

Viabilidad y morfología del polen de diferentes materiales de palma de aceite

Luz Ángela Sánchez Rodríguez¹, Hernán Mauricio Romero^{1, 2*}

Notas del Director

El Programa de Biología y Mejoramiento de la Palma de Aceite, que adelanta Cenipalma, se enfoca en determinar los mecanismos de adaptación de la palma de aceite a las condiciones limitantes del cultivo en Colombia, y entre sus acciones y experimentos incluyó el tema de fisiología de germinación del polen.

La fertilidad del polen depende de muchos factores: ambientales (humedad, temperatura, composición de la atmósfera y presión parcial de oxígeno), genéticos (morfología del polen - forma y tamaño), la germinación (porcentaje y tasa), el crecimiento, la viabilidad y la capacidad de competencia germinativa.

En esta publicación presentamos los avances de la investigación sobre la viabilidad y morfología del polen de los materiales *E. guineensis*, *E. oleifera* y del híbrido O_xG, factor de gran importancia para la producción de aceite y para los programas de mejoramiento genético.

Se presentan los resultados de dos técnicas de tinción, ambas sensibles, rápidas y útiles, que se convierten en una alternativa interesante en la búsqueda de la calidad del polen, y en los pasos siguientes del estudio de su fisiología.

José Ignacio Sanz Scovino, Ph.D.

Director Ejecutivo de Cenipalma

Introducción

Los programas de mejoramiento en palma de aceite están dirigidos a la introgresión de genes de la especie silvestre americana (*Elaeis oleifera*, Cortés) en las líneas avanzadas de mejoramiento de palma africana (*Elaeis guineensis*, Jacq.), para obte-

ner el híbrido interespecífico O_xG, el cual presenta tolerancia a algunas enfermedades, tiene una tasa reducida de crecimiento y mejor calidad de aceite. No obstante, en este proceso se han encontrado problemas con la reproducción relacionados con la viabilidad del polen. El híbrido O_xG tiene valores muy bajos de viabilidad (<6%), en contraste con los de la especie *E. oleifera* (20 a 60%) y la *E. guineensis* (>70%) (Alvarado *et al.*, 2000). Es así como la baja viabilidad del polen del híbrido O_xG dificulta su mejoramiento genético; además de resultar en una menor cantidad de frutos fecundados por racimo que afecta negativamente la producción.

La formación de polen fértil no solo depende de factores ambientales tales como humedad, temperatura, composición de la atmósfera y presión parcial de oxígeno, sino que también se ve determinada por características genéticas como la morfología del polen (forma y tamaño), la germinación (porcentaje y tasa), el crecimiento del tubo polínico, la viabilidad y la capacidad de competencia germinativa (Davarynejad *et al.*, 2008). De esta forma, los estudios de la morfología polínica permiten identificar las adaptaciones del polen a factores como el medio ambiente, las interacciones polen-polen, polen-estigma intra e interespecíficas y el medio de dispersión por el viento, agua o la acción de animales. También, es reconocida como una técnica taxonómica para el estudio de familias botánicas que permite la agrupación de poblaciones genéticas (Salgado-Labouriau, 1973).

La determinación precisa de la fertilidad del polen de la palma de aceite es de gran importancia y puede ser estimada mediante varias técnicas, entre las que se encuentra la tinción con colorantes nucleares *in vivo* (Riano y Dafni, 2000). Con esta técnica se logra distinguir los granos de polen vivos, a diferencia de las técnicas de germinación *in vitro*, que evalúan la capacidad del polen para producir un tubo polínico como medida de su fertilidad (Davarynejad *et al.*, 2008). Se han utilizado varios colorantes para diferenciar el polen viable y no viable en las plantas, entre los cuales se encuentran el acetocarmin para la tinción de cromosomas (Arnaud, 1980, Orillo y Bonierbale, 2009), la tinción con diclorhidrato de 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), una sustancia fluorescente que tiñe los ácidos nucleicos y permite ver los núcleos de las células al usar el microscopio de fluorescencia (Coleman y Goff, 1985, Barcellona *et al.*, 2004).

El polen de las palmas ha sido objeto de numerosos estudios taxonómicos y sistemáticos durante los últimos cuarenta años.

¹ Programa de Biología y Mejoramiento de la Palma, Centro de Investigación en Palma de Aceite – Cenipalma

² Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia

* Autor para correspondencia E-mail: hromero@cenipalma.org

- Los primeros estudios detallados sobre morfología polínica se iniciaron con Erdtman hacia 1920, quien fue el primero en proponer una metodología de clasificación de polen y esporas, basado en la posición, número y forma de las aperturas del grano. La gran diversidad de formas, tamaños, aperturas, caracteres estructurales y esculturales de la exina son una manifestación de la adaptación que asegura que el polen pueda llegar hasta el estigma de la flor por varios medios como la gravedad, el viento, el agua, y los insectos. (Erdtman, 1986; Fonnegra, 1989).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad y morfología de los granos de polen de los materiales *E. guineensis*, *E. oleifera* y del híbrido OxG por medio de dos técnicas de tinción.

Materiales y métodos

Se utilizaron individuos de palma africana (*Elaeis guineensis*, Jacq.) provenientes de la colección biológica de origen Angola y materiales comerciales como testigo, establecidos en el Campo Experimental Palmar de La Vizcaína; palmas oleifera (*Elaeis oleifera*, Cortés) provenientes de plantaciones comerciales establecidas antes de 1993 y palmas pertenecientes al híbrido interespecífico OxG de varias plantaciones. De allí se realizó una colecta de inflorescencias masculinas, las cuales se aislaron para asegurar la pureza del polen y se cosecharon posteriormente cuando alcanzaron el estado fenológico 607 o antes según la escala BBCH (Hormaza *et al.*, 2011).

Para la evaluación de la viabilidad del polen se utilizó el método de tinción morfológica con los colorantes acetocarmin al 1% y DAPI (diclorhidrato de 4'6-diamidino-2-fenilindol), para realizar una clasificación visual bajo el microscopio de los granos viables y no viables, y calcular el porcentaje de viabilidad mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{No. granos de polen viables}}{\text{No. granos de polen totales}} \times 100$$

En el caso del acetocarmin, los granos vivos se identificaron por medio de la coloración rojiza de los granos y los no teñidos se consideraron como muertos. Estas observaciones se realizaron bajo un microscopio óptico. Para la tinción con DAPI se consideraron viables aquellos granos con un núcleo teñido, mientras que los que no lo mostraron se consideraron como muertos. Para estas observaciones se utilizó el microscopio de fluorescencia Leica DMI4000B. Allí también se realizaron las medidas de diámetro polar y ecuatorial. El diámetro polar se refiere al lado más largo del grano y el diámetro ecuatorial corresponde al lado más ancho. Así mismo, las descripciones morfológicas de los granos de polen se basaron en los trabajos de Erdtman (1986).

Resultados

Tinción con acetocarmin

Los granos de polen fueron observados 10 minutos después de la aplicación del acetocarmin y se logró diferenciar los granos teñidos y los no teñidos como lo muestra la Figura 1.

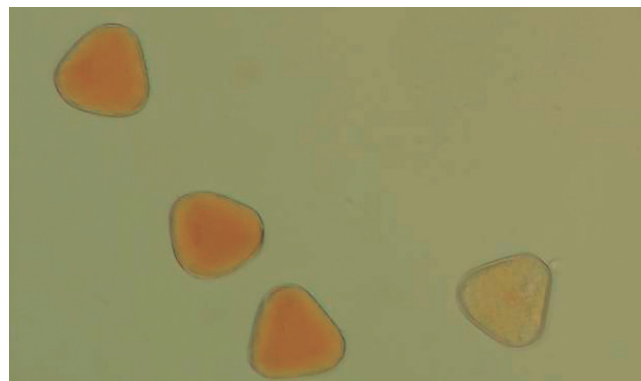


Figura 1. Diferenciación de los granos de polen viables (teñidos) y muertos (no teñidos) por tinción con acetocarmin.

De acuerdo con lo observado, el polen proveniente de los materiales Dura, Ténera y *E. oleifera* muestra porcentajes de viabilidad mayores a los obtenidos en el híbrido OxG con valores entre 29,5 y 98,2%, como lo muestra la Tabla 1.

Tabla 1. Viabilidad de los granos de polen obtenida por tinción con acetocarmin 1%

Material	Media	Desv. Est.
Angola	98,2	1,69
Ténera	97,1	2,23
<i>E. oleifera</i>	88,8	15,31
Híbrido OxG	29,5	16,99

Estos resultados son similares a los reportados por Arnaud (1980) quien después de evaluar la viabilidad del polen de especies colectadas en Brasil y Colombia con diferentes colorantes, encontró con el acetocarmin un porcentaje de viabilidad de 21,9% para el híbrido OxG y 95% para la especie *E. guineensis* colectada en Colombia. Respecto a la desviación estándar de cada material se observan valores más estables para la especie *E. guineensis* y valores más dispersos para los materiales *E. oleifera* e híbrido OxG, lo cual refleja la variabilidad dentro de cada uno debida a factores genéticos y ambientales (Figura 2).

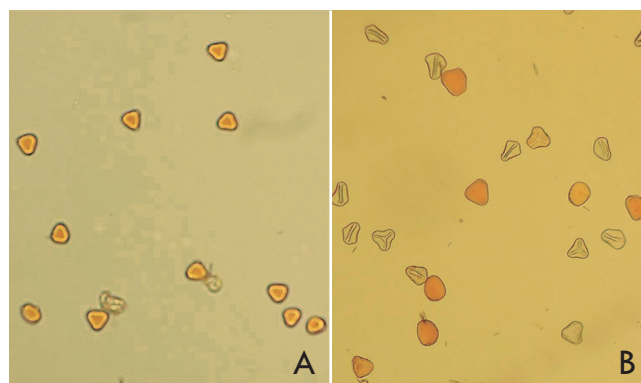


Figura 2. Vista al microscopio de la tinción con acetocarmin. A) Polen de la especie *E. guineensis*. B) Polen del híbrido OxG

Tinción con DAPI

Las lecturas se realizaron de seis a ocho horas después de aplicar el DAPI para lograr diferenciar los núcleos teñidos de los granos de polen (Figura 3). Los porcentajes de viabilidad del polen de los materiales evaluados usando DAPI (diclorhidrato de 4'6-diamidino-2-fenilindol) se muestran en la Tabla 2. Al igual que con el método descrito anteriormente, se obtuvieron valores más altos para el material *E. guineensis* y valores bajos para el híbrido OxG (Figura 4). Además, en este caso el material *E. oleífera* presenta un promedio de viabilidad más cercano

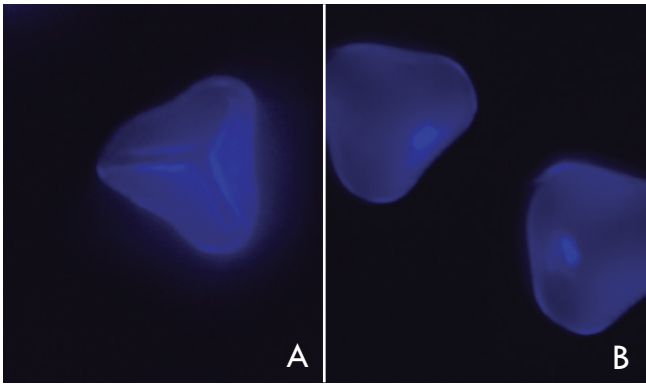


Figura 3. Granos de polen teñidos con DAPI. A) Grano de polen muerto. B) Granos de polen vivos

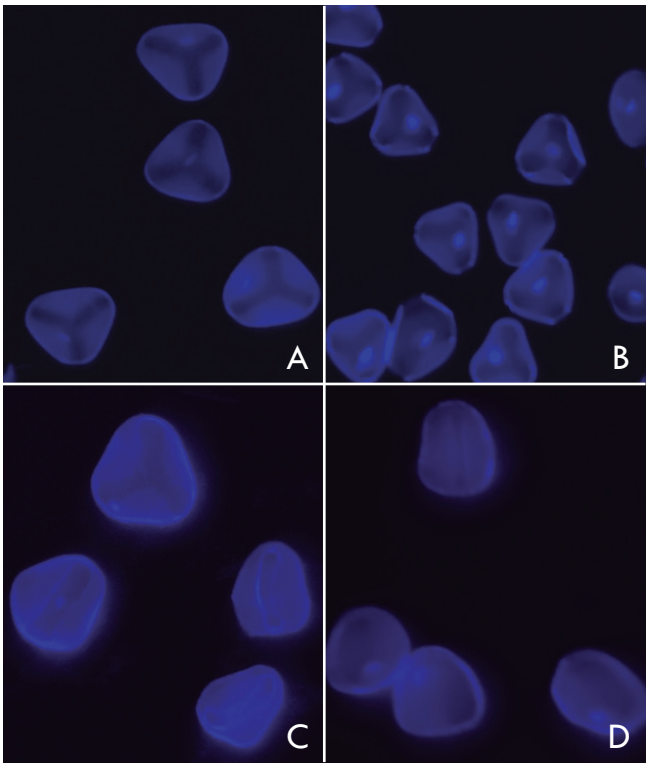


Figura 4. Vista al microscopio de fluorescencia de los granos de polen teñidos con DAPI. A) Polen del material *E. guineensis* de Angola. B) Polen de material *E. guineensis* Ténera comercial C) Polen del material híbrido OxG. D) Polen del material *E. oleífera*.

Tabla 2. Viabilidad de los granos de polen obtenida por tinción con DAPI

Material	Media	Desv. Est.
Angola	97,4	0,40
Ténera	99,1	6,05
<i>E. oleífera</i>	90,4	10,92
Híbrido OxG	26,3	16,04

a la especie *E. guineensis*. Por otro lado, los datos obtenidos para *E. guineensis* son más altos que los presentados por Nasution *et al.*, (2009), donde se reportan valores entre 40% y 69% de viabilidad.

Igualmente la desviación estándar fue más alta en los materiales *oleífera* e híbrido OxG a diferencia de la especie *E. guineensis*.

Descripción morfológica

Para las medidas de diámetro polar se identificó el lado más largo de los granos y para el ecuatorial, el más ancho, como lo muestra la Figura 5.

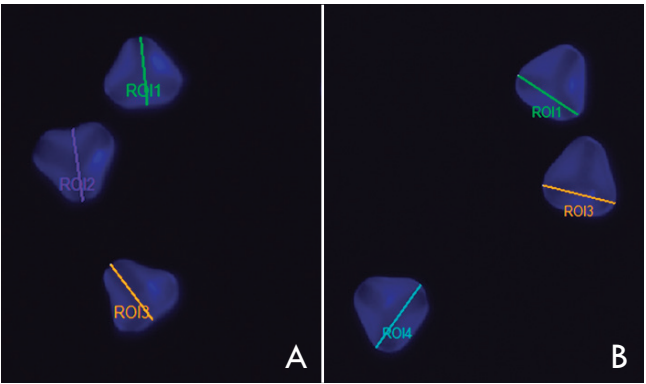


Figura 5. Medidas morfológicas de los granos de polen en *E. guineensis*. A) Diámetro polar de los granos de polen. B) Diámetro ecuatorial de los granos de polen.

Los diámetros de los granos de polen de cada material se muestran en la Tabla 3. En este caso se promediaron las lecturas de 150 granos aproximadamente por muestra. De allí se puede resaltar que los valores para los granos de la especie *E. guineensis* son muy cercanos sin importar la procedencia. Para el diámetro ecuatorial los valores se encuentran entre 39,7 y 40,2 μm ; y para el diámetro polar, entre 39,5 y 40,1 μm . En cambio para *E. oleífera* el diámetro ecuatorial es de 36,2 μm y 42,3 μm

Tabla 3. Diámetros de los ejes polar y ecuatorial de los materiales evaluados

Material	Diam ecua (μm)	Diam polar (μm)
Angola	40,2	39,5
Ténera	39,7	40,1
<i>E. oleífera</i>	36,2	42,3
Híbrido OxG	29,6	34,2

- el polar. Para el híbrido OxG se obtuvieron valores de 29,6 μm en el eje ecuatorial y 34,2 μm en el eje polar, lo que indica que los granos son de menor tamaño.

En cuanto a la forma y aperturas de los mismos se encontraron grandes diferencias entre los materiales evaluados (Figura 6). Morfológicamente, las aperturas son áreas definidas o adelgazamientos de la exina (pared celular) que facilitan el intercambio iónico del interior del grano con el exterior, y a través de ellas, normalmente, emerge el tubo polínico en el momento de la fecundación. Otra función importante es la de facilitar la acomodación de los granos a los cambios de humedad. Por lo tanto, el éxito y velocidad de salida del tubo polínico depende de su conformación (Erdtman, 1986). En el caso de la especie *E. guineensis* se encontró que los granos tienen una forma triangular con apertura tricotomocolpada (tres aperturas). Para *E. oleifera* los granos de polen son elipsoides y con apertura monocolpada (una apertura) a lo largo de este. Pero el material híbrido OxG no presenta una forma definida, sino que al parecer tiene la combinación de las formas de sus parentales (*E. oleifera* y *E. guineensis*), de ahí que su viabilidad y fertilidad es muy baja o casi nula.

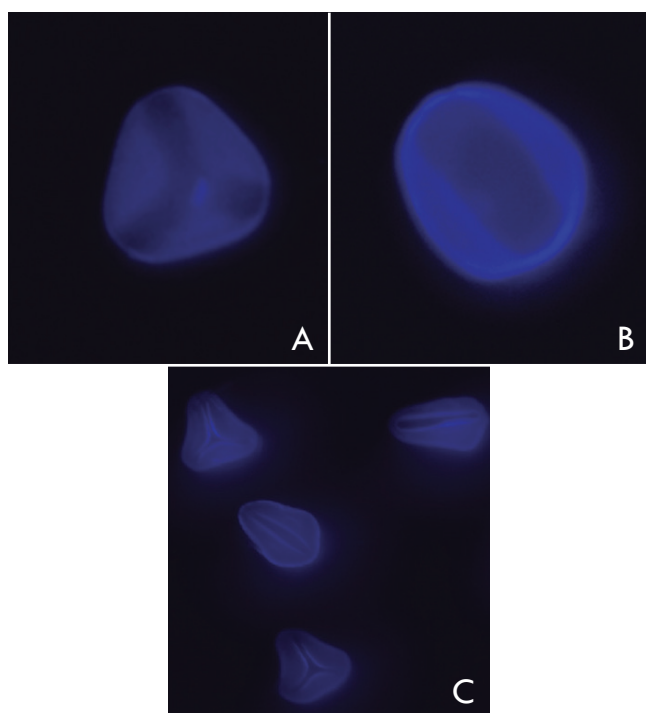


Figura 6. Detalle de la forma y apertura de los granos de polen. A) *E. guineensis*. B) *E. oleifera*. C) Híbrido OxG.

Los resultados muestran que las diferentes técnicas utilizadas son sensibles, rápidas y útiles para determinar la viabilidad del polen, y concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores. Por lo tanto, constituyen no sólo una alternativa interesante desde el punto de vista de aseguramiento de la calidad del polen, sino que además son un insumo importante para el estudio de la fisiología del polen que en este momento realiza Cenipalma.

Agradecimientos

Esta publicación contó con el apoyo de Fedepalma - Fondo de Fomento Palmero y el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – Colciencias bajo el programa de jóvenes investigadores.

Bibliografía

- Alvarado, A., Bulgarelli, B. y Moya, B. 2000. Germinación del polen en poblaciones derivadas de un híbrido entre *Elaeis guineensis*, Jacq. y *E. oleifera* HBK, Cortés. ASD Oil Palm Papers, No. 20, pp. 35-36.
- Arnaud, F. 1980. Fertilité pollinique de l'hybride *Elaeis melanococca* x *E. guineensis* et des espèces parentales. Oléagineux, Vol. 35, No. 3, pp 121-126
- Barcellona, R; favilla, J; Von Berger, J; Avitabile, M; Ragusa, N and Masotti, L (2004). DNA - 4'-6-diamine-2-phenylindole interactions: a comparative study employing fluorescence and ultraviolet spectroscopy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 250: 48-53.
- Coleman, A W and Goff, L J. 1985. Application of fluorochromes to pollen biology. I. Mitramycin and 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) as vital staining and for quantitation of nuclear DNA. *Stain Technology*, 60: 145-154.
- Davarynejad, G., Szabó, Z., Nyeki, J. y Szabó, T. 2008. Phenological stages pollen production level, pollen viability and in vitro germination capability of some sour cherry cultivars. *Asian Journal of Plant Sciences*, Vol. 7, pp. 672-676.
- Erdtman, G. 1986. Pollen morphology and plant taxonomy: angiosperms: An introduction to palynology. Leiden, New York. 553 p.
- Fonnegra, C. 1989. Introducción a la palinología. Métodos de estudio palinológico. Medellín, Universidad de Antioquia. pp. 11-43.
- Hormaza, P.A.; Forero, D.C.; Ruiz, R.; Romero, H.M. 2011. Fenología de la palma de aceite africana (*Elaeis guineensis*, Jacq.) y del híbrido interespecífico (*Elaeis oleifera*, [Kunt] Cortés x *Elaeis guineensis*, Jacq.). Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite (Cenipalma).
- Orillo, M. y Bonierbale, M. 2009. Biología reproductiva y citogenética de la papa. Manual técnico. Centro Internacional de la papa (CIP) y Red LatinPapa. 22p.
- Salgado-Labouriau, M.L. 1973. Contribuição à palinologia dos cerrados. FNDCT. 298 p.



Director: José Ignacio Sanz Scovino, Ph.D.
 Revisión de textos: Comité de Publicaciones de Cenipalma
 Coordinación editorial: Yolanda Moreno Muñóz
 Diseño y diagramación: ACE – Alianza en Comunicación Empresarial Ltda.
 Impresión: Javegraf

Esta publicación contó con el apoyo de Fedepalma - Fondo de Fomento Palmero