TESINA DE GRADO
LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Evaluación del uso del gel de *Aloe arborescens* Miller., como medio bioestimulante para la germinación de tubos polínicos de *Malus domestica* Borkh.

Felipe Noli

Orientadora: Dra. Ángeles Beri

Co-orientador: Mag. Daniel Ramirez

2022

Laboratorio de Palinología, Dpto. de Paleontología.

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

Agradecimientos

A Ángeles Beri, por la motivación, disposición, compañía y confianza. A Daniel Ramirez por su presencia virtual en el laboratorio, por compartir su experiencia y por su gran aporte bibliográfico. A ambos, gracias por la enseñanza y tutoría durante todo este proceso.

A Sandra Lupo, por la amabilidad y disponibilidad para hacer uso de la estufa del laboratorio de Micología. A Laboratorios Prácticos, por el préstamo del agitador magnético.

A Ximena, por su ayuda, interés y compañía en el laboratorio. A Juan por su orientación estadística. A Alejandra por su ayuda con los cálculos químicos. A Bruno por sus aportes bibliográficos. A Mercedes Arias por motivarme a buscar un tema para realizar la tesina. A Vivian Severino, por compartir el polen utilizado para los experimentos y por introducirme en el mundo de la fruticultura. A Matias Pablo por compartir la información sobre la solución de B, Ca y Zn. A la Udelar por las oportunidades y por ser parte constante de mi vida.

A mi familia y amigos por el apoyo incondicional durante todo el recorrido académico.

A Marti por estar siempre ahí. A Alelí por apurarme a realizar este trabajo, por interrumpirlo con su llegada al mundo y por llenarme de amor y alegría.

A todos, gracias.

Muchas gracias.

ÍNDICE

Introducción……pág. 3

- El Manzano……. pág. 4
- El Aloe……..pág. 5

Objetivo……pág. 6

Materiales y métodos…….....pág. 7

- Medio Reddy Kakani…….....pág. 7
- Medio de B, Ca y Zn……..pág. 8
- Medio de Aloe…….pág. 9
- Procesamiento de datos……...pág. 13

Resultados……..pág. 14

Discusión y conclusiones……..pág. 20

Bibliografía……pág. 22

Introducción

Desde la aparición de las Angiospermas, el desarrollo de la flor ha sido un mecanismo evolutivo de dispersión de gametos para las plantas. Se trata de una inversión energética en el desarrollo de estructuras especializadas en la sobreproducción de polen (en el caso de plantas anemófilas), o en la atracción y oferta de recompensas para los animales (plantas zoofilas); en el caso particular de las plantas zoófilas, es necesario una mayor inversión energética para la elaboración de pigmentos y soluciones azucaradas que atraigan a los polinizadores (Pacini, 2015). Es entonces que aparece la polinización, como el transporte de polen desde los estambres de la flor a los pistilos (Garibaldi et. al., 2012), donde el polen viaja desde los sacos polínicos a los estigmas de la misma flor o de distintas flores, y lo hace mediante la acción de vectores de polinización como el aire o los animales.

Se puede decir que no existe un momento específico en que se dé la polinización perfecta, sino que se da en un rango de condiciones donde coinciden diversos factores específicos para cada especie. El Período Efectivo de Polinización (PEP), definido como el período durante el cual la polinización es efectiva para producir una fruta (Sanzol & Herrero, 2001), depende de la longevidad del óvulo, la velocidad de crecimiento del tubo polínico y de la receptividad del estigma. Estos parámetros fisiológicos de la planta se ven influenciados a su vez por factores genéticos, nutricionales (reservas endógenas, abonados exógenos) y climáticos (temperatura) (Sanzol & Herrero, 2001).

Se debe considerar además, que los factores ambientales sean propicios para que los polinizadores cumplan con su rol durante el período de floración. Si esto no sucede, se presentará una fructificación poco eficiente, ya que la polinización se dará en bajas proporciones. Traducido al lenguaje productivo, se obtendrá una mala cosecha, con pocos frutos cuajados o de baja calidad (Garratt et.al., 2014a). En el caso de los manzanos, las condiciones como las heladas y las altas temperaturas impactan negativamente la polinización (Ramírez & Davenport, 2013). Estos autores explican que las heladas generan la reducción de la producción de los granos de polen y la inhibición del crecimiento del tubo polínico, mientras que las altas temperaturas inhiben la inducción floral, la producción de polen y reducen la viabilidad del mismo.

El grano de polen es el gametofito masculino en las Angiospermas y está compuesto en su madurez por tres células, una vegetativa (que se expandirá para formar el tubo polínico), y dos espermáticas (que viajan dentro de la célula vegetativa)(McCormick, S., 2013). El polen es producido en grandes cantidades en los estambres de las flores y viaja de flor en flor gracias a los polinizadores. Cuando un grano de polen llega a un estigma receptivo, germina y emite su tubo polínico que crece dentro del estilo hasta llegar al saco embrionario, dentro del óvulo; al llegar allí, las células espermáticas se fusionan con la oósfera y la célula central formando el cigoto y el endospermo respectivamente (Taylor & Hepler, 1997).

La polinización zoófila representa un servicio ecosistémico de gran valor para la humanidad, monetario, productivo, etc. (Garibaldi et.al, 2013; Melathopoulos et.al., 2015). Existen más de 20.000 especies de abejas en todo el mundo, la mayoría son solitarias; Apis mellifera, de origen europeo, es la más abundante y la que mejor maneja el humano para polinizar sus cultivos, obteniendo de ellas también productos secundarios como miel y propóleos (Santos, 2019). Nuestro país no es ajeno a estas prácticas y Apis mellifera es la más utilizada en la

polinización. Sin embargo, la necesidad de una conservación activa de las interacciones de la polinización sólo se está apreciando ahora (Garibaldi et.al., 2012). Los sistemas de polinización están cada vez más amenazados por las fuentes antropogénicas, incluida la fragmentación del hábitat, los cambios en el uso de la tierra, las prácticas agrícolas modernas, el uso de productos químicos como pesticidas y herbicidas e invasiones de plantas y animales no nativos (Kearns et. al., 1998).

"...*las poblaciones de abejas melíferas se han visto crecientemente amenazadas en buena parte del mundo con importantes consecuencias en la industria apícola. En los primeros años de este siglo se verificó un aumento de la pérdida de colonias, especialmente notorio en Estados Unidos y Europa, aunque datos recientes indican que en Chile, Argentina y Uruguay la situación no es muy diferente*" (Invernizzi & Antunez, 2017).

Para superar las limitaciones existentes en la polinización de cultivos, se han buscado diversas alternativas que van desde manejos específicos de los polinizadores, enriquecimiento del sistema de polinización zoófila con polen introducido (Pinillos & Cuevas, 2008), "entrenamiento" de colmenas (Farina et. al., 2020), e incluso, la aplicación mecánica de polen (Williams & Legge, 1979).

Desde el punto de vista productivo, los objetivos de la polinización artificial son por un lado, corregir el déficit de polinización, llevando a un incremento de la producción y a una mejora de la calidad del fruto y, por otro, evitar la necesidad de instalar pies polinizantes en las parcelas de cultivos frutales (Sánchez-Estrada & Cuevas, 2020). Entonces, en esta línea de pensamiento se puede afirmar que es necesaria la polinización artificial en aquellos cultivos en los que falla en alguna medida la polinización.

Por las razones antes expuestas se han desarrollado empresas dedicadas expresamente a la producción de polen destinado a la polinización artificial, asegurando así la "reserva" disponible para paliar situaciones en las que sea necesario.

El Manzano

El manzano, *Malus domestica* Borkh, (Rosaceae: Maloideae) es un árbol con un solo tronco y su altura varía entre los 2 y los 10 metros según su manejo; posee hojas alternas, con forma ovalada, borde aserrado y son de color verde oscuro (Oshima et al., 2019); sus flores poseen pétalos blancos, rosados o rojizos y estambres amarillentos (Coque et.al, 2012), cuya función es atraer a insectos polinizadores como abejas, abejorros y algunas moscas (Garrat et.al., 2014b; Oshima et al., 2019). Se considera que las abejas melíferas (*Apis mellifera*) son buenas polinizadoras para esta especie, aunque no siempre abordan la flor de manera efectiva para la polinización (Santos & Invernizzi, 2018). Por otra parte, el polen del manzano es relativamente pesado y dificulta la anemofilia (Ramírez & Davenport, 2013).

El polen de manzano se dispersa en mónada, es isopolar, con forma esferoidal, tricolporado y dominantemente se orienta de manera oblicua; su tamaño hidratado es de 26-30 µm en el eje polar más corto en vista ecuatorial y de 31-35 µm en el eje polar más largo en vista ecuatorial; su diámetro más largo en vista ecuatorial o polar es de 31-35 µm *(*Auer W., 2021) (Figura 1).

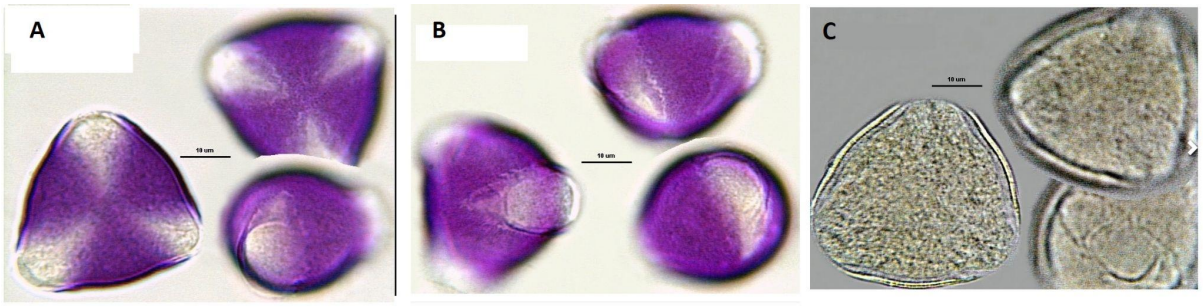

Figura 1. Granos de polen de manzano. A y B: polen hidratado - fresco, glicerina, rojo rutenio (fotógrafo: Auer, W); C: polen hidratado - fresco, glicerina, sin teñir (fotógrafo: Auer, W).

La mayoría de los cultivares de manzana son auto-incompatibles genéticamente (Broothaerts, 2003), lo que significa que no pueden generar frutos viables con su propio polen, entonces para poder formar frutos deben recibir polen de un cultivar diferente. Por dicho motivo es que la producción de frutas depende de la actividad de los insectos, que a su vez está limitada por las condiciones ambientales propicias para que éstos hagan su trabajo (Hegedűs, 2006).

En el cultivo de *Malus,* uno de los factores limitantes de la producción es la polinización (Robbie & Atkinson, 1994). El poder germinativo del polen puede verse afectado por una polinización deficiente (Giulivo & Ramina, 1974). Una polinización deficiente, a su vez, puede ser causante de bajos rendimientos productivos en algunas plantaciones (Iglesias, 1993). Según Williams & Wilson (1970) la calidad del polen es un factor que afecta el cuajado de frutos. Para algunas variedades de rosáceas, incluyendo el manzano, si aumenta el número de granos de polen sobre el estigma, el potencial germinativo será mayor (Andrés et. al., 2000). Aunque el cultivo del manzano esté mal adaptado a la polinización artificial (Williams & Legge, 1979), en algunos países asiáticos se impone esta modalidad, acompañada de un gran gasto en mano de obra (Cuevas, 2019; ecoportal.net).

En nuestro país el manzano es el principal frutal de hoja caduca cultivado y tiene un gran componente cultural en la sociedad (De Iacovo & Tachini, 2018). Según estos autores el cultivo de manzano presenta bajas tasas de cuajado de frutos, y aunque las condiciones en nuestro país están dadas para aumentar la producción, no se ha llegado a hacerlo. A raíz de sus resultados, un equipo interdisciplinario de investigadores de la Facultad de Agronomía, Udelar, liderados por Vivian Severino, trabaja actualmente en un proyecto de polinización artificial con el objetivo de solucionar el problema. En ese proyecto se enmarca la presente investigación, tratando de aportar herramientas para la solución de la problemática productiva.

El Aloe

El género *Aloe* L., pertenece a la familia Xanthorrhoeaceae y cuenta con más de 550 especies (The Plant List, con: 24-02-2021), varias de ellas cultivadas o utilizadas por sus propiedades medicinales, industriales y cosméticas. Aunque la mayoría de las especies tienen componentes similares, *Aloe barbadensis* Miller., y *Aloe arborescens* Miller., son las más cultivadas en el mundo (Liao et al., 2006). En la hoja de aloe se reconocen dos regiones principales, la zona exterior de color verde y la zona interior de mesófilo con

parénquima incoloro. Tanto en la zona exterior como en el mesófilo existen componentes químicos relevantes. Mientras que en la zona exterior se encuentran algunos derivados de la 1,8-dihidroxiantraquinona y sus glucósidos, así como algunas antraquinonas como la aloína A y B (conocidas como barbaloína); en el mesófilo se encuentran carbohidratos complejos, donde el acemanano o carrisina parece ser el compuesto más bioactivo (Pellizzoni et al., 2012).

El aloe se utiliza como medicina desde la antigüedad en todo el mundo. Existen informes antiguos sobre su uso para lesiones cutáneas. Según Di Luccia (2013) es conocido por su eficacia para tratar quemaduras y aumentar la cicatrización de heridas cutáneas, pero también presenta propiedades inmunoestimulantes y anticancerígenas. En Japón, *Aloe arborescens* es la especie más popular y la llaman “aloe Kidachi” (Saito 1993). En la actualidad se cultiva comercialmente en varios países como Australia, Brasil, España, Italia y Uruguay.

Ramirez et. al (2017) realizaron una investigación de germinación de polen de tabaco sobre el mesófilo de *Aloe vera* (L.) Burm.f., (sábila), obteniendo mejores resultados que los germinados en el medio propuesto por Ordoñez (2014). Según Adams (1916), para la germinación de tubos polínicos en polen de manzana, el uso del cubreobjetos dificulta la interacción del polen con el oxígeno. Basado en esto, la presente investigación pretende evaluar la potencialidad del *Aloe* como medio de germinación de polen de manzana *in vitro,* como punto de partida para una posible evaluación en cultivos. Para ello, y como adaptación a las condiciones de nuestro país, se utilizará *A. arborescens*, por presentar mayor accesibilidad y abundancia, ya que se encuentra en jardines, calles y terrenos de Montevideo y zonas aledañas, de donde se colectó con las autorizaciones pertinentes. Además intentará demostrar si el uso del cubreobjetos afecta o no al crecimiento de tubos polínicos de manzana en el medio de Aloe

Objetivo

El objetivo de este trabajo es evaluar la potencialidad del gel de *Aloe arborescens* Miller., como medio de cultivo *in vitro* de *Malus domestica* Borkh.

Objetivos específicos:

- Comparar la capacidad germinativa del polen de manzana con distintos medios de cultivo *in vitro*.

- Analizar el potencial como medio de germinación in vitro del *Aloe* con y sin cubreobjetos.

Materiales y métodos

En primera instancia, se realizó un test de viabilidad polínica para evaluar el estado sanitario del polen en el momento previo a cada ensayo. Para ello utilizó el test de viabilidad polínica de Ordoñez (2014) modificado, sustituyendo la tinción rojo carmín por fucsina ácida (Gamerro, 1986). El conteo de granos de polen viables y germinados se llevó a cabo utilizando la escala propuesta por Ramirez et. al. (2017), donde se contaron 250 granos de polen en vez de 100 como plantea Ordoñez, a los efectos de aumentar el número de observaciones.
Para las pruebas de crecimiento del tubo polínico se utilizaron los siguientes medios:

- Medio de cultivo Reddy & Kakani (2007).
- Solución de Boro, Calcio , Zinc y agua azucarada.
- Mesófilo de *Aloe. arborescens* procesado (muestras utilizando cubreobjetos).
- Mesófilo de *A. arborescens* procesado (muestras sin cubreobjetos).

En todos los ensayos se utilizó polen de manzano cosechado en 2020 en Chile, adquirido en Polen Chile®, mantenido en el congelador para su correcta conservación . Para evaluar el crecimiento de tubos polínicos en todos los medios, se realizaron 5 repeticiones con 10 réplicas cada una.
La elaboración de los preparados de *Aloe* y de la solución de B, Ca y Zn, consistió en colocar en el portaobjetos el medio correspondiente, donde se sembró polen con un palillo mondadientes esterilizado. Luego se incubaron las muestras en una cámara húmeda con el método de la gota pendiente, se colocó el portaobjetos dentro de una placa de Petri junto a un trozo de algodón embebido en agua para evitar una evaporación excesiva (Gamerro,1986) durante 30 minutos, a continuación se le colocó el cubreobjetos y se observó al microscopio. Después de la primera observación, las muestras se mantuvieron en sus cámaras húmedas, dentro de una estufa a 25° C.
En todos los ensayos se realizaron observaciones al microscopio a los 30 minutos, 24 hs, 48 hs y 72 hs luego de sembrado el polen (Buiza y Ramírez, 2006, modificado).
Todas las observaciones fueron realizadas con un microscopio Olympus CX41. Las imágenes tomadas de las muestras se realizaron con una cámara Infinity 1, junto con el software Teledyne Lumenera INFINITY ANALYZE, Versión 7.0.3.1111.
Los ensayos fueron realizados en el Laboratorio de Palinología del Departamento de Paleontología de la Facultad de Ciencias, Udelar.

Medio Reddy & Kakani

La técnica descrita por Reddy-Kakani (Reddy & Kakani, 2007) realiza 1000 ml de solución, mientras que para esta investigación se redujeron las cantidades y se realizó para cada repetición 200 ml de solución, de la cual se utilizaron 10 ml en cada una de las 10 réplicas.
Al elaborar 200 ml de solución se utilizaron: 20 g de sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$), 100 mg de Nitrato de Calcio [$Ca(NO_3)_2 4H_2O$], 24 mg de Sulfato de Magnesio ($MgSO_4$), 20 mg Nitrato de Potasio (KNO_3), 24 mg de Ácido Bórico (H_3BO_3), 4 g de agar y 200 ml de agua destilada (H_2O).

Primero se mezclaron la sacarosa, el Nitrato de Calcio, el Sulfato de Magnesio, el Nitrato de Potasio, el Ácido Bórico y el agar. Posteriormente, se agregó el agua y se mezclaron los componentes mediante la acción de un agitador magnético. Al disolverse todos los componentes en el agua, se ajustó el pH de la solución en 6. El pH se midió con cintas de ph Merck® y se reguló con la adición de Hidróxido de Sodio (NaOH) y/o Ácido Clorhídrico (HCl). Cuando el pH fue ajustado, se procedió a calentar la solución en un agitador magnético con temperatura, a 300°C durante 10 minutos. Luego se colocaron 10 ml de solución en cada una de las 10 cajas de petri donde se realizaron las réplicas y se taparon las cajas, dejando solidificar el medio en las placas cerradas. Ya enfriado y solidificado el medio de cultivo, se espolvoreó polen con la ayuda de un palillo mondadientes esterilizado, se tapó la muestra, y se incubaron durante 30 minutos hasta la primera observación al microscopio. Finalizado este procedimiento, se llevaron las muestras a una estufa a 25°C para observarlas a las 24 hs, 48 hs y 72 hs

Medio de B, Ca y Zn

La solución de B, Ca y Zn, se suele utilizar para abastecer de macro y micronutrientes a los cultivos de manzano (com. pers., Polen Chile®, 2021). Cuando se aplica a nivel de cultivo se utilizan 3 litros de la solución de B, Ca y Zn (9,3%), 3 litros de solución de sacarosa (1,5 kg de sacarosa + 2 litros de agua) (9,3%), y 100 litros de agua. En los ensayos de laboratorio, se realizaron en cada repetición 100 ml de solución. Ésta constó de 3 ml de la mezcla de B, Ca y Zn; 3 ml de azúcar (1,5 g + 2 ml de H2O); y 100 ml de agua destilada (Fig. 2). De la solución obtenida se colocaron 4 gotas en un portaobjetos, se le añadió una pequeña cantidad de polen, se los guardó en la cámara húmeda durante 30 minutos y se le colocó el cubreobjetos. Se observaron las muestras en el microscopio y luego fueron llevadas a una estufa a 25°C hasta su próxima observación.

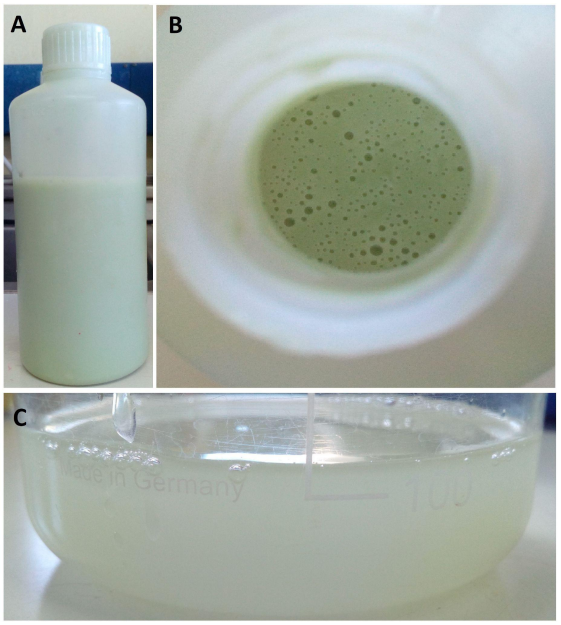

Figura 2. Medio de cultivo de Boro, Calcio y Zinc utilizado para germinar polen de *Malus domestica* Borkh. **A.** y **B.** Mezcla de B, Ca y Zn. **C.** Medio de cultivo de B, Ca, Zn, sacarosa y agua, listo para elaborar los preparados con polen.

Medio de *Aloe arborescens*

En los medios de aloe con y sin cubreobjetos, el procesamiento del material vegetal fue el mismo. Se cosecharon hojas de aloe entre las 8 y las 9 de la mañana del día a realizarse el experimento. La cosecha se realizó en 34°48'53.0"S 55°57'06.0"W en la localidad de Montes de Solymar, Canelones, Uruguay (Fig. 3). Las hojas recolectadas fueron seleccionadas por poseer tamaño vegetativo mediano y ausencia de lesiones ocasionadas por insectos o factores externos. La parte por donde se cortó la hoja (posición proximal al tallo) fue envuelta en papel absorbente y mantenida con el ápice de la hoja hacia arriba, hasta el momento de su procesamiento. Ya en el laboratorio, se enjuagaron las hojas, se les quitaron las espinas y una de las zonas exteriores verdes con una hoja de afeitar. Luego se extrajo el mesófilo de aloe y se colocó en un recipiente limpio (Fig. 4). Se colocaron 60 gr de mesófilo de aloe con 100 ml de agua en el vaso de un mixer Cuori modelo Presto, y se licuó durante un minuto (Fig. 5). La solución obtenida se trasvasó a un vaso de bohemia de donde se extrajo para aplicar en las muestras.
Para realizar las muestras con el medio de aloe sin cubreobjetos, se colocaron cuatro gotas de solución de aloe en un portaobjetos, se les añadió una pizca de polen con un palillo mondadientes esterilizado y se los colocó en una cámara húmeda. A los 30 minutos se observaron por primera vez al microscopio, luego se trasladaron a una estufa a 25°C hasta su siguiente observación.
En el caso de las muestras correspondientes al medio de aloe con cubreobjetos, se realizó el mismo procedimiento que para las muestras de aloe sin cubreobjetos, excepto que pasados los 30 minutos en la cámara húmeda, se les colocó un cubreobjetos (Fig.6). Luego se los observó en el microscopio y se los llevó a la estufa.

Figura 3. Planta madre de *Aloe arborescens* de la que se extrajo el material vegetal para el experimento. **A.** Planta durante la toma de muestras, en estado vegetativo. **B.** Planta a la semana siguiente de finalizar los experimentos con material vegetal, en estadio pre floral.

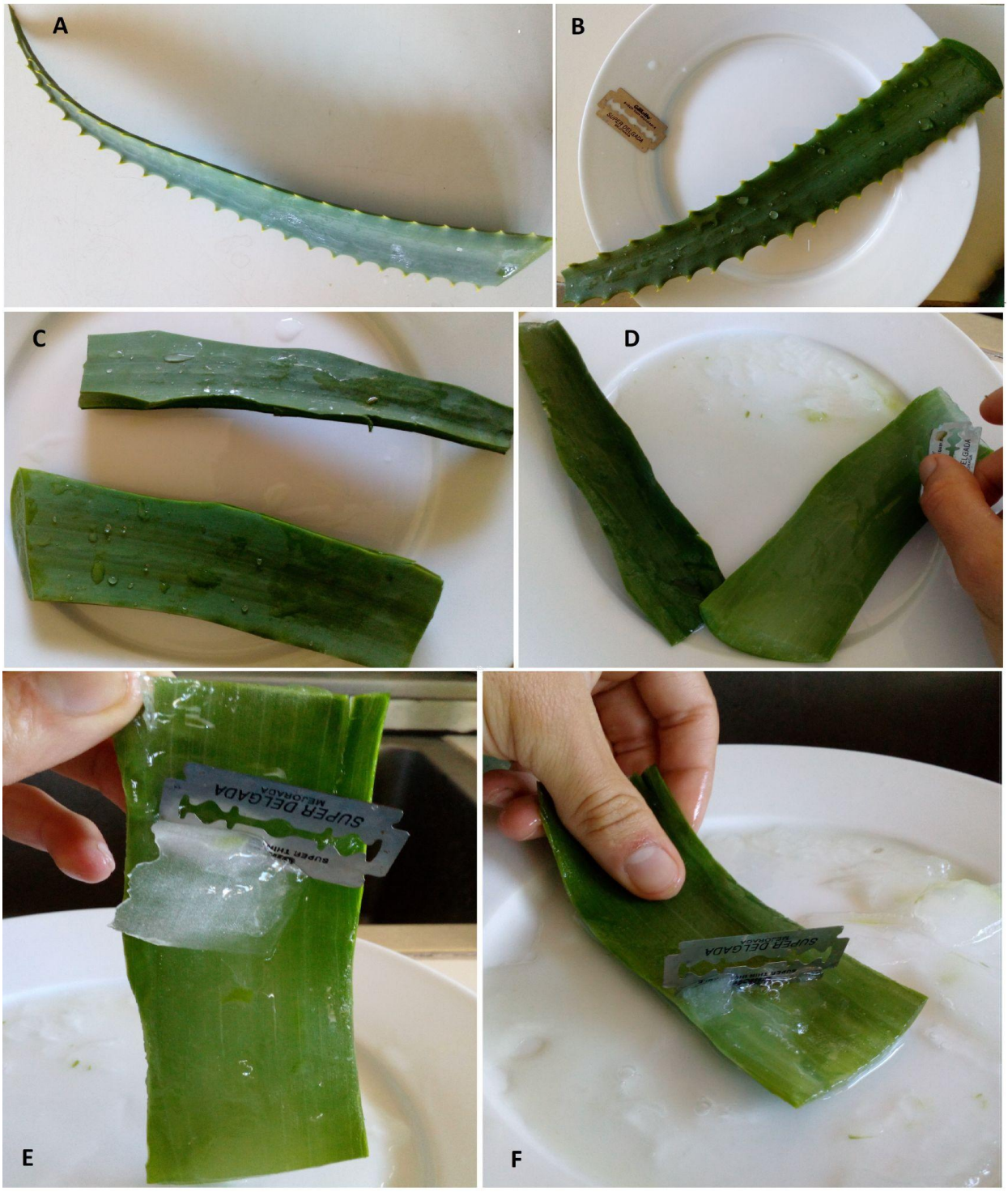

Figura 4. Procesamiento de las hojas de *Aloe arborescens*. **A.** Hoja lista para procesar. **B.** Hoja lavada con el ápice cortado. **C.** Hoja sin espinas. **D.** Hoja con epidermis separada. **E y F.** Extracción del mesófilo.

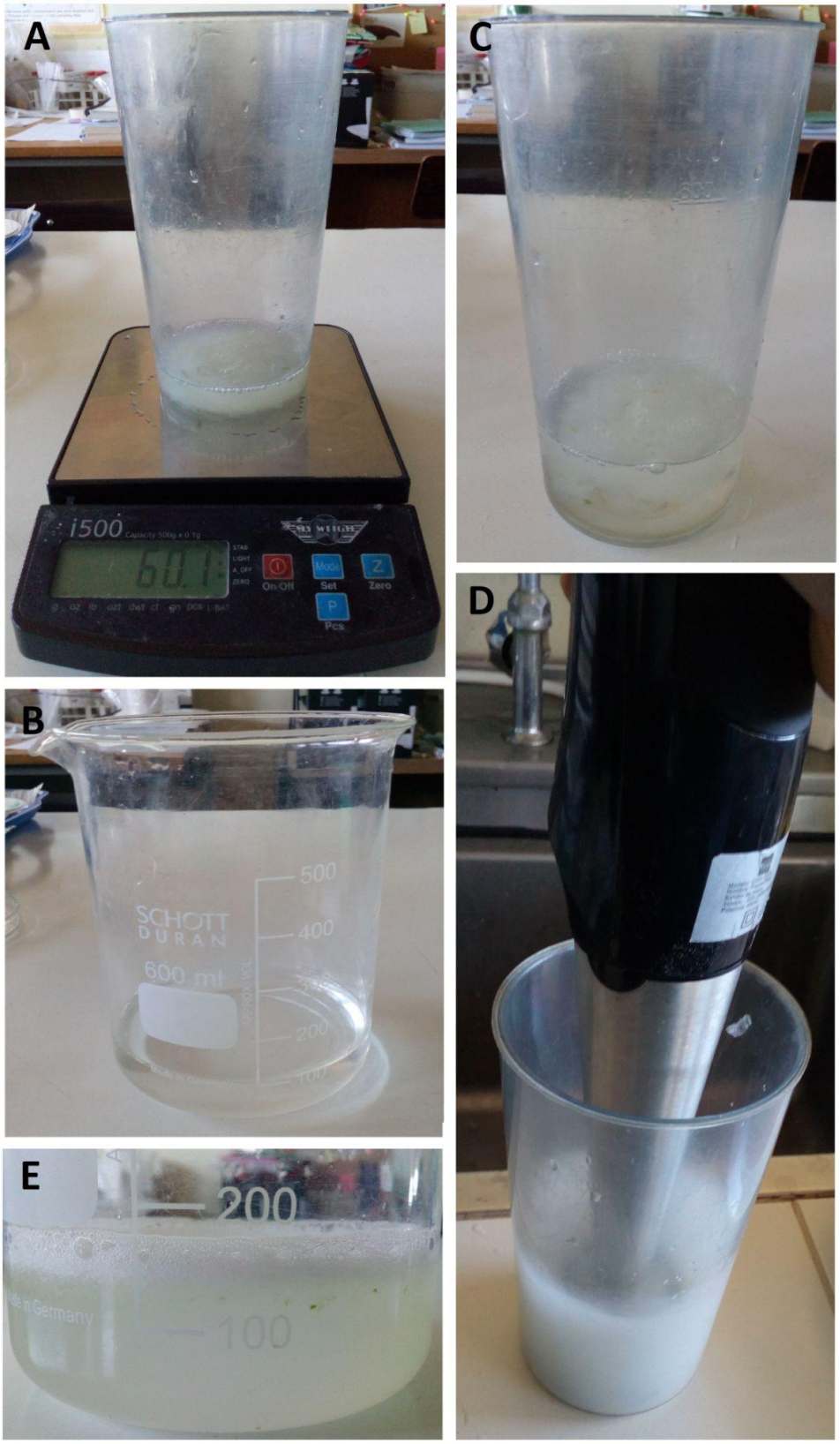

Figura 5. Procesamiento del mesófilo de *Aloe arborescens*. **A.** Mesófilo de aloe antes de procesar. **B.** Agua para añadir al mesófilo. **C.** Mezcla de mesófilo y agua sin procesar. **D.** Mezcla mientras se licúa. **E.** Solución final lista para realizar las muestras.

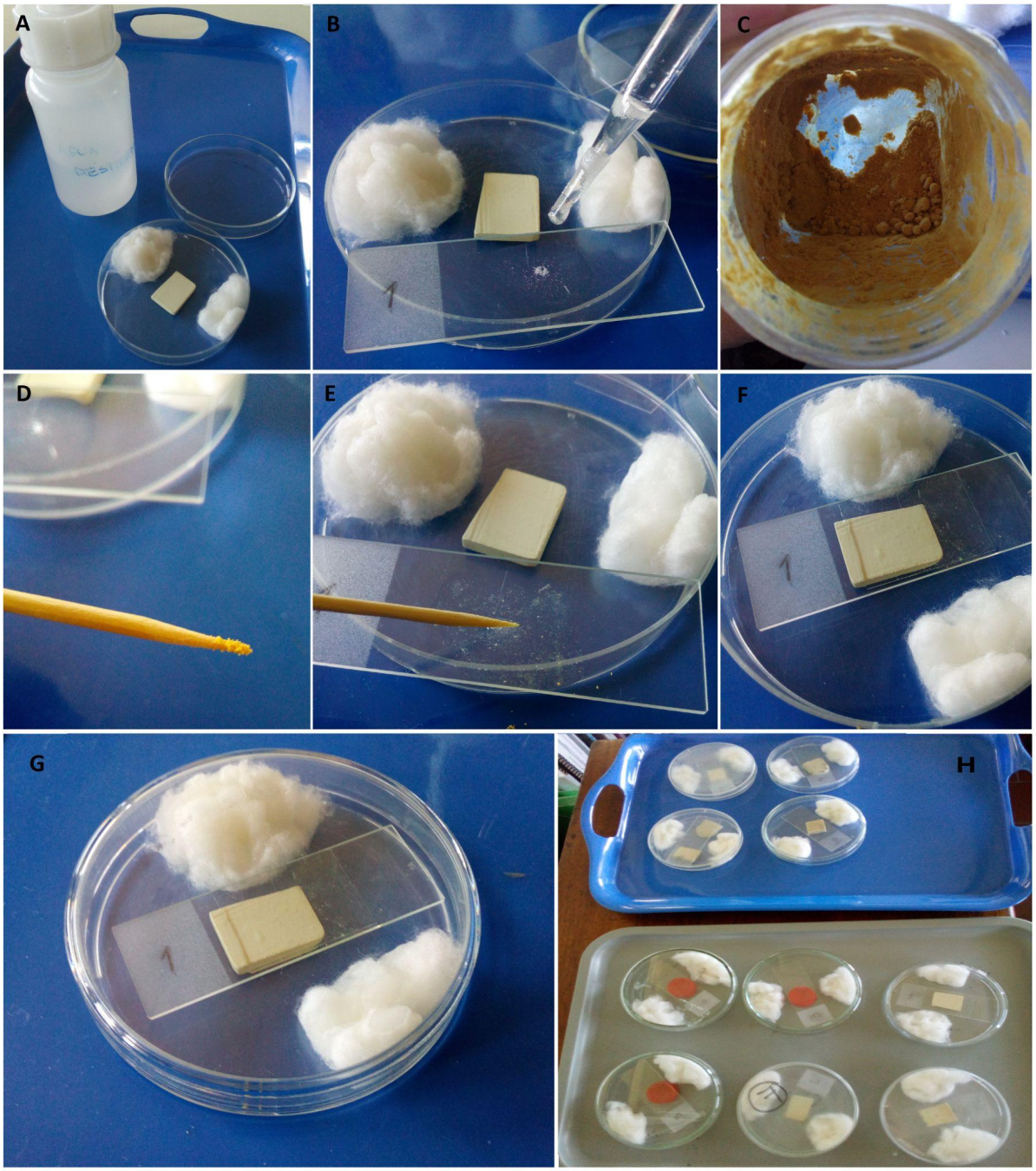

Figura 6. Elaboración de un preparado con medio de *Aloe arborescens*. **A.** Armado de cámara húmeda donde se conservará el preparado. **B.** Colocación del medio de cultivo de aloe en el portaobjetos. **C.** Polen a utilizar. **D.** Pizca de polen a incorporar en el preparado. **E.** Polen sembrado en el medio de aloe. **F.** Colocación del cubreobjetos. **G.** Preparado en condiciones para observar al microscopio o llevarlo a la estufa. **H.** Réplicas del ensayo pertenecientes a una repetición.

Procesamiento de datos

Al finalizar la captura de imágenes digitales de cada repetición, se procedió al conteo de granos de polen. En cada conteo se clasificó a los granos como: no germinados (NG); brotados; germinados; secos o con hongos. Los granos considerados germinados son aquellos que presentan un tubo polínico de longitud mayor o igual al diámetro del grano (Luza et. al., 1987; Kalinganire et. al., 2000), mientras que los brotados son aquellos que emitieron tubo pero no han llegado a considerarse germinados (Figura 7). De los resultados obtenidos en cada réplica, se realizó la suma de la totalidad de granos de cada categoría (NG, brotado, germinado, seco), para las réplicas correspondientes a cada observación. Finalizadas todas las observaciones (30 min, 24 hs, 48 hs y 72 hs) de cada repetición, se realizó la suma de los totales obtenidos de cada categoría y observación, obteniendo un resultado final de cada categoría para la repetición. A su vez, los resultados obtenidos para cada repetición de un mismo ensayo fueron sumados para obtener un total final de datos de cada categoría en cada ensayo.

Figura 7. Clasificación de los granos de polen según el grado de emisión de los tubos polínicos.. A: Grano sin brotar; B: Grano brotado; C: Grano germinado.

A todos los conjuntos de datos se les realizó una prueba de normalidad, y al ser todos normales se procedió a realizar un test t-student de datos no pareados. El análisis t-student fue realizado online con el software de GraphPad® (https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest2/). Se compararon los cuatro tratamientos entre sí en las categorías: no germinado (NG); brotados; germinados; secos o con hongos .

Se realizó una análisis gráfico del porcentaje de granos contados perteneciente a cada categoría en cada ensayo. También se evaluó la evolución del comportamiento de los ensayos en el tiempo para cada categoría.

Todas las gráficas fueron realizadas en el software de hojas de cálculo de Google.

Todas las imágenes fueron tomadas por el autor de este trabajo.

Resultados

Todos los test de tinción para evaluar viabilidad polínica dieron resultados positivos, superiores al 95%, indicando que el polen era viable y estaba en buenas condiciones (Figura 8).

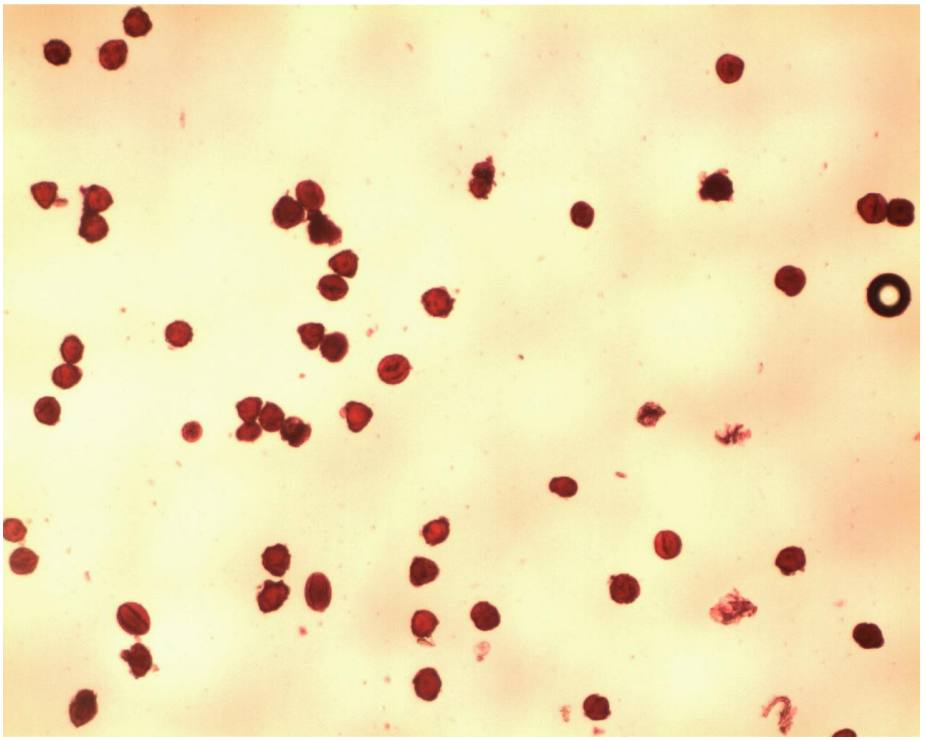

Figura 8. Muestra de granos de polen en una evaluación de viabilidad, aplicando el método de Ordoñez (2014) modificado.

De 50.000 granos de polen contados en cada ensayo, sólo lograron germinar entre 0,37% y 1,08% del total de ellos (Tabla 1).

Los resultados evidencian la capacidad germinativa del polen de manzano en los distintos medios. En el que presenta mejor rendimiento es en el de Reddy Kakani, seguido por el medio de B, Ca y Zn, por el de aloe con cubreobjetos y por el de aloe sin cubreobjetos (Tabla 1)(Figura 9).

Comparando los medios de aloe, el que presentó una tasa de germinación más alta fue el de aloe con cubreobjetos.

Tabla 1. Porcentaje de granos de polen de *Malus domestica* Borkh. para cada medio de cultivo en cada categoría de clasificación.

	Aloe sin cubreobjetos	Aloe con cubreobjetos	B, Ca y Zn	Reddy Kakani
Germinados	0,37 b	0,77 a	0,882 a	1,088 a
Brotados	1,254 b	2,154 a	2,234 a	1,464 ab
No Germinados	70,876 b	77,076 b	91,884 a	73,448 b
Secos o con hongos	27,5 a	20 ab	5 b	24 a

Letras distintas en la fila representan diferencias estadísticas (p<= 0,05)

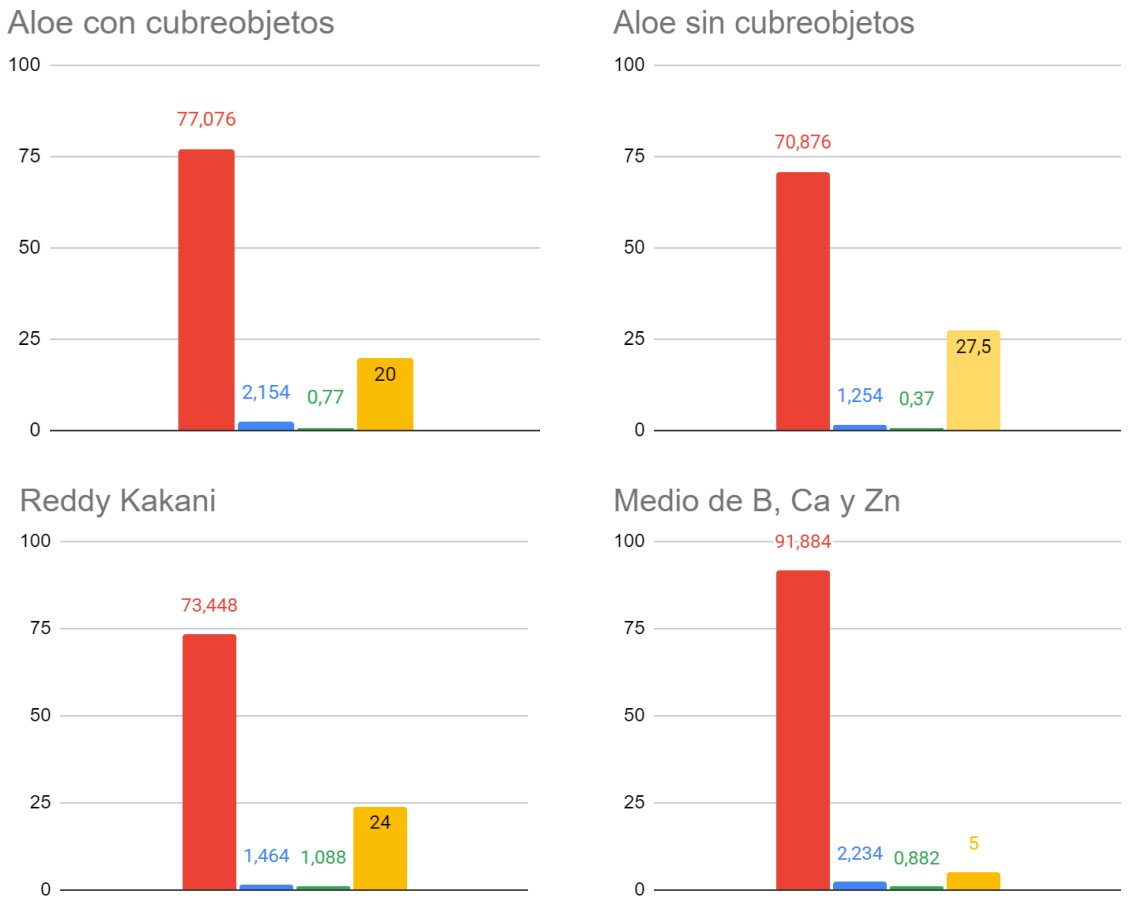

Figura 9. Resultados totales del conteo de granos de polen de *Aloe arborescens* para cada medio de cultivo expresado en porcentaje para cada categoría. Rojo: No germinados; Azul: Brotados; Verde: Germinados; Amarillo: Secos o con hongos.

En relación con el comportamiento de los granos de polen en los diferentes tiempos de tratamiento, los valores máximos de germinación se dieron a los 30 minutos en la mayoría de los ensayos a excepción del medio de B, Ca y Zn donde se dió a las 24 hs (Tabla 2). Los mínimos de germinación fueron a las 72 hs, posiblemente debido al aumento de granos secos o con hongos. A los 30 minutos el aloe con cubreobjetos presenta mayor cantidad de granos germinados que el B, Ca y Zn, pero a partir de las 24 hs, ocurre lo inverso. Además, el medio de B, Ca y Zn es el único que mantiene sus niveles de germinación relativamente constantes a lo largo del tiempo (Figura 10).

Tabla 2. Conteo total de granos germinados de polen de *Malus domestica* Borkh., para cada medio de cultivo en cada horario de observación.

Germinados				
	Aloe sin cubreobjetos	Aloe con cubreobjetos	B, Ca y Zn	Reddy Kakani
30 min	87	131	110	204
24 hs	51	115	122	161
48 hs	31	82	110	162
72 hs	16	57	99	17

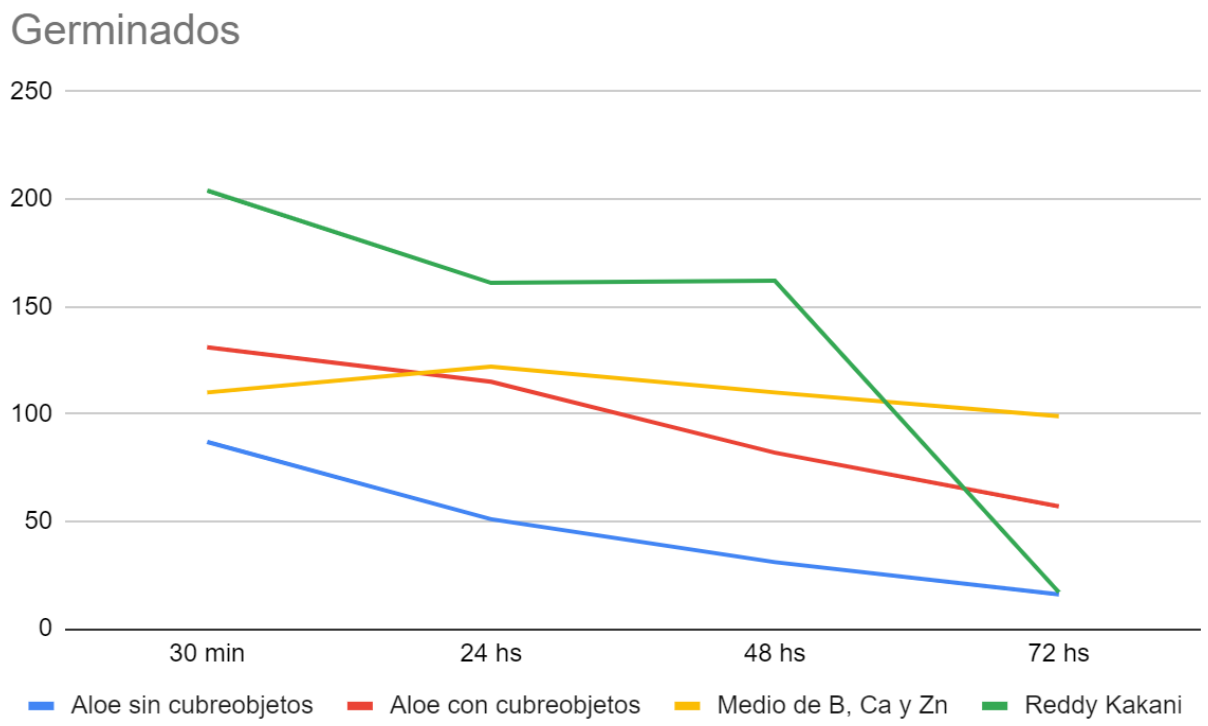

Figura 10. Total de granos germinados de polen de *Malus domestica Borkh.,* en distintos medios de cultivo *in vitro* en cada hora de observación.

El pico de cantidad de granos brotados en los medios de aloe con cubreobjetos y de B, Ca y Zn es a las 24 hs., siendo mayor la cantidad en el medio de aloe (Tabla 3). En comparación con el medio Reddy Kakani, el medio de B, Ca y Zn es mejor en brotación a partir de las 24 hs, mientras que el Aloe con cubreobjetos es superior desde los 30 minutos (Fig. 11).

Tabla 3. Conteo total de granos brotados de polen de *Malus domestica* Borkh., para cada medio de cultivo en cada horario de observación.

Brotados				
	Aloe sin cubreobjetos	Aloe con cubreobjetos	B, Ca y Zn	Reddy Kakani
30 min	251	321	275	294
24 hs	202	386	335	179
48 hs	107	212	254	214
72 hs	67	158	253	45

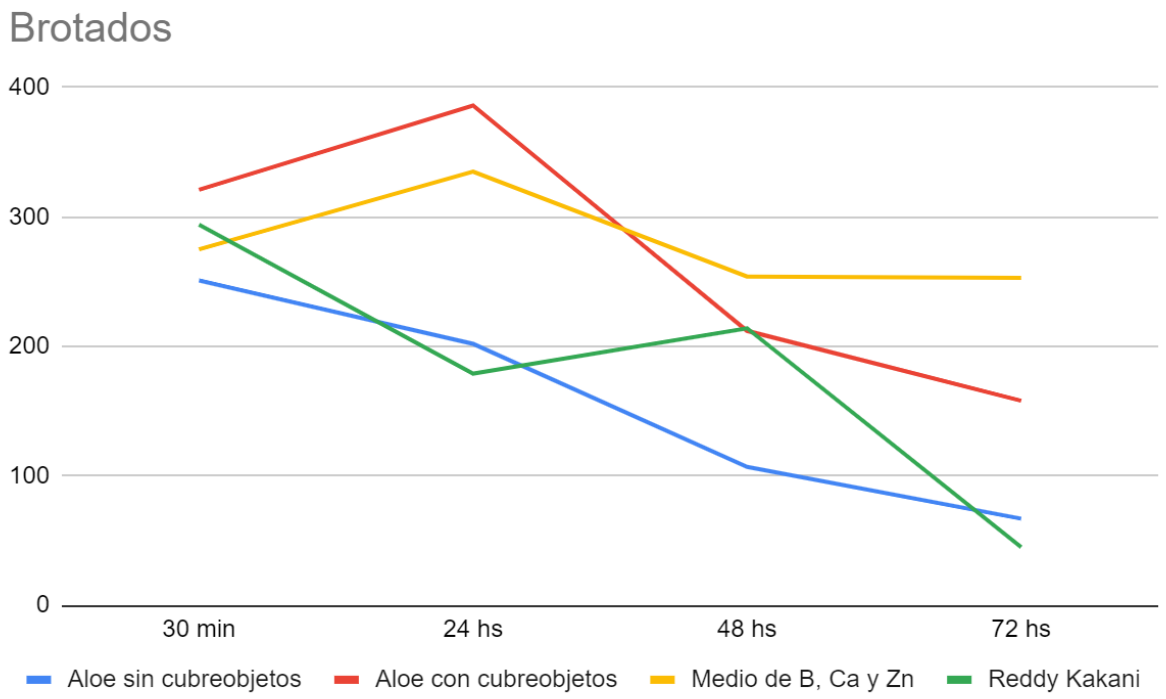

Figura 11. Total de granos brotados de polen de *Malus domestica Borkh.,* en distintos medios de cultivo *in vitro* en cada hora de observación.

En lo que respecta a los granos no germinados, el ensayo con el medio de B,Ca y Zn presentó la mayor cantidad, seguido por el medio de aloe con cubreobjetos, por el Reddy Kakani y por el medio de aloe sin cubreobjetos (Tabla 4)(Figura 12).

Tabla 4. Conteo total de granos no germinados de polen de *Malus domestica* Borkh., para cada medio de cultivo en cada horario de observación.

No Germinados				
	Aloe sin cubreobjetos	Aloe con cubreobjetos	B, Ca y Zn	Reddy Kakani
30 min	12162	12048	12115	12002
24 hs	10497	11749	11793	12160
48 hs	8112	8456	11136	9624
72 hs	4667	6285	10898	2938

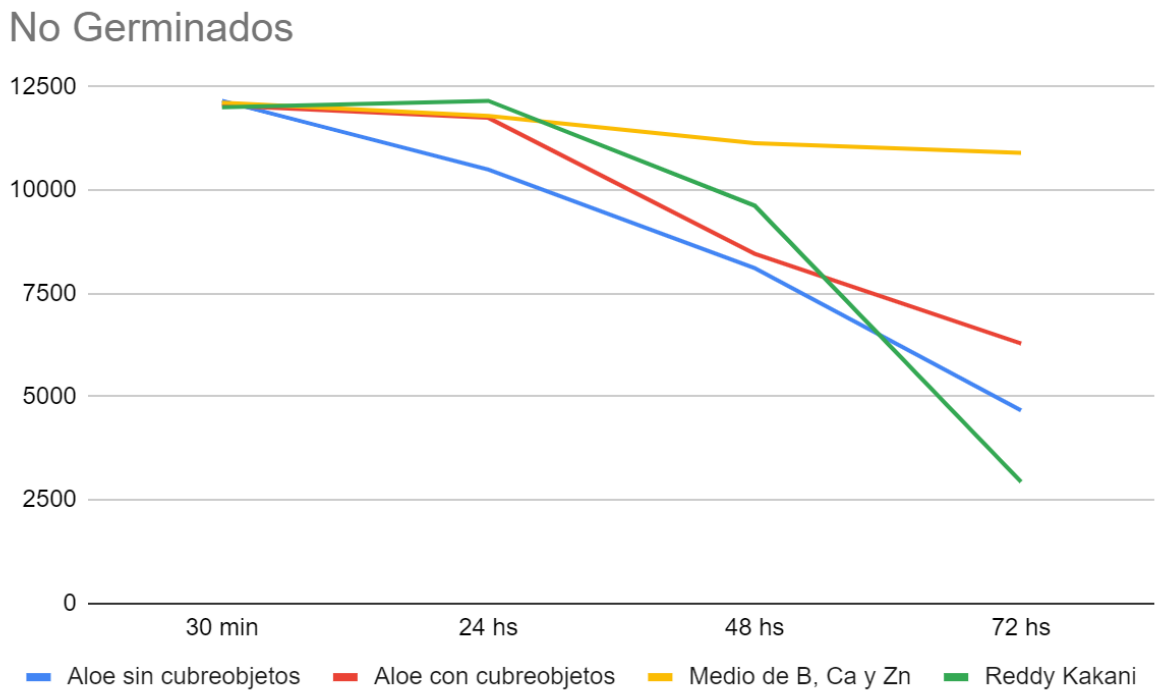

Figura 12. Total de granos no germinados de polen de *Malus domestica Borkh.,* en distintos medios de cultivo *in vitro* en cada hora de observación.

Los niveles de brotación y la cantidad de granos no germinados disminuyen con el avance del tiempo, los granos brotados lo hacen a partir de las 24 hs (Figura 12). De manera inversa, los granos secos o con hongos aumentan a medida que transcurre el tiempo (Figura 13).

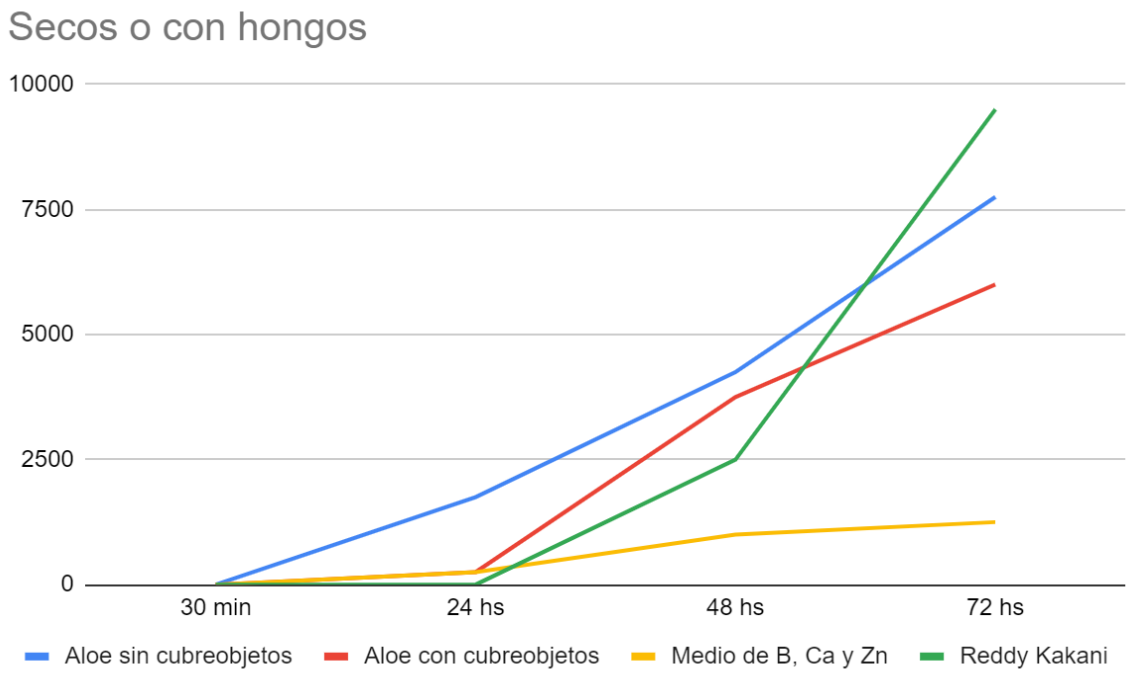

Figura 13. Total de granos secos o con hongos de polen de *Malus domestica Borkh.,* en distintos medios de cultivo *in vitro* en cada hora de observación.

El medio Reddy Kakani es susceptible a la aparición de hongos (Reddy & Kakani, 2007), alcanzando el máximo de granos secos o con hongos de todos los medios. A él le siguen el aloe sin cubreobjetos, luego el aloe con cubreobjetos y por último el medio de B, Ca y Zn, que es el que menos granos secos o con hongos presenta (Tabla 5).

Tabla 5. Conteo total de granos secos o con hongos de polen de *Malus domestica* Borkh., para cada medio de cultivo en cada horario de observación.

Secos o con Hongos				
	Aloe sin cubreobjetos	Aloe con cubreobjetos	B, Ca y Zn	Reddy Kakani
30 min	0	0	0	0
24 hs	1750	250	250	0
48 hs	4250	3750	1000	2500
72 hs	7750	6000	1250	9500

El medio de aloe con cubreobjetos a partir de las 24 hs presenta mayor cantidad de granos secos que el medio de B, Ca y Zn, pero menor que el aloe sin cubreobjetos y Reddy Kakani (Fig. 13).

De manera general, se puede afirmar que el medio de cultivo que mostró peores resultados en la mayoría de las categorías es el de aloe sin cubreobjetos, ya que presenta los niveles de brotación y germinación más bajos y es el segundo peor después del medio Reddy Kakani en cantidad de granos secos o con hongos.

.

A partir de los datos obtenidos mediante el análisis estadístico de la comparación entre los diferentes medios se obtuvieron diferentes resultados para cada categoría (Tabla 6).

Los valores muy significativos de granos germinados se observaron al enfrentar tanto los medios de aloe con y sin cubreobjetos, como B, Ca y Zn y aloe sin cubreobjetos. Los valores significativos corresponden a la relación entre el medio Reddy Kakani y el aloe sin cubreobjetos.

Respecto a los granos de polen brotados, los valores muy significativos corresponden a la comparación entre el medio de B, Ca y Zn y el aloe sin cubreobjetos. Los valores significativos se presentaron al enfrentar el medio de aloe con y sin cubreobjetos; el de aloe con cubreobjetos y Redy Kakani; y el medio de B, Ca y Zn con Redy Kakani.

En la categoría de granos no germinados, el medio de B, Ca y Zn presentó valores significativamente mayores al enfrentarlo con los dos medios de aloe y el de Reddy Kakani.

Para los granos secos o con hongos, el aloe sin cubreobjetos resultó mayor de manera muy significativa al cotejarlo con el medio de B, Ca y Zn. A su vez, este medio aportó valores significativamente menores que el de Reddy Kakani.

Tabla 6. Valores P obtenidos a partir del análisis estadístico t-test, donde se comparan los resultados de los cuatro medios de cultivo in vitro en cada categoría de clasificación de los granos de polen de *Malus domestica* Borkh.

	Germinados	Brotados	No Germinados	Secos o con Hongos
Aloe sin cubreobjetos - Aloe con cubreobjetos	0,0197*	0,0051**	0,4729	0,3838
Aloe sin cubreobjetos- Solución de B, Ca y Zn	0,0036**	0,0043**	0,0125*	0,0084**
Aloe sin cubreobjetos - Reddy Kakani	0,0110*	0,1960	0,7642	0,6822
Aloe con cubreobjetos - Solución de B, Ca y Zn	0,3095	0,8041	0,0309*	0,6095
Aloe con cubreobjetos - Reddy Kakani	0,1607	0,0207*	0,3473	0,6095
Solución de B, Ca y Zn - Reddy Kakani	0,3288	0,0159*	0,0124*	0,0101*

* Significativo p<=0,05; ** Muy significativo p<=0,01

Discusión y conclusiones

Los resultados muestran tasas de germinación menores al 1%, que son muy bajas, pero hay que considerar que por más que se intente controlar todas las variables, la germinación *in vitro* no imita completamente el crecimiento de los tubos *in vivo*, ya que no es posible duplicar la dinámica de la interacción polen pistilo (Taylor & Hepler, 1997). Incluso en medios de cultivo optimizados, los tubos presentan un 30-40% de la longitud *in vivo* (Taylor & Hepler, 1997) y una velocidad de crecimiento del 10% de la que ocurre en condiciones naturales (Buiza & Ramírez, 2006). La baja tasa de germinación podría explicarse por factores ambientales, como la temperatura o la humedad (Polanía, 1952; Luza et. al., 1987; Garduño-Tamayo et. al., 2011). Por ejemplo, al trasladarse las muestras de la estufa al microscopio se pueden haber presentado alteraciones en esas variables, mínimas pero considerables. También podría influir el factor genético, ya que los distintos genotipos pueden presentar distinto porcentaje de germinación aún sometidos a las mismas condiciones, como lo demuestran Garduño-Tamayo et. al. (2011) en polen de sorgo.

Los datos obtenidos con respecto a la germinación mostraron sus valores máximos antes de las 24 hs, coincidiendo con lo planteado por Araméndiz-Tatis et. al., (2013). A su vez, a medida que transcurre el tiempo, disminuye la cantidad de granos germinados, como lo demuestran Buiza y Ramírez (2006) y Araméndiz-Tatis et. al., (2013), lo que podría darse por el decrecimiento de la tasa respiratoria del polen, como sugieren Karapanos et. al. (2009).

El medio Reddy Kakani fue el que mejores resultados presentó respecto a la germinación *in vitro* del polen de manzano. Sin embargo, es un medio que se utiliza únicamente para el estudio en laboratorio, por lo tanto, no se pueden extrapolar estos resultados a un posible estudio *in vivo*.

Por otra parte, la única diferencia estadísticamente significativa en la comparación entre el medio de aloe con cubreobjetos y el de B, Ca y Zn es respecto a los granos no germinados. Al no presentar ninguna otra diferencia relevante se puede inferir que el comportamiento de ambos medios tiene resultados similares para beneficiar a los granos de polen a aumentar su posibilidad y probabilidad de germinación y llegada al ovario. Esto indica que se podría evaluar la posibilidad de utilizar el medio de aloe como bioestimulante para la asistencia a la polinización *in vivo* en cultivos de manzana, ya que hasta ahora sólo se ha probado su desempeño en condiciones de laboratorio.

El aloe, presenta en su composición diversos micronutrientes, dentro de los que se encuentran el B, Ca y Zn (Buiza & Narbona, 2017), que sumado a su riqueza en carbohidratos (Di Luccia et. al., 2003) podrían explicar sus tasas de germinación.

Un aspecto a considerar es el estado de la planta de aloe utilizada para los experimentos, ya que al momento de colecta, la planta puede estar en diferentes condiciones fisiológicas o sanitarias. Respecto al aloe colectado para el medio con cubreobjetos, cuatro de las cinco repeticiones fueron realizadas mientras la planta se encontraba en estado vegetativo, mientras que en la última repetición, al cosechar las hojas, la planta se encontraba en un estado fenológico diferente, ya que presentaba escapo floral. En esta última repetición fue en la que mejores resultados se observaron para el medio de aloe, lo que significa que

habría que seguir experimentando con el medio durante todos los estadios fenológicos de la planta, para evaluar si mejora su potencialidad en algún momento específico de su desarrollo.

Los efectos de la ausencia de cubreobjetos en los preparados muestra que los granos de polen pueden brotar y germinar, pero con peores resultados que en los preparados con cubreobjetos. Las muestras sin cubreobjetos brotaron y germinaron en tasas más bajas que las que tenían cubreobjetos, además tienden a secarse más rápido en el tiempo, disminuyendo las probabilidades de germinación de los tubos en tiempos más extensos. Por lo tanto, estos resultados sugieren que en el medio de aloe, la ausencia del cubreobjetos limita la posibilidad de germinación de los tubos polínicos *in vitro*, contrario a lo planteado por Adams (1916).

Respecto al medio de aloe sin cubreobjetos, es necesario considerar que por más que sus resultados no sean los más favorables, son la base de comparación para las posibles extrapolaciones *in vivo* del experimento, ya que, junto con el medio de B, Ca y Zn son los medios que podrían adaptarse mejor a las condiciones de polinización asistida.

Los resultados primarios parecen indicar que el aloe puede considerarse como una alternativa para mejorar la polinización y por lo tanto, la producción de manzanas. Este método podría resultar más económico ya que los productores podrían autoabastecerse de esta planta, fundamentalmente en plantaciones medianas o pequeñas. Especialmente sería un método válido para la producción ecológica, ya que resultaría inocuo para el ambiente. De todas formas, es necesario continuar con la investigación *in vitro* e *in vivo* de estos procesos para poder ajustar con mayor precisión el desarrollo de este tipo de técnicas y aumentar los porcentajes de germinación hasta ahora obtenidos.

Bibliografía

Adams, J. (1916). On the germination of the pollen grains of apple and other fruit trees. *Botanical Gazette, 61(2), 131-147.*

Andrés, M. V., Martin, R., Perales, L., & Duran, J. M. (2000). Polinización y germinación in vivo del polen en variedades de manzano, peral, nectarino y melocotonero. *ITEA (Información Técnica Económica Agraria), AIDA, Saragosse, Spain, 96, 49-59.*

Araméndiz-Tatis, H., Cardona-Ayala, C., & Jarma-Orozco, A. (2013). Eficiencia de dos métodos para evaluar la viabilidad del polen de berenjena (Solanum melongena L. cv. Lila criolla). *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica, 16(2), 351-358.*

Auer W. 2021. Malus domestica. In: PalDat - A palynological database. https://www.paldat.org/pub/Malus_domestica/306280; accessed 2022-02-09

Broothaerts, W. (2003). New findings in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S-alleles. *Theoretical and applied Genetics, 106(4), 703-714.*

Buiza, J. I., & Narbona, W. O. (2017). Atributos biológicos y terapéuticos de la Sábila (Aloe vera)| Biological and therapeutic attributes of Aloe (Aloe vera). *SABER, 29, 267-281.*

Buiza, J. I., & Ramírez, Y. C. (2006). Durabilidad de la capacidad germinativa del polen en Aloe vera (L.) Burm. f. y A. saponaria Haw. Revista Científica UDO Agrícola, 6(1), 67-75.

Coque Fuertes, M., DIAZ HERNANDEZ, M. B., & García Rubio, J. C. (2012). El cultivo del manzano. *Editorial Paraninfo.*

Cuevas, J. (2019). Polinización: Fisiología y Manejo en Especies Leñosas. Curso Fisiología y Manejo de la Polinización. Facultad de Agronomía, Udelar.

De Iacovo, M. & Tachini, R. (2018). Determinación de factores que limitan la productividad en cultivos de manzana de alto potencial. *Tesina de grado, Facultad de Agronomía, Udelar.*

Di Luccia, B., Manzo, N., Vivo, M., Galano, E., Amoresano, A., Crescenzi, E., & Calabrò, V. (2013). A biochemical and cellular approach to explore the antiproliferative and prodifferentiative activity of Aloe arborescens leaf extract. *Phytotherapy Research*, *27*(12), 1819-1828.

ecoportal.net/paises/en-china-los-agricultores-polinizan-a-mano-los-frutales/

Farina, W. M., Arenas, A., Díaz, P. C., Martin, C. S., & Barcala, M. C. E. (2020). Learning of a mimic odor within beehives improves pollination service efficiency in a commercial crop. *Current Biology, 30(21), 4284-4290.*

Gamerro, J. C. (1986). Dimorfismo y viabilidad del polen en Tripogandra diurética (Commelinaceae)*. Darwiniana, 143-152.*

Garduño-Tamayo, N. A., Núñez-Colín, C. A., Pecina-Quintero, V., Montero-Tavera, V., Montes-García, N., González-Chavira, M. M., & Anaya-López, J. L. (2011). Desarrollo de un método eficiente para la germinación in vitro de polen de sorgo. *Tropical and subtropical agroecosystems, 14(3), 901-906.*

Garibaldi, L. A., Morales, C., Ashworth, L., Chacoff, N. P., & Aizen, M. A. (2012). Los polinizadores en la agricultura. *Ciencia hoy, 21(126), 34-43.*

Garibaldi, L. A., Steffan-Dewenter, I., Winfree, R., Aizen, M. A., Bommarco, R., Cunningham, S. A., ... & Klein, A. M. (2013). Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance*. Science, 339(6127), 1608-1611.*

Garratt, M. P., Breeze, T. D., Jenner, N., Polce, C., Biesmeijer, J. C., & Potts, S. G. (2014a). Avoiding a bad apple: Insect pollination enhances fruit quality and economic value. *Agriculture, ecosystems & environment, 184, 34-40.*

Garratt, M. P. D., Truslove, C. L., Coston, D. J., Evans, R. L., Moss, E. D., Dodson, C., ... & Potts, S. G. (2014b). Pollination deficits in UK apple orchards*. Journal of Pollination Ecology, 12(2), 9-14.*

Giulivo, C., & Ramina, A. (1974). Effetto di massa ed azione del calcio sulla germinazione del polline di alcune specie arboree da frutto. *Rivista di ortoflorofrutticoltura italiana, 3-13.*

Hegedűs, A. (2006). Review of the self-incompatibility in apple (Malus x domestica Borkh., syn.: Malus pumila Mill.). *International Journal of Horticultural Science, 12(2), 31-36.*

Iglesias Castellarnau, I. (1993). La polinización en frutales. *Fruticultura Profesional, 53, 5-18.*

Invernizzi, C., Antunez, K. (2017)*. https://www.uypress.net/auc.aspx?79568,162*

Kalinganire, A., Harwood, C. E., Slee, M. U., & Simons, A. J. (2000). Floral structure, stigma receptivity and pollen viability in relation to protandry and self-incompatibility in silky oak (Grevillea robusta A. Cunn.). *Annals of Botany, 86(1), 133-148*.

Karapanos, I. C., Akoumianakis, K. A., Olympios, C. M., & Passam, H. C. (2009). The effect of substrate, ADP and uncoupler on the respiration of tomato pollen during incubation in vitro at moderately high temperature. *Sexual plant reproduction, 22(3), 133-140.*

Kearns, C. A., Inouye, D. W., & Waser, N. M. (1998). Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual review of ecology and systematics*, *29(1), 83-112.*

Liao, H. M., Sheng, X. Y., & Hu, Z. H. (2006). Ultrastructural studies on the process of aloin production and accumulation in Aloe arborescens (Asphodelaceae) leaves. *Botanical Journal of the Linnean Society, 150(2), 241-247.*

Luza, J. G., Polito, V. S., & Weinbaum, S. A. (1987). Staminate bloom date and temperature responses of pollen germination and tube growth in two walnut (Juglans) species*. American Journal of Botany, 74(12), 1898-1903.*

McCormick, S. (2013)*.* Pollen*. Current Biology, 23(22), R988-R990.*

Melathopoulos, A. P., Cutler, G. C., & Tyedmers, P. (2015). Where is the value in valuing pollination ecosystem services to agriculture?. *Ecological Economics, 109, 59-70.*

Ordóñez, B. (2014). Determinación de la viabilidad y fertilidad del polen. Lima: Centro Internacional de la Papa.

Oshima, R. & Dagallier, B. & Kearns, P. (2019). OECD Consensus Document on the Biology of Apple (Malus domestica Borkh.). *Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology.*

Pacini, E. (2015). Pollination. *Encyclopedia of ecology, 2857-2861.*

Pellizzoni, M., Ruzickova, G., Kalhotka, L., & Lucini, L. (2012). Antimicrobial activity of different Aloe barbadensis Mill. and Aloe arborescens Mill. leaf fractions. *Journal of Medicinal Plants Research*, *6*(10), 1975-1981.

Pinillos, V., & Cuevas, J. (2008). Artificial pollination in tree crop production. *Horticultural reviews.*

Polanía, T. H. (1952). Germinación del polen de cacao, crecimiento del tubo polínico y cuajamiento. Sus relaciones con el sombrío, el pH del estigma, estado del árbol y períodos estacionales.(Manuscrito no publicado). Fac. de Agr. Palmira.

Ramirez, D. A., Gonzalez, K., Mosquera H. R (2017). Utilización del gel de Aloe vera L. como medio bioestimulante para la germinación del grano de polen de Nicotina Tabacum L. *BioVeg 2017. Libro de resúmenes, 25- 26.*

Ramírez, F., & Davenport, T. L. (2013). Apple pollination: a review. *Scientia Horticulturae*, *162*, 188-203.

Reddy, K. R., & Kakani, V. G. (2007). Screening Capsicum species of different origins for high temperature tolerance by in vitro pollen germination and pollen tube length. *Scientia horticulturae*, *112*(2), 130-135.

Robbie, F. A., & Atkinson, C. J. (1994). Wood and tree age as factors influencing the ability of apple flowers to set fruit. *Journal of Horticultural Science, 69(4), 609-623.*

Saito, H. (1993). Purification of active substances of Aloe arborescens Miller and their biological and pharmacological activity. *Phytotherapy Research, 7(7), S14-S19.*

Sánchez-Estrada, A., & Cuevas, J. (2020). Profitability of Artificial Pollination in ‘Manzanillo’Olive Orchards. *Agronomy, 10(5), 652.*

Santos, E., & Invernizzi, C. (2018). Comportamiento de pecoreo de las abejas melíferas en manzanos de las variedades Cripps Pink y Red Chief. *Agrociencia Uruguay*, *22*(2), 1-10.

Santos, E., (2019). Fortalecimiento de las capacidades para la gestión ambientalmente adecuada de plaguicidas incluyendo cops. *https://www.gub.uy/ministerio-ambiente*

Sanzol, J., & Herrero, M. (2001). The “effective pollination period” in fruit trees. *Scientia Horticulturae*, *90*(1-2), 1-17.

Taylor, L. P., & Hepler, P. K. (1997). Pollen germination and tube growth. *Annual review of plant biology,* 48(1), 461-491.

The Plant List (2013). Version 1.1. Published on the Internet; http://www.theplantlist.org/ (accessed 1st January). (consultado: 24-02.2021)

Williams, R. R., & Legge, A. P. (1979). Pollen application by mechanical dusting in English apple orchards. *Journal of Horticultural Science, 54(1), 67-74.*

Williams, R. R., & Wilson, D. (1970). Toward regulated cropping. A report of recent fruit-set experiments in British orchards. *Toward regulated cropping. A report of recent fruit-set experiments in British orchards.*