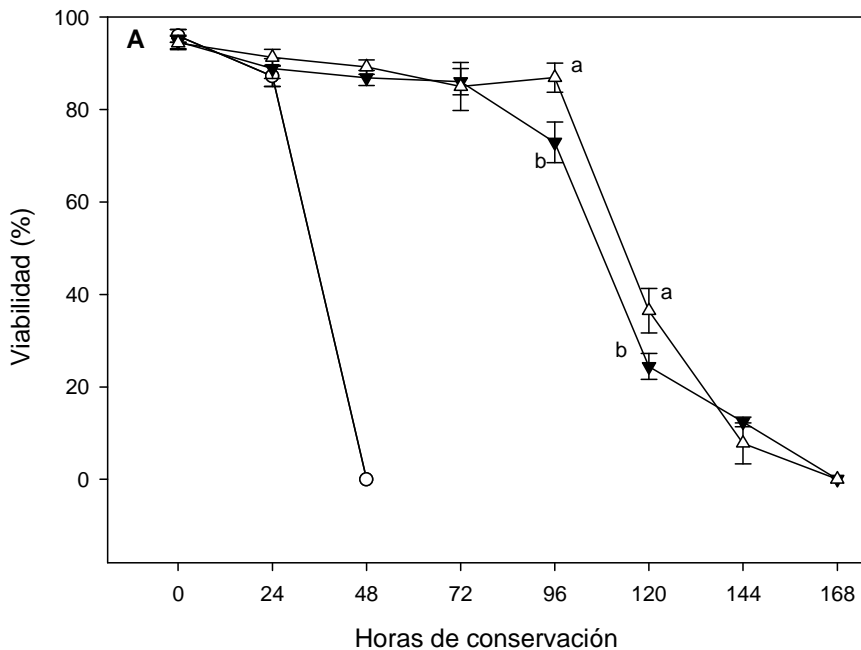
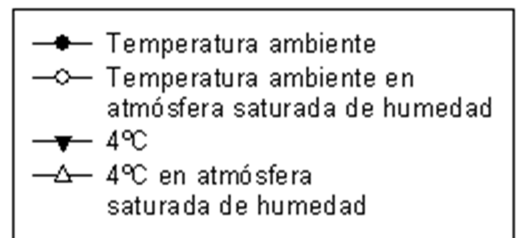
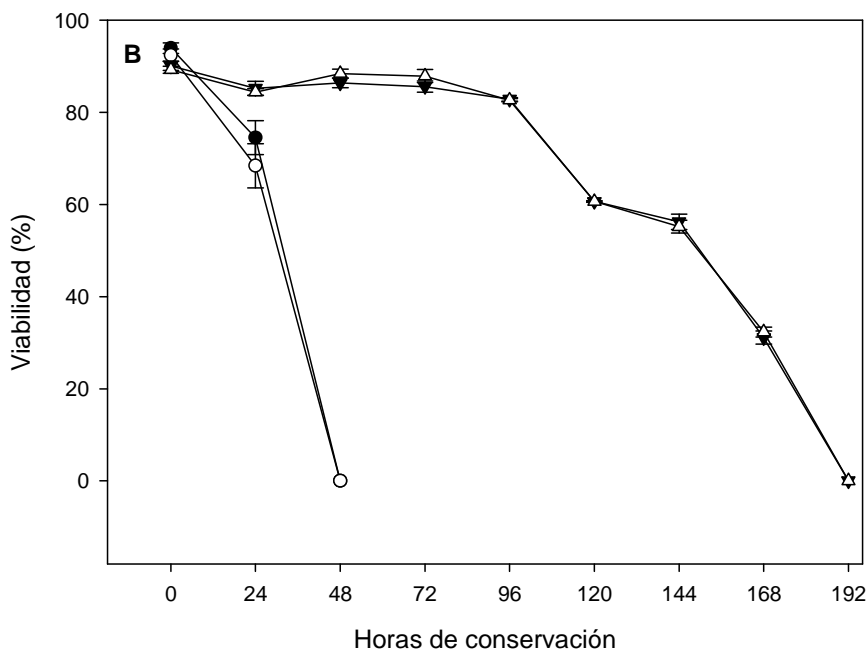


Figura 4. Viabilidad del polen recogido en distintos estadios de desarrollo (A, antesis y B, en antesis-1) conservado en diferentes condiciones de temperatura y humedad La viabilidad se determina mediante la tinción por TTC para cada uno de las condiciones de conservación: polen conservado a temperatura ambiente, polen conservado a temperatura ambiente en atmósfera saturada de humedad, polen conservado a 4°C, polen conservado a 4°C en atmósfera saturada de humedad. Se ha cuantificado la viabilidad de 6 flores para cada método, tomándose medidas de viabilidad cada 24 horas de cada una de las flores. Se representa la media \pm el error estándar a lo largo del tiempo en cada una de las condiciones aplicadas. ^{a,b} grupos que muestran diferencias significativas en la viabilidad en este tiempo de conservación mediante el test Tukey ($p < 0.05$)



En el caso del polen extraído de flores en antesis-1, la conservación a temperatura ambiente, con o sin atmósfera saturada de humedad, presentó una curva de viabilidad similar a la obtenida en estadio de antesis.

La conservación a 4° C de polen recogido en antesis-1 prolongó también la viabilidad, al igual que ocurrió con el polen recogido en antesis, siendo independiente del uso o no de atmósfera saturada de humedad, ya que no se encontraron diferencias significativas entre ambas condiciones ($p < 0.05$)(Fig.4.B). A partir de las 96 horas de conservación, la viabilidad media del polen fue descendiendo con el tiempo hasta la pérdida completa de la misma a las 192 horas. Este descenso fue menos acusado que el producido en polen recogido en antesis, ya que a las 120 horas de conservación a 4°C, el polen en antesis-1 posee un 60% de viabilidad frente al 30% que posee el polen en antesis (Fig.4A-B). Este hecho, se repitió a las 144 horas de conservación, donde la viabilidad se mantuvo por encima del 50% para el polen en antesis-1, mientras que para el polen en antesis fue casi nula

3.3. Cuajado y producción de semillas en polen conservado

El polen recogido en estadio de antesis (Tabla1) y conservado durante 24 horas tanto a temperatura ambiente como a 4 °C, indujo el cuajado de frutos. Sin embargo, sólo se produjeron semillas en aquellos frutos cuajados con polen conservado a 4°C, a pesar de que en ambas temperaturas el polen presentaba una viabilidad superior al 80%. A partir de las 48 horas de conservación, sólo el polen conservado a 4°C produjo cuajado de fruto. Sin embargo, estos frutos presentaban menor número de semillas en comparación con los frutos cuajados con polen conservado durante 24 horas a esta misma temperatura, a pesar de que en ambos tiempos de conservación el polen conservado presentaba una viabilidad similar (Fig. 4A). A las 72 y 96, el polen fue capaz de inducir el cuajado del fruto pero éste no presentaba semillas y a las 120 horas no se produjo cuajado del fruto (Tabla 1).

Tabla 1. Cuajado de fruto y número medio de semillas por fruto tras la polinización con polen conservado a lo largo del tiempo y en diferentes condiciones conservación, y obtenido de flores en antesis (-, muestras que no se han usado para polinizar porque la viabilidad del polen conservado es nula)

Horas	Condiciones de conservación							
	Ambiente		Ambiente en atmósfera húmeda		4°C		4°C en atmósfera húmeda	
	Cuajado (%)	Semillas (n°/fruto)	Cuajado (%)	Semillas (n°/fruto)	Cuajado (%)	Semillas (n°/fruto)	Cuajado (%)	Semillas (n°/fruto)
0	100	378	Si	386	100	398	100	356
24	100	0	Si	0	100	309	100	397
48	-	-	-	-	100	4	100	5
72	-	-	-	-	100	0	100	0
96	-	-	-	-	100	0	100	0
120	-	-	-	-	0	-	0	-
144	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 2. Cuajado de fruto y número medio de semillas por fruto tras la polinización con polen conservado a lo largo del tiempo y en diferentes condiciones conservación, y obtenido de flores en antesis -1 (-, muestras que no se han usado para polinizar porque la viabilidad del polen conservado es nula)

Horas	Condiciones de conservación							
	Ambiente		Ambiente en atmósfera húmeda		4°C		4°C en atmósfera húmeda	
	Cuajado (%)	Semillas (n°/fruto)	Cuajado (%)	Semillas (n°/fruto)	Cuajado (%)	Semillas (n°/fruto)	Cuajado (%)	Semillas (n°/fruto)
0	100	0	Si	0	100	0	100	0
24	100	0	Si	0	100	0	100	0
48	-	-	-	-	100	0	100	0
72	-	-	-	-	100	0	100	0
96	-	-	-	-	100	0	100	0
120	-	-	-	-	0	0	0	0
144	-	-	-	-	0	0	0	0
168	-	-	-	-	-	-	-	-

El polen extraído de flores en estadio de antesis-1 y conservado durante 24 horas, tanto a temperatura ambiente como a 4°C, indujo el cuajado del fruto. Sin embargo, a partir de las 48 horas de conservación, sólo la polinización con el polen conservado a 4°C produjo el cuajado de frutos. A partir de las 120 horas de conservación, el polen ya no fue capaz de inducir el cuajado de frutos. Ninguno de los frutos cuajados con este tipo de polen presentó semillas (Tabla 2)

4. DISCUSIÓN

El polen de calabacín es un polen de muy corta viabilidad, de apenas unas horas, lo cual limita la polinización artificial en los programas de mejora. Este trabajo se ha centrado en la búsqueda de las condiciones de conservación óptimas, que permitan extender la longevidad de dicho polen al menos 24 horas, o varios días.

Para comparar las diferentes condiciones de conservación se estimó la viabilidad del polen con el test histoquímico TTC. Sin embargo, este test no había sido aplicado con anterioridad al polen de esta especie, por ello en este trabajo se consideró conveniente la comparación previa de los resultados de dicho test con otro test histoquímico, el test FCR, que es uno de los test más empleados para la determinación de viabilidad en muchas especies y entre ellas, el calabacín (Pacini et al,1997; Vizintin y Bohanec,2004;Pinillos y Cuevas,2008). El interés en el uso del test TTC se debe a los inconvenientes prácticos que presenta la determinación de la viabilidad del polen mediante el test FCR. El test FCR tiene una vida útil muy corta y las muestras tienen que ser evaluadas en un corto espacio de tiempo tras su preparación, lo que impide el procesamiento de un número elevado de muestras. Vizintin y Bohanec (2004), en un estudio en polen de *Cucumis sativus*, detallan que la

tinción de polen con MTT (otra sal de tretazolium de igual actuación que el TTC) proporciona una estimación de la viabilidad similar a la ofrecida por el test FCR, pero permite evaluar un mayor número de muestras que con este test y evita además el uso de microscopía de fluorescencia. En nuestro trabajo, se ha encontrado también una alta correlación entre las estimaciones de viabilidad de los test TTC y FCR, demostrándose que el test TTC puede usarse en polen de *Cucurbita pepo* con las mismas garantías que el test FCR.

La conservación del polen a bajas temperaturas, (0-4°C) y bajas humedades relativas permite la conservación del polen a corto plazo (horas o días) (Lora et al, 2009; Wang et al, 1993). La conservación a 4°C alargó la viabilidad del polen de calabacín frente a la conservación a temperatura ambiente, al igual que ocurre en otras muchas especies. A 4°C la viabilidad se mantuvo en valores similares a los iniciales hasta 96 horas tras la antesis, mientras que a temperatura ambiente la viabilidad se perdió casi por completo a las 48 horas de conservación. La prolongación de la viabilidad a 4°C parece venir determinada principalmente por una bajada de la actividad enzimática y la actividad celular (Dafni et al, 1992).

El polen de calabacín es un polen parcialmente hidratado, y como se ha indicado, de longevidad muy corta. La pérdida de la viabilidad se produce principalmente por la pérdida de la humedad del grano de polen cuando se somete a procesos de deshidratación (Nepi et al, 2001). Con el objetivo de prolongar la longevidad, en este trabajo se conservó el polen en el interior de la flor masculina completa, ya que según Gay et al (1987), la corola es capaz de mantener la humedad del grano de polen al 46 %. Además, se estudió el efecto sobre la viabilidad, de la conservación de la flor en un ambiente saturado de humedad, con el objetivo de dificultar más aún la pérdida de hidratación del polen conservado. Sin embargo, la aplicación de atmósfera saturada de humedad a las muestras de polen conservadas en la flor no produjo ningún efecto positivo en la prolongación de la viabilidad del polen conservado, ni a 4°C ni a temperatura ambiente.

La conservación a temperaturas por debajo de 0°C permite por lo general aumentar la longevidad del polen a largo plazo (Volk, 2011). Sin embargo, el polen de calabacín conservado a esta temperatura perdió rápidamente su viabilidad, lo cual debe estar relacionado con su alto contenido en agua, que a estas temperaturas provocaría la formación de cristales de hielo (Shivanna y Johri, 1985).

La inmersión del polen en glicerol o acetona, empleados en otras especies con éxito, provocó una pérdida fulminante de la viabilidad del polen de calabacín. Esta pérdida de viabilidad puede estar provocada por los cambios que producen dichas soluciones en la osmolaridad del grano de polen (Shivanna y Johri, 1985; Jain y Shivanna, 1988).

Según las curvas de viabilidad obtenidas mediante el test TTC, en las mejores condiciones de conservación, a 4°C, la viabilidad del polen de calabacín puede mantenerse hasta las 96 horas tras la antesis. Sin embargo, este resultado no coincide con los resultados obtenidos en el cuajado de fruto y producción de semillas (tabla 1-2). El polen conservado a 4°C hasta 96 horas fue capaz de inducir fruto, sin embargo, sólo aquel conservado hasta 48 horas dio lugar a frutos con semilla.

Asimismo, el polen conservado durante 24 horas a temperatura ambiente, con valores elevados de viabilidad, aunque dio lugar a fruto, este tampoco presentó semillas. Aunque en muchas especies las estimaciones de viabilidad con el test histoquímico FCR reflejan adecuadamente la capacidad del polen de producir semillas y frutos (Heslop-Harrison et al., 1984; Pinillos y Cuevas, 2005), en otras especies, como ocurre aquí, la correlación entre el test histoquímico y la capacidad de producir semillas es bastante pobre (Van der Walt y Littlejohn, 1996; Maguire y Sedgley, 1997). Hay que recordar que el test TTC evalúa la presencia de una actividad enzimática en el citoplasma y la presencia de una enzima activa no tiene por qué garantizar totalmente que el polen sea viable y que mantenga la capacidad de fecundar óvulos y dar lugar a semillas; la estimación directa del cuajado de frutos y semillas nos daría por tanto, una estimación más exacta de la viabilidad de un polen conservado (Dafni et al, 2000). Resulta llamativo en este trabajo, que el polen recogido en estado de antesis y conservado durante 72 y 96 horas a 4°C y, todo el polen recogido antes de la antesis de la flor, fuera capaz de inducir el cuajado del fruto pero este fruto no presentara semillas. La polinización con éste polen, con valores elevados de viabilidad, produjo frutos partenocárpicos mediante el proceso denominado partenocarpia estimulada, proceso en que estímulos procedentes de la polinización, la germinación del grano de polen o el desarrollo inicial del tubo polínico, sin que en ningún caso se alcance la fecundación, constituyen en ocasiones estímulos suficientes para que se inicie el desarrollo del ovario sin semillas (Talón et al, 1990).

5. CONCLUSIONES

- El test TTC proporciona estimaciones de viabilidad similares al ampliamente usado test FCR, pudiéndose utilizar con las mismas garantías que éste en *Cucurbita pepo*. La mayor vida útil de sus tinciones y la no necesidad de microscopia de fluorescencia lo hacen en la práctica preferible al FCR.
- El uso de solventes orgánicos y de temperaturas de congelación no pueden aplicarse para la conservación de polen de *Cucurbita pepo*.
- La conservación a 4°C y dentro de la flor intacta, permite mantener la viabilidad inicial del polen de calabacín hasta 96 horas, pero sólo hasta las 48 horas éste tiene la capacidad de inducir frutos semillados.
- No se encontró una buena correlación entre los valores de viabilidad estimada con el test TTC y la capacidad de fecundar y dar lugar a semillas.
- El polen en estado de antesis-1, sólo fue capaz de inducir el cuajado de frutos sin semillas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Dafni A. (1992). Pollination Ecology. A practical Approach. The Practical Approach Series. IRLPRESS, Oxford University, New York, United States.
- Dafni A., Firmage D. (2000) Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant System Evolution* 222:113-132.
- Gay G., Kerhoas C., Dumas C. (1987) Quality of a stress-sensitive *Cucurbita pepo* L. pollen. *Planta* 171:82-87.
- Gong L., Paris H.S., Nee M.H., Stift G., Pachner M., Vollmann J., Lelley T. (2012) Genetic relationships and evolution in *Cucurbita pepo* (pumpkin, squash, gourd) as revealed by simple sequence repeat polymorphisms, *Theoretical and Applied Genetics* 124(5): 875-91.
- Henikoff S, Till B.J., and Comai L. (2004) TILLING. Traditional Mutagenesis Meets Functional Genomics. *Plant Physiology* 135(2): 630-636
- Heslop-Harrison J., Heslop-Harrison Y. (1970) Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence, intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technology*, 45:115-120.
- Holcroft, D.M. and Allan, P. (1994) Storage of kiwi fruit pollen. *Journal of the Southern African Society for Horticultural Sciences* 4 (2): 21-23.
- Jain A., Shivanna, K.R. (1988). Storage of Pollen Grains in Organic Solvents: Effects of Solvents on Pollen Viability and Membrane Integrity *Journal of Plant Physiology*, 132 (4): 499-501.
- Lora J., M.A., Pérez de Oteyza M.A., Fuentetaja P., Hormaza J.I. (2006) Low temperature storage and in vitro germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) pollen. *Scientia Horticulturae* 108: 91-94.
- Lora J., Herrero M., Hormaza J.I. (2009) The coexistence of bicellular and tricellular pollen in *Annona cherimola* (Annonaceae): Implications for pollen evolution *American Journal of Botany* 96(4): 802-808
- Luza J.G., Polito V.S. (1985) In vitro germination and storage of English walnut pollen. *Scientia Horticulturae*, 27: 303-316.
- MAGRAMA (2012). Anuario de Estadística Agraria. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid, España.
- Martín B., M. Ramiro M., Martínez-Zapater J. M., 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.

- Martínez-Valdivieso D., Gómez P., Vicente-Dólera N., Rubira F., Moya M., Del Río Celestino M. (2012) Obtención y caracterización de mutantes morfológicos en calabacín (*Cucurbita pepo* spp. *pepo*). XIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, Almería, España.
- Maguire T., Sedgley M. (1997) Storage temperature affects viability of *Banksia menziesii* pollen. *HortScience* 32(5): 916-917.
- Nepi M., Pacini E. (1993) Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. *Annals of Botany* 72: 527-536.
- Nepi M., Franchi G. G., and Pacini E. (2001) Pollen hydration status at dispersal: cytophysiological features and strategies. *Protoplasma* 216: 171-280.
- Nepi M., Cresti L., Guarnieri M., Pacini (2010). Effect of relative humidity on water content, viability and carbohydrate profile of *Petunia hybrid* and *Cucurbita pepo* pollen. *Plant System Evolution* 284:57-64.
- Pacini E., Franchi G.G., Lisci M. Nepi M., (1997) Pollen Viability Related to Type of Pollination in Six Angiosperm Species. *Annals of Botany* 80: 83-87.
- Pinillos V., Cuevas J. (2005) Conservación del polen de olivo (*Olea europaea* L.) a largo plazo. Métodos in vivo e in vitro para la estimación de la viabilidad. *Fruticultura Profesional* 149: 20-30.
- Pinillos V, Cuevas J.(2008) Standardization of the fluorochromatic reaction test to assess pollen viability. *Biotechnic & Histochemistry* 83(1):15-21.
- Obrero, A. (2013). Estudios moleculares de la biosíntesis de carotinoides en *Cucurbita pepo*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba, Córdoba, España.
- Reche, J. (1997). Cultivo del calabacín en invernadero. Colegio Oficial de Ingenieros Técnicos Agrícolas de Almería, Almería, España
- Shivanna K.R., Johri B.M. (1985). The Angiosperm pollen: Structure and Function. Wiley Eastern Lim. New Delhi , India.
- Talón, M., Hedden, P. y Primo-Millo, E. (1990). Gibberellins in *Citrus sinensis*: A comparison between seeded and seedless varieties. *Journal of Plant Growth Regulation* 9: 201-206.
- Van der Walt D., Littlejohn G.M.(1996) Storage and Viability Testing of *Protea* Pollen. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121(5): 804-809.
- Vargas, D.P., Paiva, R., Nogueira, G.F., Carvalho, M.A.F., Da Silva, D.P.C., Nery, F.C., Porto, J.M.P., Da Silva, G.A.(2011) Effect of glycerol as a cryoprotectant for castor bean pollen for different storage periods. *Acta Horticulturae* 908: 97-100.
- Vicente-Dólera N., Pinillos V., Rubira F., Martínez-Valdivieso D., Del Río Celestino M., Román B, Gómez P. (2012a) Factores de fertilidad que limitan el

incremento de variación genética en poblaciones mutantes de calabacín. XIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, Almería, España.

- Vicente-Dólera N., Pinillos V., Moya M., Rubira F., Martínez-Valdivieso D., Del Río-Celestino M., Román B., Gómez P. (2012b) Early Viability assessment in mutant populations of *Cucurbita pepo*. Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae. Antalya, Turquía.
- Vizintin L., Bohanec B. (2004). In vitro manipulation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) pollen and microspores: Isolation procedures, viability tests, germination, maturation. Acta Biologica Cracoviensia. Serie Botanica 46:177-183
- Visser T.(1955).Germination and storage of pollen. Tesis doctoral. Wageningen University, Veenman , Holanda.
- Volk G.M. (2011) Collecting pollen for genetic resources conservation. Crop Genebank knowledge Base: Chapter 25. National Center for Genetic Resources Preservation USDA-ARS, Fort Collins, USA.
- Wang B.S., Charest P.J., DownieB. (2009) Ex Situ Storage of Seeds, Pollen and in Vitro Cultures of perennial woody plant species. Food and Agriculture organization of the United Nations.
- Yates I.E. (1991) Reducing Pollen Moisture Simplifies Long-term Storage of Pecan Pollen Journal of the American Society for Horticultural Science 116(3):430-434.

7. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha estado financiado por el proyecto de código RTA2011-00044 del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). El trabajo se ha desarrollado en el Centro IFAPA “La Mojonera” y la alumna que ha llevado a cabo el trabajo recibe una beca del Plan Nacional de Investigación.