

Universidad de Almería, España
Máster en Horticultura Mediterránea bajo Invernadero

Jorge Gabriel Ramos Estay



POLINIZACIÓN NATURAL Y ARTIFICIAL EN EL CULTIVO DE PITAYA

Tutores

Dr. Julián Cuevas G.

Juan José Hueso M.

ALMERÍA, DICIEMBRE 2018

RESUMEN

El cultivo de pitaya (*Hylocereus* spp.) ha alcanzado un importante auge a nivel productivo y de mercado en los últimos años. El establecimiento de la pitaya en el sistema productivo almeriense exige abordar desafíos que inciden en su rendimiento, como su floración efímera y vespertina, la irregularidad de sus ciclos de floración y la ausencia de polinizadores, que obligan a emplear polinizaciones manuales. Por estos problemas, el objetivo de este trabajo fue facilitar la mejora de la productividad del cultivo mediante el estudio de diferentes procesos implicados en la fecundación de las flores. Así, nos propusimos estudiar la fenología reproductiva de *Hylocereus undatus*, *Hylocereus purpusii* y JC01; evaluar su biología reproductiva y la interacción polen-pistilo, y evaluar distintos métodos de conservación de polen. Los resultados indican la existencia de varios episodios de floración, siendo el cultivar JC01 el de floración más temprana y frecuente. *H. purpusii* e *H. undatus* presentaron frecuente sincronía, lo que sugiere la plantación conjunta de ambas especies. Se ha verificado una marcada hercogamia de aproximación en la tarde-noche que tendió a desvanecerse en la mañana, facilitando el contacto entre anteras y estigma a partir de las 8:00 h. La dehiscencia de anteras comenzó en anthesis y se prolongó, en ausencia de polinizadores, durante todo el ciclo. La receptividad estigmática también es prolongada, permitiendo la polinización hasta el cierre de la flor. No obstante, la germinación del polen sugiere que el momento óptimo de polinización es a medianoche. Las mejores condiciones para la conservación del polen fueron 4°C, con humedad relativa del 70%, alcanzando solamente una conservación limitada a unos pocos días. Por las razones anteriores, se recomiendan plantaciones conjuntas (especie principal y polinizador), realizando polinizaciones en fresco a las 0:00 h. Los malos resultados en cuanto a la conservación del polen sugieren profundizar en esta línea de investigación.

Palabras clave. Conservación de polen, floración, polen, fenología, temperatura, humedad relativa.

ABSTRACT

The cultivation of pitaya (*Hylocereus* spp.) has reached an important boom in terms of production and market in recent years. The establishment of pitaya in the productive system of Almeria requires addressing challenges that affect its performance, such as its ephemeral and late evening flowering, the irregularity of its flowering cycles and the absence of pollinators, which force the use of hand pollination. Due to these issues, the objective of this work was to facilitate the improvement of the crop productivity through the study of different processes involved in the fertilization of flowers. Thus, we set out to study the reproductive phenology of *Hylocereus undatus*, *Hylocereus purpusii* and JC01; evaluate their reproductive biology and pollen-pistil interaction, and assess different pollen storage methods. The results indicate the existence of several bloom periods, being the JC01 cultivar the one with the earliest and most frequent blooming. *H. purpusii* and *H. undatus* showed frequent synchrony, suggesting the plantation of both species together. A marked hercogamy in the evening/night has been verified although tended to fade away in the morning, allowing the contact between anthers and stigma at 8:00 h. The dehiscence of the anthers began in anthesis and was prolonged, in the absence of pollinators, throughout the whole cycle. The stigmatic receptivity was also prolonged, allowing pollination until floral closure. However, pollen germination suggests that the optimum pollination time is midnight. The best conditions for pollen storage were at 4°C, with a relative humidity of 70%, achieving only a limited pollen conservation of a few days. For these reasons, mixed orchards with the main species and the pollen donor is recommended, carrying out pollination at 0:00 h. The poor results in terms of pollen storage suggest further research in this area.

Keywords. Pollen storage, blooming, pollen, phenology, temperature, relative humidity.

INTRODUCCIÓN

La Pitaya o Pitahaya corresponde a una planta perteneciente al orden *Caryophyllales*, familia *Cactaceae*, y género *Hylocereus*, el cual presenta 14 especies, siendo *H. undatus*, *H. costaricensis*, *H. monocanthus* y *H. megalanthus* (conocido previamente como *Selenicereus megalanthus*) las especies más cultivadas a nivel mundial (Kishore, 2016). En este contexto, debido a sus características como especie cultivada, *H. undatus* adquiere especial importancia, siendo objeto de amplios estudios hortícolas y fisiológicos (Valiente-Banuet et al., 2007). De acuerdo a Tel-Zur (2015), al igual que otras cactáceas, la pitaya posee una gran capacidad de adaptación a diversos tipos de estrés abiótico, tales como sequía y altas temperaturas, aunque presenta sensibilidad al exceso de radiación. Este comportamiento se ve facilitado por las características morfológicas y fisiológicas de la planta, tales como ausencia de hojas, modificación del tallo para almacenar agua (suculencia), apertura estomática nocturna, presencia de una capa cerosa sobre el tallo, y metabolismo fotosintético CAM (Rodríguez, 2000).

La pitaya corresponde a una especie perenne, hemiepífita y con tendencia trepadora, desarrollando un tallo triangular y acostillado. Suele presentar distintos periodos de floración a lo largo del año, los cuales se encuentran determinados directamente por el fotoperiodo (días largos), mientras que sus yemas florales dan origen a grandes flores hermafroditas hercógamas, de forma acampanada y apertura vespertina. Cada flor se desarrolla a partir de un ovario ínfero rodeado por su receptáculo, conformando el pericarpo, el cual presenta una serie de brácteas a su alrededor. Internamente, la flor presenta un gran número de estambres dispuestos en serie, con un único pistilo con estigma muy grande y ramificado (Kishore, 2016) (Figura 1).



Figura 1. Flor de pitaya.

Las flores comienzan su apertura durante la tarde, permaneciendo abiertas por la noche y presentando su cierre de pétalos cerca del mediodía. Por su parte, la polinización es llevada a cabo naturalmente por vectores nocturnos, tales como murciélagos y esfíngidos (Kaiser and Tollsten, 1995). Por otro lado, de acuerdo a Weiss et al. (1994), *H. undatus* es parcialmente autocompatible, y su autopolinización genera un reducido número de semillas y un menor porcentaje de cuajado de frutos (50-80%), mientras que a partir de polinización cruzada con clones compatibles de distinto material genético, es posible obtener un cuajado del 100% de las flores (Da Silva et al., 2011). Esta información, coincide con evaluaciones realizadas por Valiente-Banuet et al. (2007), quienes destacan el alto porcentaje de éxito de la polinización artificial cruzada en la obtención de frutos.

Los frutos son de tamaño medio a grande, de forma ovalada con un delicado sabor dulce en su pulpa, la cual contiene abundantes semillas comestibles. Las especies del género *Hylocereus* se suelen diferenciar por las características morfológicas de su fructificación, color de pulpa, areola y número y forma de espinas. En este caso, los frutos de *H. undatus* se caracterizan por presentar generalmente largas escamas, piel roja y pulpa blanca. En el

ámbito nutricional, la pitaya posee altos niveles de vitamina C, fósforo, calcio, contenido de fibra, antioxidantes y diversas propiedades medicinales (Tel-Zur, 2015).

Actualmente, la pitaya se encuentra ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales del mundo y su fruto es consumido tradicionalmente en países latinoamericanos (Weiss et al., 1994). La pitaya es nativa de bosques tropicales de México, América Central y la zona norte de Sudamérica. La producción de fruta se concentra en Colombia, Ecuador, Guatemala, Indonesia, México, Nicaragua, Perú, Taiwán y Vietnam. Sin embargo, recientemente se ha desarrollado en Australia, Israel, Japón, Nueva Zelanda, Filipinas, España y el suroeste de Estados Unidos (Valiente-Banuet et al., 2007).

En España, el cultivo de la pitaya es de reciente introducción y su producción se encuentra restringida a ciertas zonas del sureste de la península y Canarias. A pesar de ello, las producciones de pitaya en la Isla de Tenerife presentan muy buenos resultados, con precios que rondan los 9-12 €/kg, siendo Madrid y Barcelona los principales mercados. Este panorama permite vislumbrar un futuro comercial para la pitaya en la región, siendo uno de los frutos exóticos con mayor potencial a nivel de mercado (Hueso y Cuevas, 2014).

En Almería, la pitaya se establece generalmente en la periferia de los invernaderos y se perfila como una opción de gran valor como cultivo complementario para ampliar la gama de producción en la comarca, ofreciendo una opción rentable al agricultor local. Sin embargo, la incorporación de la pitaya al sistema productivo almeriense conlleva afrontar ciertos desafíos que afectan su rendimiento. En primer lugar, la introducción de este cultivo ha implicado recurrir a la polinización manual del mismo, ya que los vectores de polinización se hallan ausentes en la región. Esta circunstancia, genera un aumento en los costos de mano de obra, además de presentar la dificultad práctica de llevar a cabo la polinización en horas vespertinas cuando se produce la apertura de las flores. A pesar de lo anterior, la polinización manual del cultivo se justifica económicamente considerando el alto precio que alcanza en el mercado. El gran tamaño de las flores de pitaya y su bajo número relativo permite que las labores de polinización puedan ser realizadas con relativa comodidad en breve tiempo.

Para alcanzar el éxito en la polinización, es necesario considerar las características del polen en términos de viabilidad en el tiempo. Especialmente si se pretende optar por la polinización cruzada, ya que es posible que la variedad polinizadora y principal no presenten una sincronía en su floración, lo cual obliga a elaborar métodos de conservación de polen para emplear en el momento oportuno. Asimismo, la viabilidad inicial del polen en especies del género *Hylocereus* tiende a ser alta (90-94%), pero el periodo efectivo de polinización es muy breve, desde la apertura floral hasta apenas unas horas después, cerca de la tarde del día siguiente. Igualmente, polinizaciones más tardías originan frutos con menos semillas, y por lo tanto de menor peso (Weiss et al., 1994).

De esta manera, el objetivo de este trabajo se centra en mejorar la productividad en el cultivo de la pitaya mediante el estudio de diferentes procesos implicados en la polinización-fecundación de las flores. Al respecto, se estudiará la fenología reproductiva de distintos genotipos, incluyendo material genético con potencial polinizador y el cultivar principal. De igual forma, se analizará la biología reproductiva del cultivo y la interacción polen-pistilo en respuesta a polinizaciones *in vivo* considerando distintos horarios de ejecución. Finalmente, se determinará un método de conservación de polen a bajo coste, por un tiempo suficiente, y con una pérdida de viabilidad asumible.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y ubicación.

Las evaluaciones fueron realizadas durante los meses de junio a septiembre en clones cultivados de *Hylocereus undatus*, *Hylocereus purpusii*, y el genotipo JC01, introducido en España en el año 2000 desde Guatemala, y de identidad genética desconocida (Méndez et al., 2013). El material vegetal utilizado se encontraba establecido bajo un invernadero ubicado en la Estación Experimental Cajamar, Paraje Las Palmerillas, num. 25, El Ejido (36°47'41.80"N, 2°43'19.20"O). El invernadero empleado es de tipo parral modificado de 400

m², con cubierta de polietileno de baja densidad de 800 galgas de espesor. Los ensayos y evaluaciones experimentales se realizaron en laboratorios de la Universidad de Almería.

Fenología reproductiva.

Para el desarrollo de este seguimiento, se realizaron dos visitas semanales a la Estación Experimental de Las Palmerillas durante un periodo de cuatro meses (junio a septiembre), donde se evaluaron tres genotipos: *H. undatus*, *H. purpusii*, y JC01, en los cuales se realizó un seguimiento completo de la fenología reproductiva.

Se procedió a determinar la duración y solape de los diferentes periodos de floración, detectados mediante el registro periódico de las flores abiertas en cada especie. Además, se midió el tiempo necesario de botón a flor abierta, y de flor a fruto en los distintos genotipos de pitaya, evaluando una muestra de 10 flores por cultivar, las que fueron marcadas en el mes de junio, con el fin de identificar potenciales polinizadores y conocer los procesos, tiempos, duración y fechas estimadas de floración.

Interacción polen-pistilo y biología reproductiva.

Sobre una muestra de 10 flores de la variedad *H. undatus*, se procedió a determinar y cuantificar los procesos de receptividad estigmática mediante la adhesión de polen en flores polinizadas secuencialmente, y mediante el test de bencidina; la dehiscencia de anteras a partir de la observación y extracción de polen de las mismas; horario de despliegue y cierre de pétalos, y la distancia entre anteras y estigma utilizando un pie de rey digital (mm). Estas evaluaciones fueron realizadas a lo largo del periodo de apertura floral del día 6 de agosto de 2018, considerando los siguientes horarios: 21:30, 0:00, 8:00 y 12:00 h.

De igual forma, sobre dicha cohorte de flores se ha evaluado la germinación del polen y crecimiento del tubo polínico en distintos horarios tras la antesis de la flor. Para el desarrollo de este procedimiento, se realizaron polinizaciones manuales a las 21:30, 0:00, 8:00 y 12:00 h con polen recién recolectado perteneciente a la misma variedad, marcando las secciones de estigma polinizadas con códigos de colores (de un total de 24 lóbulos estigmáticos que como promedio contiene cada flor), con el fin de identificar las polinizaciones determinadas por los horarios establecidos, y así poder efectuar su seguimiento y análisis posterior. La recolección de las muestras polinizadas a las 21:30 h y 8:00 h fue realizada tras 24 h, mientras que las que fueron polinizadas a las 0:00 h y 12:00 h fueron recolectadas tras 20 h.

Las secciones de estigma polinizadas fueron recolectadas, dispuestas en FAE (fijador) y llevadas a laboratorio para su posterior análisis. Para la evaluación de viabilidad, las muestras fueron sometidas a un lavado previo durante 1 h, para luego ablandarlas durante 6 h en NaOH a 0.8 N. Tras ello, las muestras fueron expuestas a un segundo lavado durante toda la noche. Posteriormente, las secciones lavadas de estigma fueron dispuestas de forma individual sobre portaobjetos y se les tiñó con azul de anilina. Finalmente, cada muestra fue llevada a observación bajo microscopía de fluorescencia para evaluar visualmente la adhesión de polen, determinar su porcentaje de germinación y verificar el crecimiento de tubos polínicos.

Conservación de polen

Experimento 1. Evaluación de viabilidad de polen fresco a temperatura ambiente.

Para este ensayo se recolectaron anteras de flores abiertas pertenecientes a la variedad JC01 a las 8:30 h del día viernes 29 de junio de 2018. Los granos de polen fueron separados de las anteras mediante su tamizado. El polen obtenido fue sometido a evaluación de viabilidad a partir del test de diacetato de fluoresceína (FDA) a lo largo del mismo día, sin rehidratación previa y utilizando una solución de trabajo de FDA fresca tal y como indican Pinillos y Cuevas (2008). Se realizaron observaciones bajo microscopía de fluorescencia transcurridas 1, 3 y 5 h después de su extracción, realizando tres observaciones en cada horario evaluado, y cuantificando aquellos granos de polen viables y no viables de acuerdo a su nivel de fluorescencia. La viabilidad del polen se estableció como el porcentaje de granos de polen de color verde fluorescente intenso (Figura 2), considerando una muestra de 300 granos de polen por observación.

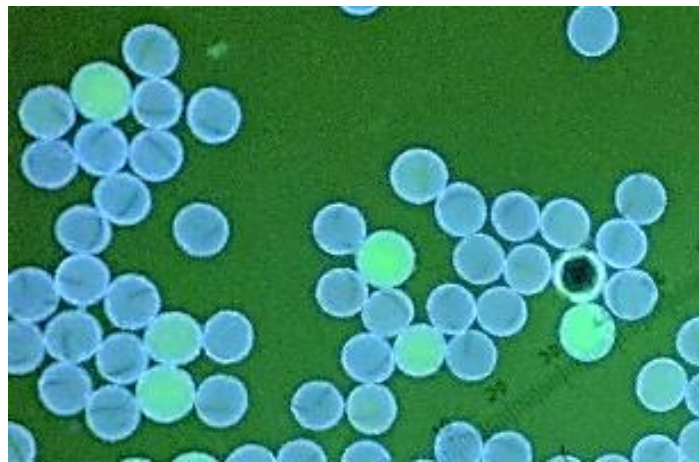


Figura 2. Granos de polen viables (verde intenso) y no viables (azul) bajo microscopía de fluorescencia.

Experimento 2. Efecto de la temperatura sobre la conservación del polen.

Teniendo en consideración el efecto supuestamente positivo de la deshidratación del polen para su conservación (Metz et al., 2000), muestras de polen fresco extraídas de flores de la especie *H. purpusii* fueron sometidas a desecación, para lo cual se han dispuesto en un recipiente con silica gel a temperatura ambiente. El polen se mantuvo en esas condiciones por 2 h. Posteriormente, se siguió un diseño completamente al azar, donde las muestras de polen desecado fueron sometidas a cuatro tratamientos de temperatura (TA, 4, -20 y -72°C) durante 24 h, con tres repeticiones por cada tratamiento, donde cada repetición consistió en una muestra de polen en un tubo Eppendorf. Luego, se procedió a rehidratar el polen por 1 h bajo condiciones de saturación de humedad, y se ejecutó el test de FDA, evaluando la viabilidad del polen mediante microscopía de fluorescencia, siguiendo el mismo procedimiento de ensayos anteriores. Se contabilizaron los granos de polen viables sobre un total de 200 granos por cada repetición.

El efecto de la temperatura de conservación sobre la viabilidad del polen de la variedad polinizadora *H. purpusii* fue analizado también sobre otras muestras de polen extraídas de flores abiertas en la noche entre el 25 y 26 de junio de 2018. Para ello, a las 8:30 h del día 26 de junio se recolectaron anteras que fueron llevadas a laboratorio, siendo sometidas a un tamizado de polen para su posterior almacenamiento en tubos Eppendorf de 1.5 ml a distintas temperaturas. En este ensayo, se empleó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones. Los cuatro tratamientos consistieron en la conservación del polen a temperatura ambiente (TA), 4, -20 y -72°C, mientras que cada repetición consistió en una muestra de polen en un tubo Eppendorf. Posteriormente, se evaluó la viabilidad cada 1, 2, 4 y 8 días mediante microscopía de fluorescencia. Previo a su observación bajo microscopía, las muestras de polen fueron expuestas a condiciones de saturación de humedad durante 1 h para rehidratar el polen conservado. Luego, se aplicó el test de FDA a las muestras rehidratadas y se observó bajo microscopio, siguiendo el mismo procedimiento del apartado anterior. La cuantificación de granos de polen viables se realizó sobre un total de 200 granos por cada repetición.

Experimento 3. Efecto de las temperaturas y la humedad relativa sobre la viabilidad del polen

A partir de la elaboración de soluciones con combinación de sales saturadas, se establecieron distintas condiciones de humedad relativa para la conservación del polen y anteras, con el fin de evaluar su efecto sobre la viabilidad del polen a lo largo del tiempo y bajo diferentes condiciones de temperatura. De esta manera, el polen fue conservado empleando

un diseño multifactorial (4x4) completamente al azar, donde el primer factor (temperatura) tuvo cuatro niveles (TA, 4, -20 y -72°C), mientras que el segundo factor, humedad relativa, tuvo otros cuatro niveles (10, 33, 50 y 70%). De esta forma, se ejecutaron 16 tratamientos con tres repeticiones cada uno, donde cada repetición consistió en una muestra de polen en un tubo Eppendorf. La viabilidad fue evaluada transcurridas 1, 2, 4 y 6 semanas mediante el test de FDA y observación bajo microscopía de fluorescencia.

Con el objetivo de valorar el efecto de la conservación del polen en el interior de las anteras, actuando estas como protectoras ("pollen carrier"), se repitió el ensayo anterior usando el mismo procedimiento y diseño experimental, pero conservando el polen en el interior de las anteras, en lugar de polen ya extraído.

Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos en las mediciones fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), ejecutado con el software estadístico Statgraphics® Centurion XVII. Ante la existencia de diferencias significativas, las medias fueron diferenciadas usando el test de Tukey ($P \leq 0.05$).

RESULTADOS

Fenología reproductiva.

A partir de finales del mes de mayo y hasta septiembre, se realizó un seguimiento del estado fenológico del cultivo de pitaya en su fase reproductiva. En el transcurso de este periodo, el cultivar JC01 fue el material con floración más temprana y que evidenció mayor continuidad a lo largo del tiempo, presentando distintas oleadas de floración durante su ciclo anual, y un breve solapamiento con la floración de *H. purpusii* hacia fines de mayo, y parte de junio y julio. Sin embargo, a partir de julio, la floración fue más escasa. Por su parte, la variedad *H. purpusii* presentó un desarrollo reproductivo mucho más marcado, denotando claros picos de floración en determinadas fechas. Finalmente, el cultivar *H. undatus* obtuvo un comportamiento similar a *H. purpusii* en cuanto a su cronología reproductiva, permitiendo que la floración de ambos genotipos coincidiera frecuentemente en varias fechas (Figura 3).

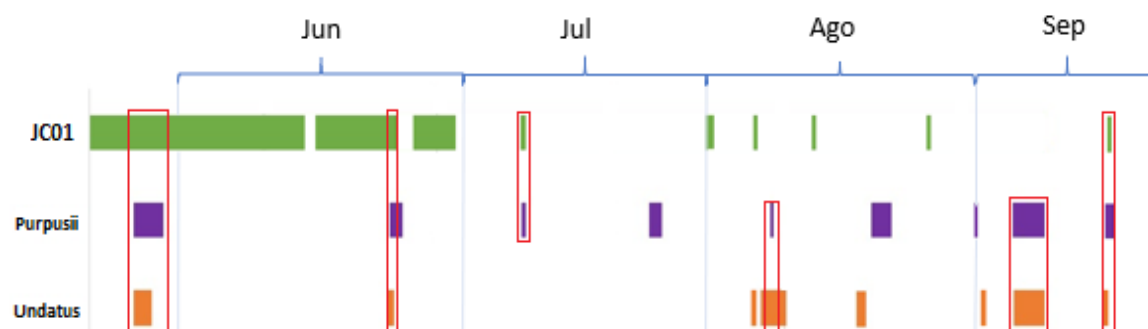


Figura 3. Seguimiento de la fenología reproductiva de tres cultivares de pitaya. Barras horizontales indican presencia de flores en antesis. JC01 (verde), *H. purpusii* (púrpura), *H. undatus* (anaranjado). Solapes de floración marcados en recuadro rojo.

Durante el periodo de evaluación del cultivo se determinó la duración media del desarrollo de botón floral a flor abierta en los diferentes materiales de pitaya. De esta forma, en el cultivar JC01 se midió un promedio de 19.7 días desde botón a flor abierta. En el cultivar *H. purpusii* la transición pareció más rápida ya que presentó una duración de 15.6 días, mientras que en *H. undatus* se obtuvo una duración aún menor de tan solo 14.5 días (Figura 4). Igualmente, se estimó la duración de flor a fruto. En JC01 esta transición tuvo una duración de 33.5 días, mientras que *H. purpusii* tardó un promedio de 30.2 días, y *H. undatus* presentó

una duración de 30.6 días en total, confirmando aparentemente sus menores requerimientos (Figura 5).

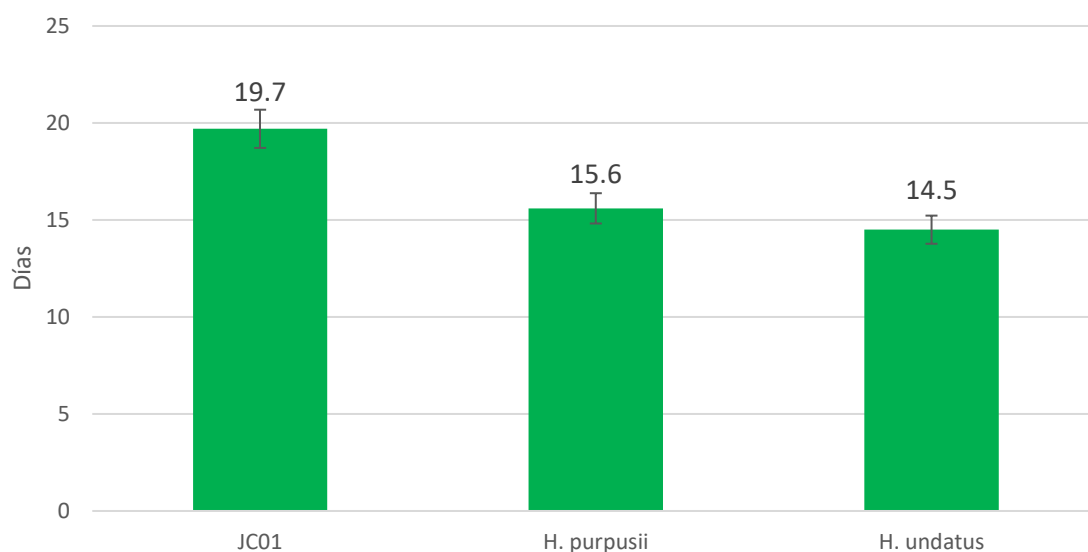


Figura 4. Días de botón floral a flor abierta en cultivares de pitaya. Datos promedio obtenidos a partir del seguimiento fenológico de una cohorte de 10 flores por cultivar.

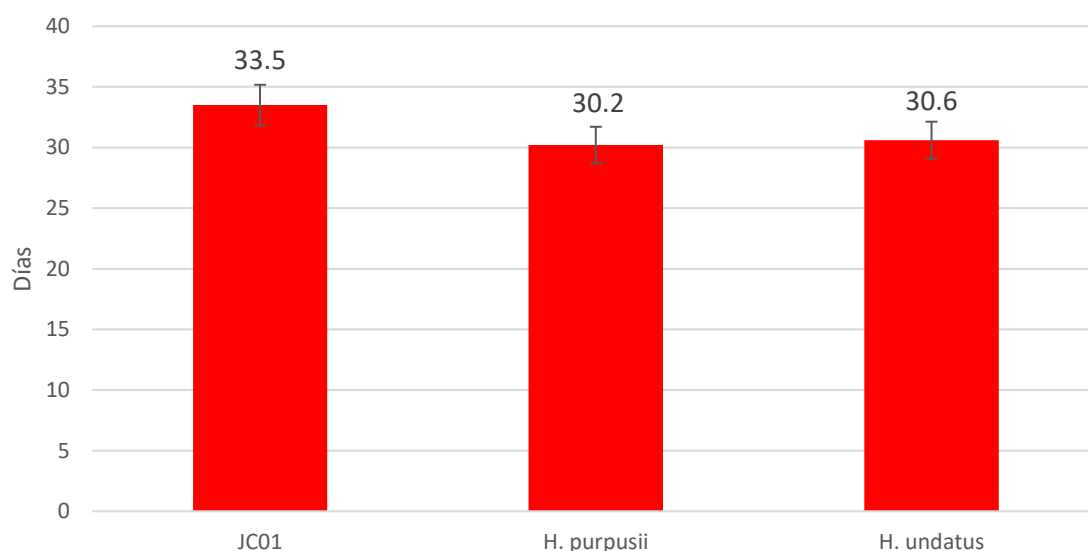


Figura 5. Días de flor a fruto en cultivares de pitaya. Datos promedio obtenidos a partir del seguimiento fenológico de una cohorte de 10 flores por cultivar.

Interacción polen-pistilo y biología reproductiva.

Se ejecutó una evaluación de la dehiscencia de las anteras, adhesión de polen y receptividad estigmática durante distintos horarios (21:30, 0:00, 8:00 y 12:00 h) en el periodo de antesis floral del cultivo de pitaya. Con respecto a la dehiscencia de anteras, se ha observado un comportamiento consistente en los distintos horarios evaluados, donde las anteras tienden a liberar polen de manera constante en todo el periodo de antesis. Esto significa que la dehiscencia de las anteras se produjo de un modo temprano, coincidiendo con el despliegue de los pétalos y, asimismo, la permanencia del polen en las anteras nos informa

de la ausencia de vectores eficientes en nuestras condiciones de cultivo para dispersar ese polen.

Por su parte, la tinción con bencidina mostró que la receptividad estigmática se mantuvo, en alguna medida, a lo largo de todo el periodo de antesis hasta el cierre de los pétalos. No se apreciaron diferencias marcadas en la reacción al test de bencidina en la base, centro, y extremo de cada prolongación estigmática evaluada (Figura 6).



Figura 6. Tinción en prolongación estigmática sometida al test de bencidina.

En cuanto al horario de apertura y cierre de pétalos, se ha determinado el comienzo de dicha apertura a las 21:30 h aproximadamente, mientras que el cierre total se produce en torno a las 13:30 h del día siguiente.

Por otro lado, se determinó la distancia existente entre las anteras y estigma durante el periodo de apertura floral. Este parámetro presentó variaciones en el transcurso de la noche, donde en las primeras horas de apertura (21:30 h) se observó una distancia marcada que derivó en un promedio de 8.48 mm entre anteras y estigma. Esta separación tendió a disminuir conforme avanzaban las horas, hasta evidenciar una nula distancia en las primeras horas del día (8:00 h) y al final de la antesis (Figura 7).

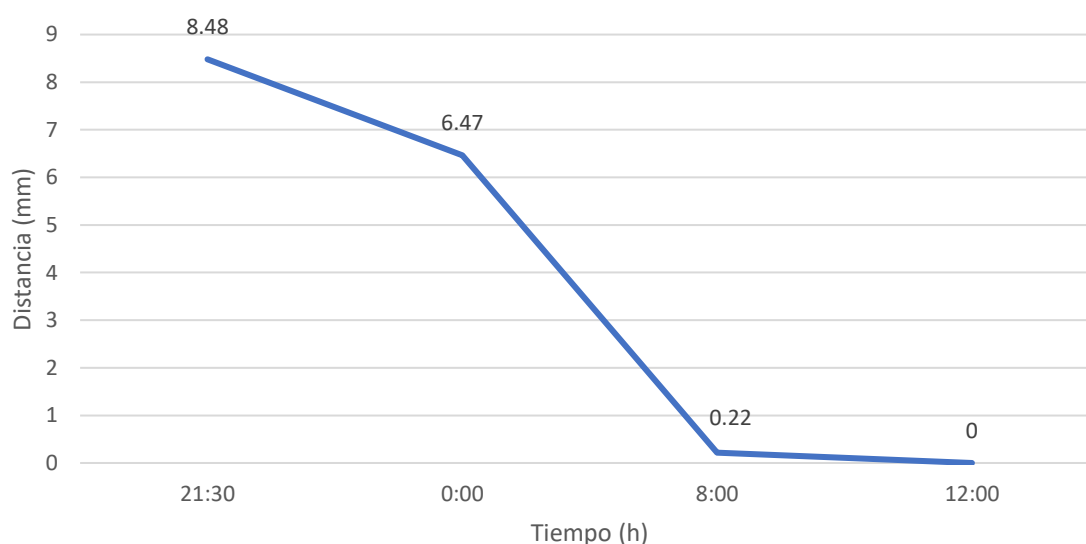


Figura 7. Evolución de la distancia entre anteras - estigma (mm) en el tiempo (h).

Los datos muestran un aumento de la germinación de polen a partir de antesis, llegando a su nivel de germinación máximo a las 0:00 h, para luego disminuir progresivamente hasta el cierre de pétalos (Figura 8). Así, se han observado mayores niveles de germinación del polen (27.2%) en la zona media del estigma en las muestras polinizadas a las 21:30 h (Figura 9). Los estigmas polinizados algo después, a medianoche, presentaron igualmente una mayor cantidad de granos de polen germinados también en la zona central, pero con un mayor porcentaje en este caso, alcanzando un 46.5%. En la polinización realizada a las 8:00 h del día siguiente, se obtuvo mayor germinación de granos de polen en la zona basal del estigma (19.7%), al igual que en las muestras polinizadas a las 12:00 h (14.4%), reflejando una tendencia espacial de la receptividad del estigma. Por otro lado, la adhesión de polen en el estigma mantuvo niveles altos en todos los horarios evaluados, donde se evidenció una amplia cobertura de granos de polen en las distintas regiones estigmáticas.

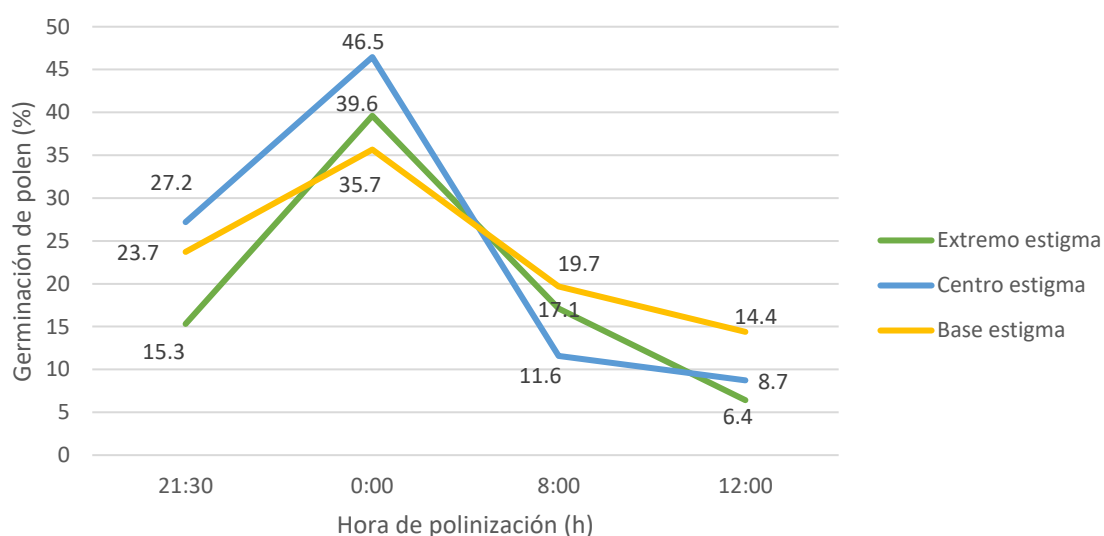


Figura 8. Porcentaje de germinación de granos de polen en estigma de acuerdo a distintos horarios de polinización.

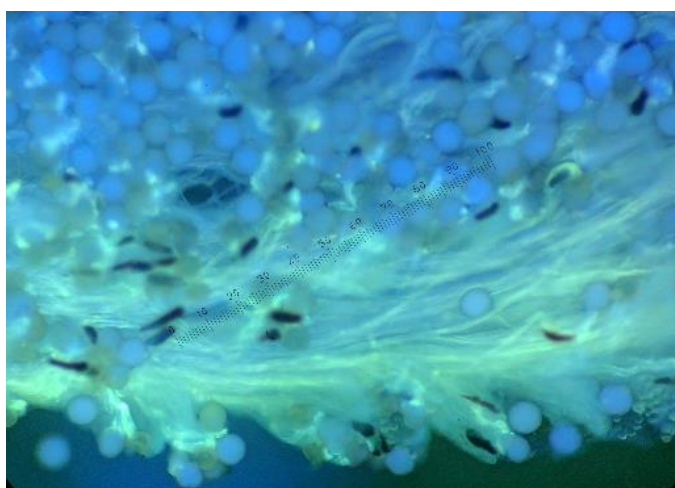


Figura 9. Germinación de granos de polen y emisión de tubos polínicos en zona media del estigma.

Conservación de polen

Experimento 1. Evaluación de viabilidad de polen fresco a temperatura ambiente.

La viabilidad de los granos de polen evaluada inicialmente refleja un porcentaje del 63.3%. Este valor de partida, tiende a disminuir al cabo de 1 h bajo condiciones de temperatura ambiente, cuando se midió un valor del 49% de viabilidad. Tras 5 h, la viabilidad disminuyó hasta un 41%, mientras que al cabo de 7 h este valor llegó al 38% (Figura 10).

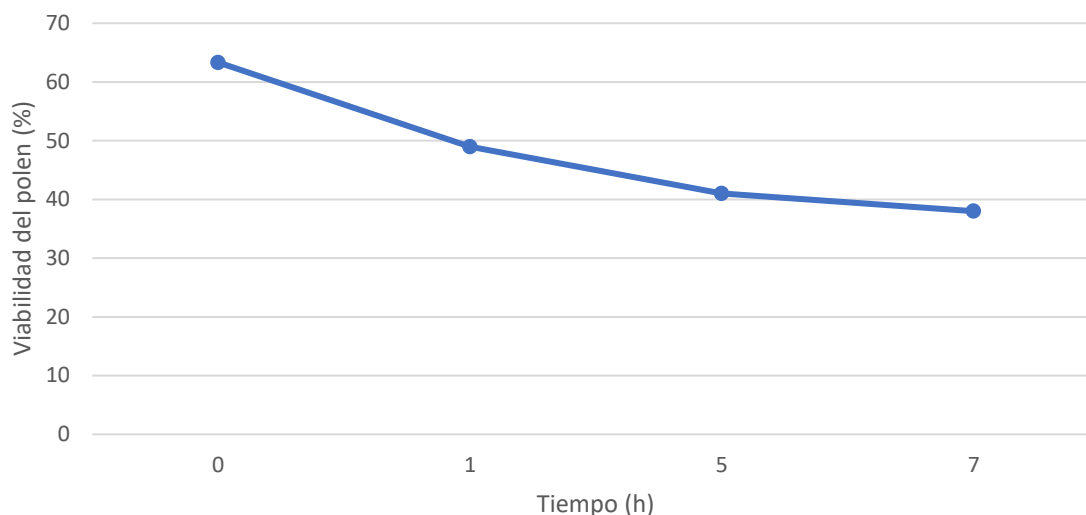


Figura 10. Porcentaje de viabilidad de polen fresco conservado a temperatura ambiente (TA) en el tiempo (h).

Experimento 2. Efecto de la temperatura sobre la conservación del polen.

El tratamiento de desecación con silica gel no tuvo efectos positivos sobre la viabilidad del polen, independientemente de la temperatura de almacenamiento a la que fueron sometidas las muestras. De esta manera, se obtuvo una viabilidad del 0% en todos los tratamientos evaluados.

Durante los ensayos, se observó que el polen conservado a temperatura ambiente perdió rápidamente la viabilidad durante el periodo de evaluación. El polen conservado a 4°C, por el contrario, obtuvo los mejores índices de viabilidad, con un promedio de 17.1% de viabilidad en el primer día de evaluación. Dicho valor presentó diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos ($P=0.001$). Sin embargo, la viabilidad a los 4°C disminuyó a apenas un 2.3% al día siguiente, y llegó a niveles nulos a partir del cuarto día de análisis. Por su parte, aquellas muestras conservadas a -20°C presentaron una viabilidad ínfima del 0.8% ya en el primer día de evaluación. Finalmente, el polen conservado a -72°C no mostró viabilidad en ninguno de los días de evaluación (Figura 11).

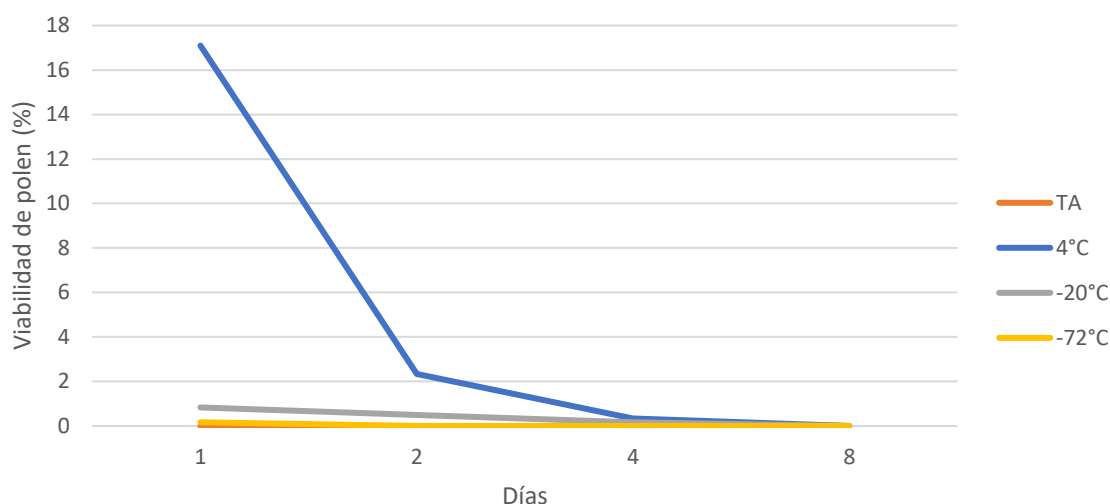


Figura 11. Porcentaje de viabilidad del polen a distintas temperaturas en el tiempo (días).

Experimento 3. Efecto de las temperaturas y la humedad relativa sobre la viabilidad del polen

En el transcurso de este ensayo, se buscó determinar las mejores condiciones de conservación de polen, ya sea mediante el almacenaje de anteras o de polen tamizado (sin anteras), en condiciones de temperatura y humedad relativa controladas. Los resultados obtenidos reflejan que el polen tamizado conservado a 4°C presentó diferencias significativas con el resto de los tratamientos ($P=0.001$) durante todas las semanas de evaluación, presentando los valores de viabilidad más altos del ensayo. Las condiciones de humedad relativa de conservación produjeron resultados erráticos. Los mejores resultados en términos de viabilidad se obtuvieron a 10% y 70% en la semana 1, 70% en la semana 2, y 33% y 50% en la semana 4 y 6 (Tabla 1).

Por otro lado, la conservación del polen en el interior de las anteras no presentó mejoras en comparación al polen tamizado. En este contexto, el resultado más prometedor se evidenció nuevamente a una temperatura de 4°C. Igualmente, cabe destacar que, durante las primeras dos semanas, la humedad relativa más elevada (70%) tuvo algunos efectos positivos sobre el mantenimiento de la viabilidad de polen. Sin embargo, a partir de la cuarta semana, dicha viabilidad cayó rápidamente (Tabla 2).

Tabla 1. Porcentaje medio de viabilidad de polen TAMIZADO bajo conservación en condiciones determinadas de Temperatura (T) y Humedad Relativa (HR).

Factor	Valor	Semana 1	Semana 2	Semana 4	Semana 6
		Viabilidad (%)			
Temperatura (°C)	25	8.58b	2.16c	0.21b	0b
	4	17.63a	12.29a	4.29a	2.33a
	-20	3.00c	0.08d	0b	0b
	-72	9.41b	7.63b	0.08b	0b
Humedad Relativa (%)	10	11.45a	4.71c	0.13c	0c
	33	7.79b	5.42bc	2.54a	1.29a
	50	7.75b	5.67ab	1.67b	1,04b
	70	11.63a	6.38a	0,25c	0c

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey a $P \leq 0.05$.

Tabla 2. Porcentaje medio de viabilidad de polen en ANTERAS bajo conservación en condiciones determinadas de Temperatura (T) y Humedad Relativa (HR).

Factor	Valor	Semana 1	Semana 2	Semana 4	Semana 6
		Viabilidad (%)			
Temperatura (°C)	25	1.58c	0.17c	0b	0b
	4	4.83a	4.58a	2.29a	0.29a
	-20	0.25d	0.17c	0b	0b
	-72	2.38b	2.46b	0b	0b
Humedad Relativa (%)	10	3.38a	1.88b	0.96a	0.08a
	33	1.25b	1.13c	0.21b	0.17a
	50	1.38b	1.29bc	0.75a	0.04a
	70	3.04a	3.08a	0.38b	0a

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey a $P \leq 0.05$.

DISCUSIÓN

Fenología reproductiva.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la variedad JC01 es la que presenta el desarrollo floral más temprano de los tres cultivares presentes, lo cual coincide con lo planteado por Méndez et al. (2013), aunque tarda un poco más en alcanzar los estados de flor abierta y fruto. Por el contrario, la variedad *H. undatus* posee un desarrollo de botón a flor abierta más acelerado. Por su parte, *H. purpusii* presenta un desarrollo de floración y fructificación que se mantiene entre los rangos temporales de los otros dos cultivares. En este contexto, el tiempo de desarrollo de flor a fruto se aproxima a los resultados obtenidos en Israel y Vietnam, donde midieron de 28 a 30 días de duración en la conversión de flor a fruto (Osuna et al., 2016). Estas ligeras diferencias en días podrían dificultar la polinización cruzada en el cultivo, ya que incidiría en la sincronía de la floración entre la variedad polinizante y la principal. El desarrollo de estrategias que permitan la conservación de polen cuando se produce este desajuste sincrónico de la floración podría, por el contrario, ayudar, de manera que el polen de la variedad polinizadora pueda ser utilizado oportunamente cuando la floración de la variedad receptora se presente.

En este estudio, se aprecia que la variedad JC01 presenta un mayor número de floraciones, si bien algunas de corta duración y ligera intensidad. Este comportamiento permite que este cultivar pueda ser empleado como polinizante, ya que el polen de una flor donante permite la polinización de 10 flores receptoras. Méndez et al. (2009) destacan su alta compatibilidad con flores de distintas especies y su buena productividad. Por otro lado, *H. purpusii* presenta una floración esporádica e irregular en el tiempo, lo que dificulta su empleo como variedad principal. Además, sus frutos tienden a rajarse y es especialmente sensible al ataque de pulgones (Méndez et al., 2013). Sin embargo, al presentar compatibilidad con *H. undatus* y otros genotipos, podría ser utilizado como polinizante. Es importante destacar que la floración de *H. purpusii* coincide a menudo con la floración de JC01, y especialmente con la de *H. undatus*, con frecuentes solapes de floración. En cualquier caso, sería relevante evaluar, en futuras investigaciones, la coincidencia de la floración a lo largo de varias temporadas, con el fin de saber si esta sincronía de la floración sigue un patrón constante a lo largo de distintos ciclos productivos.

Interacción polen-pistilo y biología reproductiva.

La alta especificidad de la floración de pitaya, junto con su comportamiento efímero, exigen que cada uno de los procesos asociados a dicha floración presenten una estrecha

sincronía. En este contexto, la relación entre dehiscencia de anteras y receptividad estigmática juega un papel fundamental en el éxito reproductivo de la pitaya. En este estudio, la dehiscencia de las anteras temprana y continua permite asumir que la disponibilidad de polen no sería un factor limitante en el éxito de la polinización. Al respecto, Weiss et al. (1994), coinciden en que las anteras comienzan su dehiscencia incluso 1 h antes de la antesis. Un resultado similar fue obtenido por Le Bellec et al. (2006), quienes afirman que la dehiscencia de anteras tiene lugar incluso horas antes de la apertura completa de la flor.

Por otro lado, se ha reportado que la pitaya suele presentar una hercogamia de aproximación bastante notoria (Tran et al., 2015), lo que representaría una estrategia alógama para promover la polinización cruzada y favorecer la variabilidad genética de las semillas. Sin embargo, los estudios realizados en este trabajo dan cuenta de una progresiva disminución de la distancia entre anteras y estigma a lo largo del tiempo, lo cual podría justificar una segunda estrategia reproductiva de la flor, esta vez para favorecer la autopolinización ante la eventualidad de que la polinización cruzada no se haya efectuado previamente, lo cual consistiría en una polinización de emergencia autógena. De esta forma, en este ensayo se obtuvo una distancia mínima de 0.5 cm, y una máxima de 1.2 cm entre ambas estructuras en las primeras horas de antesis. Sin embargo, esta separación fue disminuyendo conforme avanzaba el periodo de apertura floral, llegando a entrar en contacto a partir de las 8:00 h. Este parámetro ha sido escasamente abordado en estudios realizados sobre este cultivo. Weiss et al. (1994) observaron una distancia de hasta 2 cm entre anteras y estigma en el género *Hylocereus* spp., mientras que *H. megalanthus* presentaba ambas estructuras a un mismo nivel, permitiendo que las anteras contacten con el estigma. No hay estudios que den cuenta de la evolución de la distancia entre anteras y estigma a lo largo del periodo de apertura floral.

Por otro lado, el horario de apertura y cierre floral obtenido en esta evaluación difiere con respecto a lo reportado por otros autores. Sin embargo, esto se debe a diferencias en la fecha de observación y hora de la puesta de sol en la que se ejecutaron los ensayos. En el estudio llevado a cabo por Valiente-Banuet et al. (2007), las flores de *H. undatus* comenzaron su apertura al atardecer (cerca de las 19:00 h), y su cierre dio inicio a las 11:00 h, con un tiempo de antesis de 17 h. Por su parte, las observaciones ejecutadas por Le Bellec et al. (2006) guardan una mayor proximidad con los resultados obtenidos en este estudio, ya que el horario de apertura se presentó a las 20:00 – 20:30 h. De esta forma, se puede asumir que el periodo de flor abierta oscila entre 16 y 17 h.

La evaluación de la germinación del polen sobre el estigma en distintos horarios provee de información valiosa con respecto al momento óptimo para realizar las labores de polinización manual. Los resultados reflejan que el mayor porcentaje de germinación de granos de polen se obtiene a medianoche, con un máximo de 46.5% de germinación en la zona media del estigma. Este valor fue disminuyendo progresivamente hasta llegar a un porcentaje mínimo del 6.4% a mediodía del día siguiente. Al respecto, Weiss et al. (1994) aseveran que la germinación del polen es mayor cuando las flores comienzan su apertura y presentan un leve declive progresivo a la mañana siguiente, mientras que *H. undatus* presenta este descenso más tarde, pasado el mediodía del día después de antesis, cuando las flores se encuentran ya cerradas.

No hay referencias que den cuenta de la germinación del polen en función de las distintas regiones del estigma. Sin embargo, las evaluaciones realizadas en este ensayo reflejan que existe mayor germinación en la zona central del estigma, y que a las 0:00 h se da el mejor momento para este desarrollo. Igualmente, este ensayo refleja un envejecimiento aparente de los distintos segmentos estigmáticos, determinado por un menor nivel de germinación, donde a mediodía el ápice del estigma envejece más rápido, luego el centro, y finalmente la base. De esta forma, sería interesante realizar un estudio anatomofisiológico del estigma en futuras investigaciones. Por otro lado, el hecho de que la dehiscencia de anteras ocurra de forma temprana y que el estigma presente sus niveles óptimos de germinación de polen a la medianoche, indica la presencia de una ligera dicogamia en el cultivo.

Conservación de polen

Experimento 1. Evaluación de viabilidad de polen fresco a temperatura ambiente.

Inicialmente se evaluó la variación de la viabilidad del polen en el tiempo tras una conservación sin control de humedad relativa y a temperatura ambiente. Los resultados indican que la viabilidad disminuye rápidamente tras las primeras horas de conservación, de modo que, al cabo de 7 h ha habido una pérdida de viabilidad del 25.3%. Este resultado coincide con los estudios realizados por Metz et al. (2000), quienes destacan que el polen pierde su fertilidad tras 1 día a temperatura ambiente. Los valores obtenidos en este ensayo indican que no sería factible conservar el polen bajo estas condiciones más allá de unas horas.

Experimento 2. Efecto de la temperatura sobre la conservación del polen.

De acuerdo a Metz et al. (2000), la desecación del polen con silica gel permitiría implementar métodos de conservación del polen más prolongados. Sin embargo, en este trabajo, la desecación en las condiciones aquí evaluadas no tuvo efectos positivos, obteniendo una viabilidad nula del polen en todos los tratamientos. Estos resultados coinciden con los ensayos realizados por Macha et al. (2006), donde el polen conservado en silica gel no germinó, indicando que el polen pierde completamente su viabilidad bajo condiciones de sequedad y ante solventes orgánicos, de manera que este método de conservación se descartaría.

Por otro lado, los resultados obtenidos al influir sobre la temperatura de conservación de los granos de polen, indican que sólo las temperaturas de 4°C permitieron una moderada viabilidad del polen al cabo de 1 día de almacenamiento (17.1%). A pesar de lo anterior, este valor podría ser insuficiente, sobre todo si se tiene en cuenta que, al cabo del segundo día, la viabilidad cae a un 2.3%, y a un 0.3% al tercer día de evaluación. El resto de las temperaturas evaluadas (TA, -20, -72°C) presentaron niveles de viabilidad de polen muy bajos. Considerando lo anterior, la conservación de polen incidiendo sobre el factor temperatura por sí sólo no sería suficiente para mantener la viabilidad del polen a mediano plazo.

Experimento 3. Efecto de las temperaturas y la humedad relativa sobre la viabilidad del polen.

Por lo expuesto anteriormente, otros experimentos evaluaron la conservación de polen incidiendo sobre la temperatura y humedad relativa de almacenamiento. Los resultados indican que la temperatura de 4°C vuelve a ser la que ofrece los mejores resultados, particularmente a una humedad relativa del 70% durante las primeras dos semanas de evaluación.

Se confirma, por otra parte, que el polen de pitaya evaluado es especialmente sensible a temperaturas de congelación. Una de las explicaciones ante esta sensibilidad puede residir en el posible desarrollo de alteraciones fisiológicas internas en el grano de polen (Stanley and Linskens, 1974), o en la formación de cristales de hielo que pueden generar la pérdida de la semipermeabilidad y compartimentación celular producto de la rotura de membranas (Salomom, 2003).

Los resultados de este ensayo difieren en parte con lo propuesto por Metz et al. (2000), quienes observaron que, en su caso, las temperaturas de congelación permitían conservar el polen viable por más tiempo (3-9 meses), obteniendo polinizaciones exitosas que generaban un cuajado de frutos del 100%, mientras que a una temperatura de 4°C sólo se obtenía un cuajado del 60-70%. También se hallaron resultados discrepantes con lo expuesto por Fagundes (2017), donde se obtuvo que a 4°C la viabilidad del polen disminuía drásticamente en comparación a temperaturas más bajas.

Por otro lado, en este trabajo se propuso la premisa de que la conservación de anteras podría tener una influencia positiva en el mantenimiento de la viabilidad del polen. Sin embargo, la viabilidad resultante fue muy baja, obteniendo incluso peores resultados que con el uso de polen tamizado, por lo que se descartaría como método de conservación.

CONCLUSIONES

- La fenología reproductiva del cultivo de pitaya evaluado permite establecer que la variedad JC01 presenta ciclos de floración frecuentes, siendo factible de ser empleada como polinizante y/o receptor de polen, mientras que *H. purpusii* presenta una floración esporádica similar a *H. undatus*, y buenas características como donador de polen. Por su parte, la frecuente sincronía floral entre *H. undatus* y *H. purpusii* facilita las labores de polinización cruzada y permite recomendar la plantación de ambos cultivares en la misma explotación.
- La disponibilidad de polen (dehiscencia de anteras) y la receptividad estigmática no representan un factor limitante, ya que ambos parámetros presentan resultados positivos a lo largo de la antesis.
- La hercogamia de aproximación característica del cultivo tiende a desvanecerse en el tiempo, permitiendo el contacto directo entre anteras y estigma a partir de las primeras horas de la mañana.
- El porcentaje de germinación de los granos de polen es mayor en polinizaciones realizadas a partir de la antesis floral, alcanzando su máximo potencial germinativo a las 0:00 h en la zona central de las prolongaciones estigmáticas. A mediodía, el nivel de germinación del polen presenta su nivel más bajo. Se recomienda, por lo tanto, realizar las polinizaciones cerca de la medianoche, evitando polinizaciones tardías.
- La conservación de polen a temperatura ambiente no permite mantener niveles óptimos de viabilidad en el tiempo, generando una pérdida rápida de la misma al cabo de un día. Igualmente, la conservación de polen desecado en silica gel a distintas temperaturas de almacenamiento no genera buenos resultados, obteniendo una viabilidad nula en todos los tratamientos. De esta forma, no se recomienda el empleo de estos métodos aislados en la conservación de polen.
- La combinación de temperaturas de 4°C con una humedad relativa del 70% presenta los resultados más prometedores. Sin embargo, la conservación de polen bajo estas condiciones se limita a unos pocos días.
- La conservación de polen en el interior de las anteras no genera buenos resultados sobre la viabilidad del polen, obteniendo peores niveles que cuando se usa polen tamizado.

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación María Teresa Brown de Ariztía por su ayuda en el financiamiento de mis estudios de Máster. A mis tutores Julián Cuevas y Juan José Hueso por su apoyo y orientación durante el desarrollo de este trabajo.

Literatura citada

- Da Silva, A., Geraldo, A., and Cavallari, L. (2011). Fruit quality of pitaya as a function of pollination time, pollen source and environment for cultivation. *Rev. Bras. Frutic.* 33(4), 1162-1168 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452011000400014>
- Fagundes, M. C. P. (2017). Conservation and viability of dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus* Weber) pollen grains. 48 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Hueso, J.J., y Cuevas, J. (2014). La fruticultura del siglo XXI en España. *Cajamar Caja Rural.* 373-377.
- Kaiser, R., and Tollsten, L. (1995). An introduction to the scent of cacti. *Flavour and Fragrance J.* 10, 153-164 <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.2730100307>
- Kishore, K. (2016). Phenological growth stages of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) according to the extended BBCH-scale. *Sci. Hortic.* 213, 294-302 <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.10.047>
- Le Bellec, F., Vaillant, F., and Imbert, E. (2006). Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a new fruit crop, a market with a future. *Fruits* 61(4), 237-250 <http://dx.doi.org/10.1051/fruits:2006021>

- Macha, M. M., Chowdhury, A. K., Murata, T., and Yonemoto, Y. (2006). Effect of artificial media, temperature conditions and storage methods on in vitro germination of dragon fruit (*Hylocereus undatus* Britt & Rose) pollen. *Jpn. J. Trop. Agr.* 50(1), 51-56 <http://doi.org/10.11248/jsta1957.50.51>
- Méndez, C., Coello, A., y Galán Saúco, V. (2009). Posibilidad de cultivo de distintas pitayas rojas (*Hylocereus* spp.) en la Isla de Tenerife. *Agropalca* 14, 145-150.
- Méndez, C., Coello, A., y Galán Saúco, V. (2013). Variedades de pitaya roja. *Agrocabildo*, 1-18.
- Metz, C., Nerd, A., and Mizrahi, Y. (2000). Viability of pollen of two fruit crop cacti of the genus *Hylocereus* is affected by temperature and duration of storage. *HortScience* 35(2), 199-201.
- Osuna, T., Valdez, J., Sañudo, J., Muy, M., Hernández, S., Villarreal, M., y Osuna, J. (2016). Fenología reproductiva, rendimiento y calidad del fruto de pitahaya (*Hylocereus undatus* (How.) Britton and Rose) en el valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Agrociencia* 50(1), 61-78.
- Pinillos, V. y Cuevas, J. (2008). Standardization of the fluorochromatic reaction test to assess pollen viability. *Biotechnic and Histochemistry*, 83 (1), 15-21 <http://dx.doi.org/10.1080/10520290801987204>.
- Rodríguez C., A. (2000). Pitahayas: estado mundial de su cultivo y comercialización. Fundación Yucatán Produce, A. C., Universidad Autónoma Chapingo. Maxcanú, Yucatán, México. 153 p.
- Salomom, M. V. (2003). Trigo: avaliação de linhagens diplóides obtidas via cultura de anteras. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP. 180 p.
- Stanley, R.G., and Linskens, H.F. (1974). *Pollen: biology, biochemistry and management*. New York: Springer Verlag. pp.172.
- Tel-Zur, N. (2015). R&D of Pitahayas – Dragonfruit – Vine Cacti: Limitations and Challenges and the Current Global Market. *Acta Hort.* 1067, 365-370 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1067.50>
- Tran, H., Yen, C., and Chen, Y. (2015). Effect of pollination method and pollen source on fruit set and growth of red pitaya (*Hylocereus* spp.) in Taiwan. *The J. of Hort. Sci. and Biotech.* 90(3), 254-258 <https://doi.org/10.1080/14620316.2015.11513179>.
- Valiente-Banuet, A., Santos Gally, R., Arizmendi, M., and Casas, A. (2007). Pollination biology of the hemiepiphytic cactus *Hylocereus undatus* in the Tehuacán Valley, México. *J. of Arid Environments* 68(1), 1-8 <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2006.04.001>.
- Weiss, J., Nerd, A., and Mizrahi, Y. (1994). Flowering behavior and pollination requirements in climbing cacti with fruit crop potential. *HortScience* 29(12), 1487-1492.