

METODOLOGIA PARA LA SELECCION DE LINEAS DE FRIJOL *Phaseolus vulgaris* L. POR ESTRES DE TEMPERATURA A NIVEL MICROGAMETOFITICOLuz Marina Vásquez*
Consuelo Montes R.*Jeffrey W. White**
William Roca**

COMPENDIO

Los trabajos realizados en varias especies de plantas revelan que una porción significativa de los genes que se expresan en el esporofito también lo hacen en el grano de polen, en consecuencia la presión de selección a nivel de polen debe conducir a modificaciones en caracteres cualitativos o cuantitativos de las progenies derivadas. Para comprobar esta hipótesis en fríjol se estudió el efecto de estrés por temperaturas altas sobre granos de polen, en tres variedades de *Phaseolus vulgaris* L. y sus generaciones F₁ y F₂, mediante las técnicas de germinación "*in vitro*" y polinización controlada con polen estresado. El porcentaje de germinación "*in vitro*" estuvo inversamente relacionada con el nivel de estrés por temperaturas altas y el tiempo de exposición al estrés. 50°C resultó ser la temperatura a la cual el polen que se había sometido a estrés durante sesenta minutos presentó disminución considerable en su germinación. No se detectó avance para tolerancia a altas temperaturas a nivel de microgametofito cuando se evaluó germinabilidad de polen entre progenies. Un avance en la selección a nivel de microgametofito se puede lograr trabajando con mayores cantidades de polen lo que dará la oportunidad de seleccionar por vigor, además es importante explorar el origen de la variabilidad en la germinación de polen dentro de un material en la fase de floración.

ABSTRACT

Studies of various plant species have shown that a significant portion of the genes that are expressed in the sporophyte are also expressed in the microgametophyte (pollen grain). Consequently, selection pressure applied to pollen may aid in the modification of qualitative or quantitative characters of the derived progeny. To verify this hypothesis in common bean (*Phaseolus vulgaris*), a study of the effect of high temperature stress on pollen grain in three cultivars in F₁ and F₂ generations was conducted by means of "*in vitro*" germination techniques and controlled pollinization with stressed pollen. *In vitro* germination was inversely related with the level and duration of high temperature stress. As 50°C the stressed pollen showed considerable decrease in germination. Evaluation of germination of pollen between progenies showed no increase in tolerance to high temperature of microgametophytes. Greater progress in selection of microgametophytes be obtained using larger quantities of pollens, which would provide greater opportunity to select for vigor. The origin of the variability in the germination of pollen in cultivars in the flowering period should also be examined.

1. INTRODUCCION

En fríjol, *Phaseolus vulgaris* L., la naturaleza de la tolerancia al calor aún es un interrogante y los trabajos realizados sobre el tema plantean explicaciones contrastantes. Summer (1982) utilizó la producción de vainas en estrés, con temperaturas día/noche de 25/43°- 28/43°C, y concluyó que el carácter en una línea se debía a la acción de un gen dominante simple, mientras que en otras se debía a dos genes de acción epistática. Por

el contrario, Weaver *et al* (1985) le atribuyeron a la tolerancia a temperaturas altas una segregación transgresiva. Farlow *et al* (1978) obtuvieron germinación de polen tratado a 48° C (por 38 a 62 horas); Dickson y Boettger (1984), registraron disminución en la cantidad de semilla cuando se fertilizó con polen de plantas creciendo a 30°C, en comparación con el polen de plantas a 20 y 25°C. Haterlein *et al* (1980) afirman que el efecto del estrés sobre el polen se manifiesta en mayor grado después de la fertilización y no sobre su viabilidad.

* Estudiantes de pregrado. Universidad Nacional de Colombia. Palmira.

** Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT. A. A. 6713, Cali, Colombia

Durante el período 1920 - 1962, se afirmaba que la habilidad del polen para fertilizar generalmente era independiente de su constitución genética, y que la transmisión del polen de un solo genotipo llevaba a tasas de segregación diferentes a las mendelianas. Esto parecía estar asociado con la presencia de un mecanismo selectivo el cual se manifestaba en generaciones posteriores, mediante alteraciones del gene (mutación) y de las frecuencias zigóticas (Pfhaler, 1967).

En las últimas décadas (1967- 1988), la mayoría de los autores coinciden en afirmar que buena porción (60 o/o) de los genes que se expresan en el esporofito, también lo pueden hacer en el grano de polen y, en consecuencia, la presión de selección a nivel de polen debe conducir a modificaciones en caracteres cualitativos o cuantitativos de las progenies derivadas (Tanksley *et al.*, 1981; Mulcahy *et al.*, 1982). Otros autores sostienen que la habilidad competitiva a nivel de polen puede afectar la transmisión de dichos genes.

Para muchas especies cultivadas, y en particular para fríjol, *Phaseolus vulgaris* L., la utilización de un sistema de selección microgametofítica, ofrece potencialmente varias ventajas en fitomejoramiento: uso de individuos haploides, eliminando de esta manera los efectos de dominancia; disponibilidad casi ilimitada de material para la selección, reducción de tiempo, espacio y costos. Por esta razón es necesario desarrollar una metodología que permita establecer el grado de asociación entre caracteres del esporofito y la respuesta de los granos de polen, a cierto tipo de estrés : por ejemplo altas temperaturas.

Con base en lo anterior se plantearon los siguientes objetivos: seleccionar el medio de cultivo más adecuado para la germinación *in vitro* de grano de polen de fríjol; identificar la prueba de laboratorio más eficiente para evaluar el grado de viabilidad de polen, sometido a estrés por altas temperaturas; evaluar la capacidad de polen estresado para fecundar, y hacer selección temprana (en la F_1 y

F_2) de materiales tolerantes a altas temperaturas, mediante polinización controlada de parentales, utilizando polen sometido a diferentes niveles de estrés.

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El trabajo se realizó entre abril de 1987 y diciembre de 1988, en las instalaciones del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Se seleccionaron como materiales parentales las variedades Jamapa (tolerante a temperaturas altas), Diacol-Calima (moderadamente susceptible) y Radical San Gil (susceptible).

Se definieron como variables indicadoras de viabilidad del polen el porcentaje de germinación *in vitro* y el porcentaje de fertilización en campo, obtenido mediante polinización controlada.

Previo al montaje del ensayo definitivo, se ejecutaron 11 ensayos secuenciales tendientes a definir aspectos relacionados con medio de cultivo apropiado para lograr germinación *in vitro* de polen, metodología para inducir estrés al polen por temperaturas altas, temperatura crítica y tiempo de exposición del material experimental al estrés, pruebas de tinción como mecanismo alterno para evaluar viabilidad de polen, sistema de transporte, instrumentación y técnicas adecuadas para lograr fertilización con polen estresado, etc.

Las fases de experimentación correspondientes al ensayo definitivo, incluyeron: estudio del crecimiento del tubo polínico en parentales y F_1 cuando se sometió el polen a estrés, determinación del diámetro del grano de polen en parentales, F_1 y F_2 , comportamiento de la germinación del polen de parentales, F_1 , F_2 y retrocruzas a la madre (F_1 RC₁ y F_2 RC₁).

Para estudiar la calidad de los granos de polen de los parentales y definir la temperatura de estrés de su progenie se exploraron 7 nive-

les de temperatura (25, 36, 37, 50, 60, 70, 80 y 90°C) con un tiempo estándar de 60 minutos, utilizando las metodologías de flores en "cámara húmeda" y polen directamente en medio de cultivo. La primera consiste en colocar las flores en una caja de petri recubierta en su interior con papel filtro humedecido para garantizar una adecuada humedad relativa, factor determinante en la germinación del polen (Weaver, 1987), y para la segunda se construyó un dispositivo que permitiera someter el polen directamente a estrés y luego trasladarlo al campo. Este consiste en una caja de petri con hendiduras no muy profundas en cuyos compartimientos se siembra el polen, luego es colocada en "cámara húmeda" igual que las flores.

El diseño experimental en todos los ensayos fue completamente al azar y para facilitar el manejo estadístico de la información en algunos de ellos, los tratamientos se agruparon en estructuras factoriales ej: (3 materiales x 8 temperaturas x 2 métodos), la variable de respuesta cuantificada fue porcentaje de germinación de polen y la unidad experimental estuvo conformada por el polen de una flor, la muestra fue aleatoria evaluando 200 granos/placa. El número de repeticiones en la mayoría de los ensayos fue 50 (10 flores/día x 5 días) en cada metodología.

La siembra del material experimental en el campo se planeó teniendo en cuenta factores como óptimo desarrollo de las plantas, disponibilidad suficiente de semilla, facilidad de manejo, etc. Para dar cumplimiento al programa de retrocruzas (Figura 1) se efectuaron siembras escalonadas con el fin de prevenir desfases en la época de floración.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

En los ensayos preliminares se definió como tamaño de muestra 200 granos por placa, se adoptó como criterio de grano germinado la relación longitud de tubo/diámetro de grano. Un grano se calificó como germinado cuando la relación era por lo menos 2/1.

La prueba de tinción como mecanismo alternativo para evaluar viabilidad de polen, produjo resultados inconsistentes con respecto al porcentaje de germinación *in vitro* comprobando que las dos metodologías no están correlacionadas. Esto es explicable si se tiene en cuenta que la tinción califica viabilidad con base en el contenido del grano, pero, un grano morfológicamente bueno, puede carecer de capacidad para germinar.

El medio de cultivo para la germinación del polen depende del cultivar empleado. Los

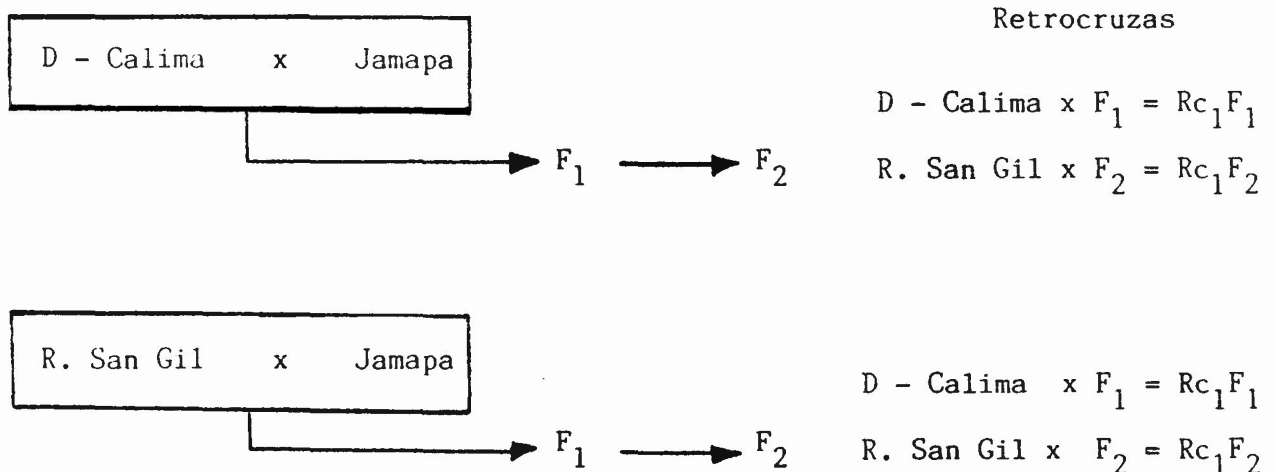


Fig. 1. Esquema que indica el programa de cruzas

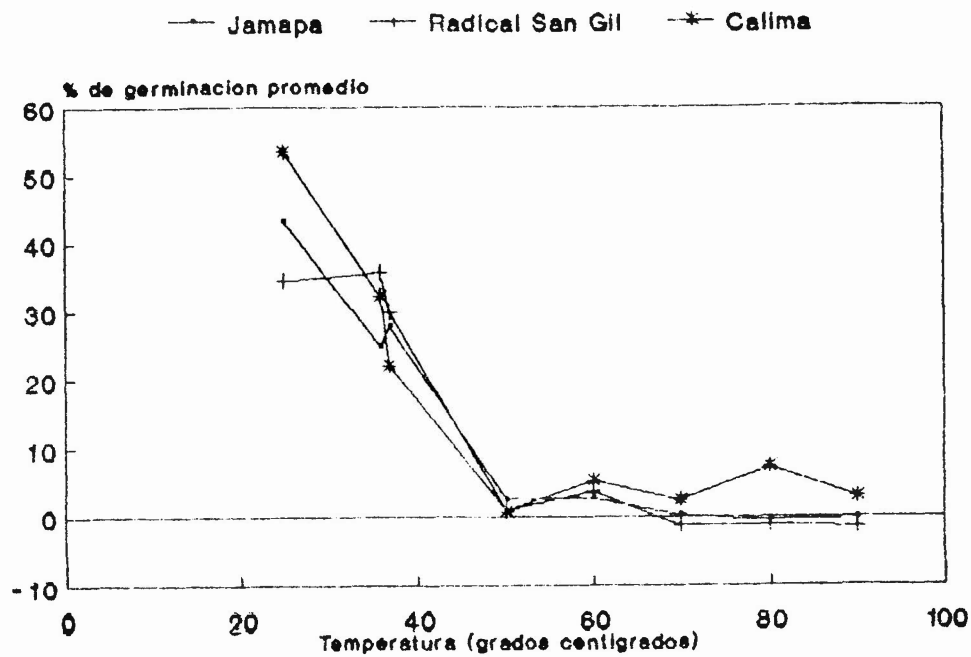


Fig. 2. Tendencia en el comportamiento en el porcentaje real de germinación de polen *in vitro* con tres variedades de frijol bajo estrés de temperatura utilizando flores

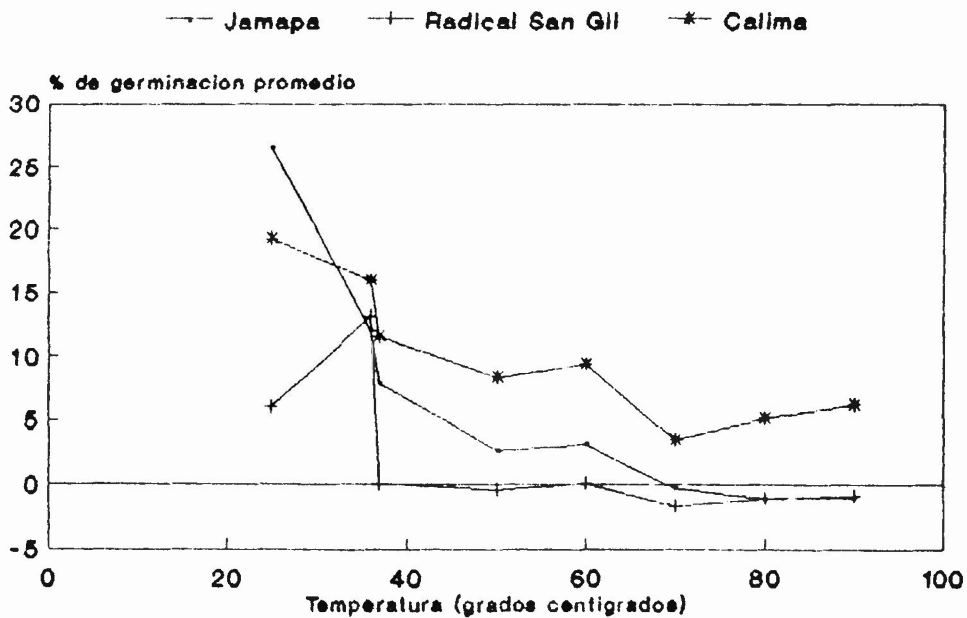


Fig. 3. Tendencia en el comportamiento en el porcentaje real de germinación de polen *in vitro* con tres variedades de frijol bajo estrés de temperatura. Utilizando polen directamente.

más altos porcentajes de germinación in vitro del polen de *Phaseolus vulgaris* L. se obtuvieron en un medio compuesto por 100 ppm H_3BO_3 ; 250 ppm $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$; 100 ppm $MgCl_2$, 100 ppm KNO_3 ; 200 ppm $CaSO_4 \cdot 2H_2O$; incluye 28 o/o de sacarosa y un pH de 7.2 .

Se adoptaron dos metodologías para promover estrés al polen por temperaturas altas: confinamiento de las flores en cámara húmeda e incubación a las temperaturas deseadas, y maceración de quillas en medio de cultivo e incubación.

La temperatura crítica para la germinación de polen se fijó en 50° C y el tiempo de exposición al estrés se estandarizó en 60 minutos (Figura 2 y 3). Estas metodologías, conjuntamente con adecuada instrumentación, selección de botones aptos y la técnica de polinización y enmasculación, garantizaron la obtención de cruzamientos efectivos con polen estresado. Este hecho se evidenció con la observación de tubos polínicos sometidos a temperaturas de 60° C llegando a la base del ovario.

No fue posible establecer un avance significativo en la selección por estrés de altas temperaturas a nivel microgametofítico, cuando se evaluó el porcentaje de germinación de polen entre progenies ($F_1 RC_1 - 25$ vs $F_1 RC_1 - 37$) (Cuadros 1 y 2). Aunque la variable porcentaje de germinación de polen no resultó ser el criterio más eficiente para la selección de genotipos por tolerancia al estrés de altas temperaturas a nivel microgametofítico, al comparar la germinación del polen en retrocruzas a la madre con polen previamente estresado, se observó cierto avance hacia el progenitor tolerante.

Se observó acentuada variabilidad en el tamaño de los granos de polen de la F_1 , lo que hizo suponer la existencia de una presunta relación entre el genotipo del gametofito y el tamaño de los granos de polen. Los resultados comprobaron que existe estrecha asociación entre tamaño del grano de polen y geno-

tipo del material. Las variedades D-Calima y Radical San Gil, en su condición de materiales susceptibles y moderadamente susceptibles, presentaron granos de polen de tamaño grande, mientras que Jamapa, material tolerante, se caracterizó por su grano mediano. Las progenies F_1 y F_2 heredaron la condición de grano mediano, siendo evidente la dominancia que exhibió Jamapa para el rasgo tamaño mediano de los granos de polen. La variabilidad en el tamaño de polen de la F_1 con respecto a la variabilidad promedio de sus parentales fue de 47 o/o superior, lo cual otorga validez a la premisa sobre la posibilidad de hacer selección temprana a nivel microgametofítico.

4. CONCLUSIONES

- 4.1. No se detectó avance significativo en selección por estrés de altas temperaturas a nivel microgametofítico, cuando se evaluó el porcentaje de germinación de polen en progenies ($F_1 RC_1 - 25$ vs $F_1 RC_1 - 37$).
- 4.2. Los porcentajes de germinación de polen en retrocruzas a la madre con polen previamente estresado, señalaron una tendencia hacia el progenitor tolerante.
- 4.3. Para promover estrés al polen de frijol por temperaturas altas, se pueden adoptar dos metodologías con resultados satisfactorios en ambos casos: la primera consiste en incubar las flores a las temperaturas deseadas, confinadas en un dispositivo denominado cámara húmeda. La segunda consiste en macerar las quillas en medio de cultivo de tal modo que el polen pueda someterse directamente al estrés en las incubadoras. Esta última deja expresar de manera más acentuada, las diferencias entre materiales tolerantes y susceptibles a temperaturas altas.
- 4.4. Cuando se sometió a estrés por temperaturas altas, el polen de las variedades parentales manifestó respuestas diferenciales en el porcentaje de germinación, en

Cuadro 1

Comparación del porcentaje promedio de germinación de polen in vitro en tres variedades de Phaseolus vulgaris L. y plantas F_1 y F_2 provenientes de retrocruza, cuando se someten las flores a estrés de temperatura

Materiales	Temperatura ($^{\circ}$ C)		
	25	37	49
Diacol-Calima	30.14 A	30.25 A	12.74 D
Jamapa	54.07 B	43.17 C	13.01 D
F_1RC_1 (25)	34.69 A	29.44 A	11.28 D
F_1RC_1 (37)	41.74 B	33.96 A	13.33 D
F_2RC_1 (25)	32.94 A	27.04 A	9.68 D
F_2RC_1 (37)	35.15 A	30.99 A	11.57 D
No. Observ.	48	45	32

Materiales	Temperatura ($^{\circ}$ C)		
	25	37	49
R. San Gil	37.94 B	38.71 B	12.97 D
Jamapa	54.07 B	43.17 C	13.01 D
F_1RC_1 (25)	40.57 C	41.18 C	15.47 D
F_1RC_1 (37)	31.53 B	33.34 A	11.13 D
F_2RC_1 (25)	44.53 C	44.41 C	11.92 D
F_2RC_1 (37)	23.40 A	30.60 A	13.60 D
No. Observ.	30	30	27

* Promedios con la misma letra no presentaron diferencias significativas Nivel de significancia $P = 0.05$. Análisis de varianza anidado y prueba de F para efectos principales e interacción.

Cuadro 2

Comparación del porcentaje promedio de germinación de polen *in vitro* en tres variedades de *Phaseolus vulgaris* L. y plantas F₁ provenientes de retrocruza, cuando se somete el polen directamente a estrés de temperatura

Materiales	Temperatura (°C)		
	25	37	49
Diacol-Calima	20.37 A	17.83 A	11.60 B
Jamapa	21.19 A	13.56 B	11.19 B
F ₁ RC ₁ (25)	18.40 A	18.62 A	12.75 B
F ₁ RC ₁ (37)	18.18 A	18.77 A	12.87 B
No. Observ.	18	18	17

Materiales	Temperatura (°C)		
	25	37	49
R. San Gil	26.33 A	16.85 B	17.69 B
Jamapa	21.20 A	13.56 B	11.19 B
F ₁ RC ₁ (25)	23.05 A	12.57 B	10.70 B
F ₁ RC ₁ (37)	25.00 A	18.43 B	14.05 B
No. Observ.	19	18	18

* Promedios con la misma letra no presentaron diferencias significativas Nivel de significancia P = 0.05. Análisis de varianza anidado, prueba de F para efectos principales e interacción.

relación directa con la calificación por tolerancia: Jamapa (tolerante), D- Calima (moderadamente susceptible), Radical San Gil (susceptible). Este hecho confirmó la eficacia de las metodologías para promover estrés por temperaturas altas.

4.5. Existió relación inversa entre el porcentaje de germinación *in vitro* del polen, el nivel de estrés por temperaturas altas al cual se someta y el tiempo de exposición al estrés. Una temperatura de 50°C se fijó como crítica para la germinación.

Un tiempo de 60 minutos fue el más apropiado.

4.6. Se detectó la presencia de tubos polínicos de polen estresado a 60°C llegando al ovario. Este evento confirma la posibilidad de obtener cruza efectivas con polen estresado a temperaturas altas, sujeto al grado de refinamiento en la técnica de fertilización.

4.7. Cuando se aplicó estrés (60°C) sobre granos de polen ubicados en la punta del estigma, se presentaron drásticas reduccio-

nes en la longitud del tubo polínico, 24 horas después de incubados (0.18 mm a 25°C vs 0.09 mm a 60°C).

4.8. Al caracterizar el comportamiento del diámetro de los granos de polen en parentales Jamapa (J), D-Calima (C), Radical San Gil (R) y F_1 (C x J, R x J) se pudo establecer clara dominancia del rasgo tamaño mediano del grano asociado al parental tolerante a altas temperaturas (Jamapa), sobre el tamaño grande característico de los parentales R- San Gil y D- Calima (susceptible y moderadamente susceptible).

4.9. La variabilidad en el diámetro del polen de la F_1 fue aproximadamente 50 o/o más alta que la variabilidad promedia de los parentales. Este resultado ratificó la posibilidad de hacer selección temprana a nivel de microgametofito, aprovechando la variabilidad en la F_1

5. BIBLIOGRAFIA

1. BINO, R. J.; HILE, J. and FRANKEN, J. Kanamycin resistance during in vitro development of pollen from transgenic tomato plants. *Plant Cell Reports*. Vol. 6. 1987. p. 333 - 336.
2. BREWBAKER, J. L. and KWACK, B. H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am. J. Bot.* Vol. 50. No. 9. 1963; p. 859-865.
3. DICKSON, H. H. and BOETTGER, M. A. Effect of high and low temperatures on pollen germination and seed set in snap beans. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* Vol. 109, No. 3. 1984. p. 372-374.
4. FARLOW, P. J.; BYTH, D. E. and KRUGER, N. S. The effect of temperature on seed set and in vitro pollen germination in french beans, *Phaseolus vulgaris* L. Ormiston Queensland, Department of Primary Industries, 1978. 15 p.
5. HESLOP, HARRISON, L. Pollen development and physiology. London: Butterworths, 1971. 338 p.
6. KWACK, B. H. The effect of calcium on pollen germination. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* Vol. 86. 1965; p. 816 - 823.
7. MULCAHY, D. L. and OTTAVIANO, E. Pollen biology and implications for plant breeding. *En: Proceeding of the Symposium on pollen; Biology and implications.* 1982. p. 3 - 349.
8. OTTAVIANO, E.; SARI GORLA, M. and MULCAHY, D. L. Pollen tube growth rates in *Zea mays*; implications for genetic improvement of crops - *Sci.* Vol. 210. No. 4468. 1980; p. 437-438.
9. PFHALER, P. L. Fertilización ability of maize pollen grains. II. Pollen genotype, female sporophyte and pollen storage. *Genetics*. Vol. 57. 1967; p. 513-521.
10. SCARCY, K. B. and MULCAHY, D. L. Pollen selection and gametophic expression of metal tolerance in *Silene dioica* and *Mimulus gattatus*. *Am. J. Bot.* Vol. 72. 1985; p. 1700 - 1706.
11. TANKSLEY, S. O.; ZAMIR, O. and RICK, C. M. Evidence for extensive overlap of sporophyte and gametophytic gene expression in *Lycopersicon esculentum*. *Sci.* Vol. 213. 1981; p. 453-55.
12. WEAVER, M. L. et al. Pollen staining and high temperature tolerance of bean. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* Vol. 110, No. 6. 1985; p. 797-799.
13. WEAVER, M. L. In vitro and in flower studies of pollen viability in beans *Phaseolus vulgaris* L. *Naturwissenschaften*. Vol. 74. 1987; p. 89 - 90.
14. WILLING, R. P. and MASCARENHAS, J. P. Analisis of the complexity, and diversity of mRNAs from pollen and shoots of tradescantia. *Plant Physiol.* Vol. 75 1984; P. 865-868.
15. ZAMIR, D. and GADISH, I. Pollen selection for low temperature adaptation in tomato. *Theor. Appl. Genet.* Vol 74. No.5. 1987; p. 545-548.