



Sociedad  
Española  
de **Ciencias**  
**Hortícolas**

**90**

**Septiembre 2022**

# **ACTA DE HORTICULTURA**

**Comunicaciones Técnicas  
Sociedad Española de  
Ciencias Hortícolas**

**X Congreso Nacional de  
Mejora Genética de Plantas**

**Editores:  
Rosa Ana Malvar  
Pedro Fiz Rocha**

**Pontevedra, 19-22 de septiembre 2022**

## 11. Conservación del polen de cebolla para la producción de semilla híbrida

O. Fayos<sup>1</sup>, B. Echávarri<sup>2</sup>, M.P. Vallés<sup>2</sup>, C. Mallor<sup>1</sup>, A. Garcés-Claver<sup>1\*</sup>, A.M. Castillo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Instituto Agroalimentario de Aragón—IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Avda. Montañana 930, 50059, Zaragoza.

<sup>2</sup> Estación Experimental de Aula Dei-CSIC, Avda. Montañana 1005, 50059, Zaragoza,

**Palabras clave:** *Allium cepa*, polen, medio de germinación, temperatura de preservación, deshidratación, viabilidad, cruzamientos

### RESUMEN

La asincronía en la floración de diferentes cultivares de cebolla (*Allium cepa* L.) dificulta la obtención de semilla híbrida. Este problema podría evitarse mediante una adecuada conservación del polen, para ser utilizado dentro de la misma campaña, o incluso, durante varios años. El método generalizado para la conservación del polen a largo plazo es la criopreservación. Sin embargo, este es un sistema muy costoso que requiere equipamiento especial y personal cualificado. El objetivo del presente trabajo ha sido el establecimiento de un protocolo simple, económico y al alcance de cualquier laboratorio, para la conservación del polen de cebolla a medio plazo. En primer lugar, se establecieron las condiciones óptimas de germinación *in vitro* del polen. Posteriormente se estudió el efecto de la humedad y la temperatura de conservación (4, -20 y -80 °C) en la preservación de la viabilidad del polen hasta los 2 años mediante pruebas de germinación y tinción con FDA. Los resultados muestran que cuanto menor es la temperatura de conservación, mayor es el porcentaje de polen viable. Además, independientemente de la temperatura de conservación, el polen deshidratado mantuvo la viabilidad durante más tiempo que el polen sin deshidratar. La viabilidad y germinación del polen deshidratado y almacenado a -20 °C se redujo considerablemente después de dos meses y, por lo tanto, puede utilizarse para la polinización dentro de la misma época de floración. Sin embargo, el polen almacenado a -80 °C mantuvo similares porcentajes de viabilidad (29%) y germinación (32%) a los dos meses y a los dos años de almacenamiento. Por último, se evaluó la capacidad de fertilización del polen almacenado mediante cruzamientos con plantas androestériles, obteniéndose una ratio de 47,9 semillas/100 flores con el polen deshidratado almacenado a -80 °C durante dos años.

### INTRODUCCIÓN

La cebolla (*Allium cepa* L.) es una especie alógama, bienal y presenta asincronía en la floración de diferentes cultivares, características que dificultan el desarrollo de programas de mejora en este cultivo. La obtención de híbridos de cebolla tiene gran interés dada su mayor producción y uniformidad genética. La adecuada preservación de la viabilidad del polen, que podría ser utilizado en distintas campañas, o incluso durante varios años, es un recurso interesante para solucionar dichos obstáculos. El objetivo del presente trabajo ha sido el establecimiento de un protocolo simple, económico y al alcance de cualquier laboratorio, para la conservación del polen de cebolla a medio plazo (Fayos et al., 2022).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios de conservación de polen de cebolla se realizaron con la variedad tradicional ‘Cebolla Dulce de Fuentes’, de alto valor comercial debido a su baja pungencia (Mallor y Sales, 2012). En 2018 y 2019 se recolectó el polen de umbelas con el 80% de las flores abiertas y se dividió en dos porciones, una se almacenó directamente (polen fresco) y otra se deshidrató en un desecador con gel de sílice a 25 °C durante 16 h (polen deshidratado). En primer lugar, se optimizó la composición del medio de germinación *in vitro* del polen: soporte del medio de germinación (líquido o solidificado con agarosa) y la concentración de calcio (0, 75 y 150 mg.l<sup>-1</sup>), así como la temperatura de incubación (25, 30 y 35 °C). Una vez establecidas las condiciones óptimas de germinación del polen, se estudió el efecto de la temperatura (4 °C, -20°C y -80 °C) y la humedad, evaluando la viabilidad mediante tinción con diacetato de fluoresceína (FDA) (Widholm, 1972), y la capacidad de germinación a los 0, 15 y 30 días, 2 y 6 meses y 1-2 años de conservación. Por último, durante el verano de 2019 y 2020, se evaluó la capacidad de fertilización del polen almacenado durante 1 o 2 años a -20 y -80 °C mediante cruzamientos con la línea androestéril ‘BGHZ4552’ como madre. Los cruzamientos y autofecundaciones con el polen fresco de la línea ‘BGHZ4553’ (su línea restauradora) fueron utilizados como control. Todo el material vegetal utilizado en este trabajo fue cedido por el Banco de Germoplasma Hortícola de Zaragoza (BGHZ, CITA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Optimización de las condiciones de germinación *in vitro* del polen de cebolla

Los porcentajes de germinación del polen fresco fueron similares en medio líquido y en medio solidificado con agarosa, tanto con polen inoculado en la superficie como en el interior del medio. (Fig. 1A). Finalmente, se eligió el medio líquido porque facilitó el conteo de los granos de polen germinados. La incorporación de 75 y 150 mg.l<sup>-1</sup> de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ·4H<sub>2</sub>O no favoreció e inhibió la germinación del polen, respectivamente, por lo que se decidió no introducir iones de Ca<sup>2+</sup> en el medio (Fig. 1B). Los porcentajes de germinación de polen a 30 y 35 °C fueron similares y, a su vez, superiores a los obtenidos a 25 °C (Fig. 1C), por lo que se estableció 32 °C como temperatura óptima para la germinación.

### Conservación del polen de cebolla

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la germinación del polen de cebolla, se procedió a la evaluación de la viabilidad del polen conservado mediante ensayos de germinación y tinciones con FDA. Los estudios de conservación de polen mostraron que los mayores porcentajes de viabilidad y germinación se obtuvieron con las temperaturas de conservación más bajas (Fig. 2). Por otro lado, la preservación de la viabilidad y de la germinación del polen deshidratado fue mayor que la del polen fresco, independientemente de la temperatura de conservación. El polen deshidratado y conservado a -20 °C durante dos meses presentaba un 28% de viabilidad y 35% de germinación, pero estos valores disminuyeron drásticamente al aumentar el tiempo de conservación. Por el contrario, el polen deshidratado conservado a -80 °C mantuvo porcentajes similares de viabilidad (29%) y de germinación (32%) a los dos meses y a los dos años de almacenamiento. Además, se evaluó la preservación de la viabilidad del polen una vez descongelado. Para ello, se utilizó el polen que previamente se había conservado a -80 °C, observándose una reducción considerable de su viabilidad a partir del cuarto día de mantenimiento a 4 °C.

### Capacidad de fertilización del polen conservado

Se estimó la capacidad de fertilización del polen utilizado en los cruzamientos mediante la ratio de nº semillas/100 flores (cada flor de cebolla puede formar hasta 6 semillas). La semilla obtenida con polen congelado durante un año a -80 °C en los

cruzamientos del 2019 (4,8 semillas/100 flores) fue inferior a la obtenida en los cruzamientos de 2020 (41,86), probablemente debido a la menor calidad de partida del pool de polen utilizado. En los cruzamientos realizados en 2020, se obtuvieron 14.8 semillas/100 flores con polen conservado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante dos años y 47.9 semillas/100 flores con polen conservado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante dos años (Tabla 1). Esta última cifra representa un 43% de la semilla total obtenida en cruzamientos con polen fresco ese mismo año (110 semillas/100 flores).

Todos estos resultados indican que el polen deshidratado conservado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  puede utilizarse con garantías para la obtención de híbridos dentro de la misma época de floración (2 meses), y el polen deshidratado conservado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante al menos dos años (Fayos et al., 2022). Esta es la primera vez que se describe la obtención de semilla con polen conservado durante 2 años a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en cebolla.

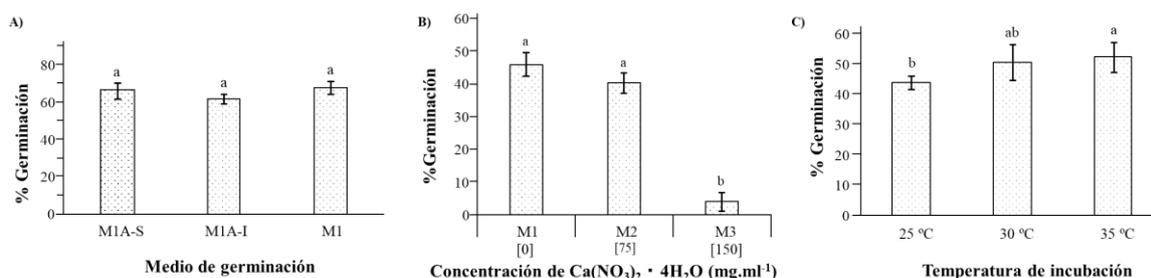
## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad INIA-FEDER (RTA2015-00042-C02-01) y el Gobierno de Aragón (Grupos A11-20R y A08-20R). OF recibió una beca FPI (INIA-FEDER)

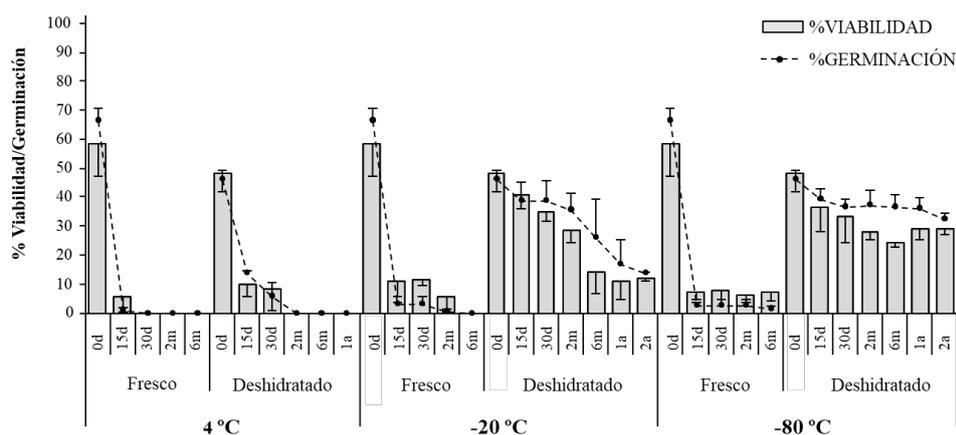
## REFERENCIAS

- Fayos, O., Echávarri B., Vallés, M.P., Mallor C., Garcés-Claver, A., Castillo A.M. 2022. A simple and efficient method for onion pollen preservation: Germination, dehydration, storage conditions, and seed production. *Scientia Hort.* 305: 111358.
- Mallor, C., Sales, E. 2012. Yield and traits of bulb quality in the Spanish sweet onion cultivar ‘Fuentes de Ebro’ after selection for low pungency. *Sci. Hortic.* 140: 60–65.
- Widholm, J.M., 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol.* 47 (4), 189–194.

## TABLAS Y FIGURAS



**Figura 1.** Optimización de la germinación de polen de cebolla cv. Cebolla Dulce de Fuentes: A) Germinación de polen fresco en medio líquido (M1), en medio solidificado con agarosa (M1A) y depositado en la superficie (M1A-S) y en el interior del medio (M1A-I); B) Germinación en medio M1 con 0, 75 y 150  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (M1, M2 y M3, respectivamente); C) Germinación a 25  $^{\circ}\text{C}$ , 30  $^{\circ}\text{C}$  y 35  $^{\circ}\text{C}$  en medio M1.



**Figura 2.** Porcentajes de viabilidad y germinación de granos de polen frescos (no deshidratados) y deshidratados del cv. Cebolla Dulce de Fuentes en el día de recolección (0 días), y después de su conservación a 4 °C, -20 °C y -80 °C durante 15 y 30 días (d); 2 y 6 meses (m); y 1 y 2 años (a). Los datos son las medias de 4 pools de polen.

Tabla 1. Cruzamientos realizados en 2019 y 2020 con polen fresco y polen conservados a -20 y -80 °C durante uno o dos años.

Año	Receptor	Donante	Tiempo observación	T <sup>a</sup> (°C)	N° flores polinizadas	N° total semillas	N° semillas /100 flores
2019	BGHZ4552	18-Pool B	1 año	-80	124	6	4.8
2019	BGHZ4552	18-Pool B	1 año	-80	267	12	4.5
2019	BGHZ4552	18-Pool B	1 año	-80	178	42	23.6
2019	BGHZ4552	18-Pool B	1 año	-80	114	6	5.3
2019	BGHZ4552	18-Pool D	1 año	-80	361	6	1.7
2019	BGHZ4552	18-Pool D	1 año	-80	445	36	8.1
2019	BGHZ4552	BGHZ4553	Fresco	-	136	78	57.3
2019	BGHZ4552	BGHZ4553	Fresco	-	25	54	216.0
2019	BGHZ4553	BGHZ4553	Fresco	-	181	0	0.0
2019	BGHZ4553	BGHZ4553	Fresco	-	126	36	28.6
2019	BGHZ4553	BGHZ4553	Fresco	-	241	228	94.6
2019	BGHZ4553	BGHZ4553	Fresco	-	81	24	29.6
2020	BGHZ4552	19-Pools E+C	1 año	-80	406	95	23.4
2020	BGHZ4552	19-Pools D+B	1 año	-80	473	66	13.9
2020	BGHZ4552	19-Pools F+C	1 año	-80	512	452	88.3
2020	BGHZ4552	18-Pools B+D	2 años	-20	445	66	14.8
2020	BGHZ4552	18-Pool C	2 años	-80	527	332	63.0
2020	BGHZ4552	18-Pool C	2 años	-80	410	135	32.9
2020	BGHZ4552	BGHZ4553	Fresco	-	367	960	261.6
2020	BGHZ4552	BGHZ4553	Fresco	-	175	90	51.4
2020	BGHZ4553	BGHZ4553	Fresco	-	137	27	19.7