

## Estudiando el desarrollo del grano de polen y la formación del tubo polínico *in vitro* en anteras de tabaco (*Nicotiana Tabacum*) para la enseñanza práctica de la Biotecnología Vegetal

Asma Boujenna - Universidad AbdelMalek Essâadi (Tetuan, Marruecos)

 0000-0002-0023-7759

Vanessa Martos Núñez - Universidad de Granada

 0000-0001-6442-7968

Belén García del Moral Garrido - Universidad de Almería

 0000-0001-9803-9939

Luis F. García del Moral - Universidad de Granada

 0000-0002-0533-2915

Recepción: 22.03.2022 | Aceptado: 28.03.2022

Correspondencia a través de **ORCID**: Luis F. García del Moral

 **0000-0002-0533-2915**

Boujenna A, Martos Núñez, V, García del Moral, B y García del Moral, LF (2022). Estudiando el desarrollo del grano de polen y la formación del tubo polínico en tabaco (*Nicotiana Tabacum*) para la enseñanza práctica de Biotecnología Vegetal. *REIDOCREA*, 11(18), 116-220.

Financiación: Grupo de investigación AGR123 de la Junta de Andalucía y proyecto "SUSTAINABLE" funded by the European Union's Horizon 2020 Project H2020-MSCA-RISE-2020, Grant Agreement 101007702.

Área o categoría del conocimiento: Fisiología Vegetal

**Resumen:** El estudio del desarrollo y de la germinación *in vitro* de los granos de polen tiene un gran interés, tanto desde el punto de vista de la enseñanza de la Biotecnología Vegetal, como por sus aplicaciones a la mejora de las plantas. El objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento práctico, por parte de los alumnos de un curso de Biotecnología Vegetal, del desarrollo y germinación de los granos de polen y sus aplicaciones a la mejora genética de los cultivos. Estas aplicaciones incluyen la obtención de individuos haploides, el estudio de la esterilidad citoplasmática masculina y un mayor control sobre la floración y fructificación de los cultivos.

**Palabras clave:** Micróspora

***Studying the development of the pollen grain and the formation of the pollen tube in tobacco (*Nicotiana tabacum*) for the practical teaching of Plant Biotechnology***

**Abstract:** The study of *in vitro* development and germination of pollen grains is of great interest both from the point of view of teaching and for its applications to plant improvement. The objective of this work is to contribute to the practical knowledge by the students of a course of Plant Biotechnology of the development and germination of pollen grains and their applications to the genetic improvement of crops. These applications include obtaining haploid individuals, the study of male cytoplasmic sterility and greater control over the flowering and fruiting of crops.

**Keywords:** Microspore

### Introducción

En las Angiospermas, la producción de gametos masculinos ocurre en las anteras con la producción de polen a partir de una célula madre de la microspora, la cual se divide por meiosis para dar cuatro células haploides o microsporas. A su vez, cada microspora se divide por mitosis para dar dos células con dos núcleos haploides denominadas vegetativa y generativa. Finalmente, la célula generativa vuelve a dividirse por mitosis, de forma que el grano de polen maduro está formado por dos células *generativas* y una *vegetativa*, ambas con funciones muy diferentes durante la fecundación. La célula vegetativa tiene una función biosintética muy importante, siendo la encargada de la síntesis de la maquinaria necesaria para la formación del tubo polínico, que conduce a las células generativas a través del estilo hasta el saco embrionario para la fecundación (Seguí Simarro, 2010; Bahadur et al., 2015; Abdin y Kamaluddin, 2017).

Cuando un grano de polen cae sobre un estigma receptivo, comienza la lectura del ARN almacenado en su citoplasma, la síntesis de proteínas y la movilización de una serie de

moléculas bioactivas que dirigen la rápida germinación y el crecimiento de un tubo polínico que penetra y se alarga dentro del estilo de la flor (Cresti y Tiezzi, 1990; Taylor y Hepler, 1997). Este crecimiento es el más rápido de cualquier célula vegetal conocida y está restringido exclusivamente al extremo del tubo (Crowe et al., 1995). Una vez que alcanza el saco embrionario, el tubo polínico finalmente deposita las dos células germinativas, que se fusionan, una con la ovocélula para formar el cigoto y la otra con los dos núcleos polares del centro del saco embrionario para formar el endospermo, lo que se conoce como doble fecundación de las angiospermas (Seguí Simarro, 2010; García del Moral, 2021). Comprender adecuadamente este proceso de desarrollo no solo es importante para descifrar el mecanismo básico de la reproducción sexual en las plantas con flores, sino que también tiene valor para la manipulación potencial de la producción de plantas de cultivo ya que para realizar con éxito programas de mejora genética vegetal, es imprescindible el conocimiento exhaustivo de la biología de la reproducción de la planta (Altman y Hasegawa, 2012; Bahadur et al., 2015; Abdin y Kamaluddin, 2017). Los aspectos más relevantes se relacionan con la ingeniería de la androesterilidad citoplasmática, la superación de las barreras de incompatibilidad reproductiva, con la obtención de mayores rendimientos y con mejor calidad por disminución del número de frutos abortados, ya que muchos cultivos producen menos frutos maduros que flores y los frutos, a su vez, generan menos semillas que el número de óvulos disponibles para la fecundación.

En numerosas ocasiones el polen no puede germinar sobre el estigma de una flor, aunque éste se halle receptivo, debido a barreras genéticas o fisiológicas. Algunas de estas barreras de *prefertilización* o *precigóticas* se deben a la incapacidad del polen de germinar en estigmas extraños; a la incapacidad del tubo polínico para alcanzar el óvulo debido a una lenta velocidad de crecimiento; a una excesiva longitud del estilo, por lo que el ovario aborta antes de que el tubo polínico alcance la base del estilo; o a que el tubo polínico se desorganiza en el estilo antes de llegar al micropilo (Cresti y Tiezzi, 1990; Taylor y Hepler, 1997; Seguí Simarro, 2010).

### **Objetivo**

En este artículo se estudia la identificación de los estadios de desarrollo del grano de polen y la inducción de tubo polínico *in vitro*, como actividad de prácticas experimentales de un curso de Biotecnología Vegetal y su importancia práctica para la mejora genética de los cultivos.

### **Método**

**a) Observación de microsporas y granos de polen** (Martos y Garcia del Moral, 2016): Tomar flores de *Nicotiana* en diferentes estadios de desarrollo, desde minúsculos botones florales hasta la aparición de los pétalos aún cerrados sobre los sépalos. Extraer las anteras (no es necesario trabajar en condiciones estériles) y situarlas en dos o tres gotas de carmín acético al 2% sobre un portaobjetos de vidrio. Poner un cubreobjetos y golpear suavemente con la base de un punzón, hasta obtener la disgregación de las anteras y la liberación de las microsporas de los granos de polen (Fig. 1). Observar al microscopio e identificar las distintas fases de desarrollo de la microspora de acuerdo con la Figura 1.

**b) Germinación y observación del tubo polínico** (Martos y Garcia del Moral, 2016): Normalmente el polen maduro no germina si no está situado sobre los estigmas de la flor de la misma especie y recibe el estímulo adecuado. No obstante, es posible hacerlo germinar *in vitro* en soluciones ricas en boro y calcio (Brewbaker y Kwack, 1963; Burke et al., 2004; Bhojwani y Dantu, 2013). Una vez producido el tubo polínico resulta relativamente fácil, mediante micromanipulación, aislar núcleos generativos haploides para hibridación somática o fecundación *in vitro*. El medio de germinación que se usará en esta

práctica es el medio GK, apropiado para polen de *Nicotiana* y cuya composición se presenta en la Tabla 1. Situar 5 ml de este medio en una placa de Petri de 5 cm de diámetro y desmenuzar sobre ella anteras maduras de *Nicotiana*, al objeto de que caiga suficiente polen sobre el medio de germinación. Incubar a 25 °C de temperatura durante dos horas.

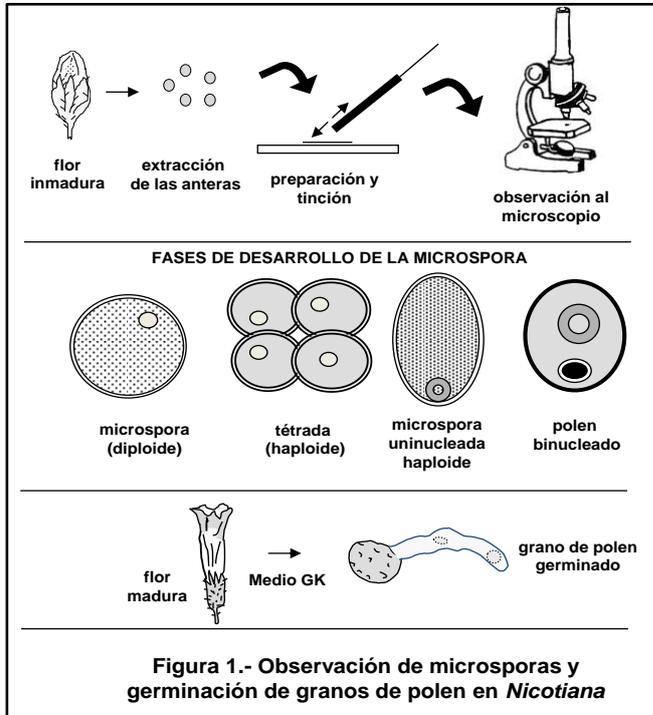
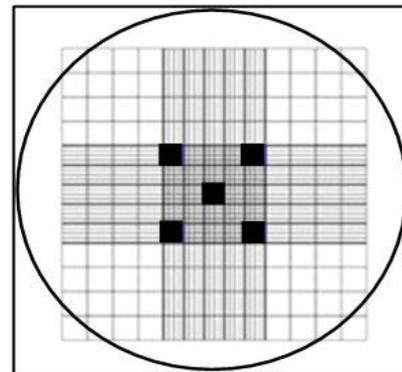


Tabla 1. Medio GK para germinación in vitro de granos de polen

compuesto	concentración
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	200 mg·L <sup>-1</sup>
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	300 mg·L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	200 mg·L <sup>-1</sup>
KNO <sub>3</sub>	100 mg·L <sup>-1</sup>
Sacarosa	10 %
pH ajustado	7,6

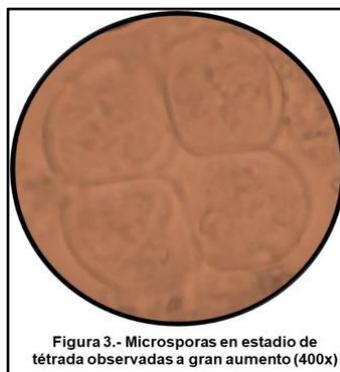


**Fig. 2.-** Retículo central de una placa Neubauer. En negro los cuadrados para recuento del polen germinado

## Resultados

### Observación e identificación de micrósporas

Si la elección de las flores inmaduras de *Nicotiana* se ha realizado adecuadamente, en el microscopio se podrán observar los sucesivos estadios de desarrollo, desde células madre de la microspora en metafase con las cromátidas en la placa ecuatorial hasta el grano de polen maduro. En la Figura 1 se han representado esquemáticamente los estadios de microspora diploide (previo al comienzo de la meiosis), tétrada haploide (antes de la separación de las microsporas haploides), microspora uninucleada y grano de polen binucleado (maduro). En la Figura 3 se puede observar una fotografía original de una tétrada de polen de tabaco.



### **Cálculo del porcentaje de germinación y longitud del tubo polínico**

Añadir dos gotas de Tween (detergente no iónico) a la suspensión de incubación, al objeto de evitar la agrupación de los granos de polen. Con una pipeta Pasteur poner dos gotas de esta suspensión en una cámara de recuento Neubauer, que consiste en un portaobjetos de cristal con un retículo de líneas perpendiculares entre sí, que al ser observadas al microscopio forman cuadros de diferentes tamaños que permiten contar el número de granos de polen. Colocar un cubreobjetos, observar al microscopio a media resolución y contar el número de granos de polen germinados y no germinados en cinco cuadrados de la retícula central del portaobjetos como muestra la Figura 2. Calcular el porcentaje de germinación como:

$$\% \text{ germinación} = \frac{n^{\circ} \text{ granos germinados}}{n^{\circ} \text{ total de granos}} \times 100$$

Dado que cada uno de los 16 cuadrados observados tiene 0,25 mm de lado, medir aproximadamente la longitud del tubo polínico de 4 granos de polen por cada cuadrado de los 5 observados. Calcular la longitud media de los tubos polínicos de los 20 granos de polen. En la Figura 4 se pueden observar granos de polen germinados *in vitro*.



Figura 4.- Granos de polen germinados observados a bajo aumento (40x)

### **Discusión**

Una correcta identificación de los estadios de desarrollo del grano de polen, así como la inducción de la germinación del grano de polen en condiciones experimentales (es decir, sin el estímulo del estigma), constituyen la base para la obtención de individuos haploides *in vitro* mediante cultivo de anteras (Bhojwani y Dantu, 2013). El estadio óptimo para este cultivo de anteras es el de microspora uninucleada (Fig. 1), antes de que se inicie la primera de las dos divisiones mitóticas, ya que con un solo núcleo se evita la posible fusión de núcleos que originaría un individuo diploide en lugar de uno haploide. Una vez obtenido un individuo haploide (con la mitad de los cromosomas del número básico de la especie), puede duplicarse su número de cromosomas mediante aplicación de colchicina y obtener un homocigótico en una sola generación, proceso que se conoce como diploidización de haploides, con enormes aplicaciones en la mejora genética vegetal (Abdin y Kamaluddin, 2017; Altman y Hasegawa, 2012; Bhojwani y Dantu, 2013;).

El porcentaje de germinación es una medida de la viabilidad del polen, es decir, de la capacidad de fertilización que posee una determinada especie y su conocimiento resulta de gran relevancia para su posterior almacenamiento *in vitro* (Shivanna et al, 1991; Burke et al., 2004). Entre las aplicaciones del almacenamiento de polen podemos

destacar que permite superar las barreras reproductivas entre individuos donantes y receptores del polen que tengan diferente época de floración; puede eliminar la necesidad de cultivar continuamente a los individuos donantes de polen (parentales masculinos) en programas de mejora genética; posibilita polinizaciones suplementarias en casos de poca producción de polen; ayuda a preservar los recursos fitogenéticos; facilita el intercambio internacional de germoplasma; garantiza la disponibilidad de polen durante todo el año y no sólo en la época de floración; y facilita los estudios sobre aspectos de la biología del polen y de la alergia al polen. (Seguí Simarro, 2010; Altman y Hasegawa, 2012; García del Moral, 2021)

Además, el estudio y germinación de granos de polen *in vitro* tiene gran interés para el control artificial de la reproducción vegetal, particularmente para la investigación de la androesterilidad citoplasmática, para la superación de las barreras de incompatibilidad interespecífica y para obtener mayores rendimientos y mejor calidad de algunos cultivos por disminución del número de frutos abortados (Altman y Hasegawa, 2012).

## Conclusión

El estudio del desarrollo y de la germinación *in vitro* de los granos de polen tiene un gran interés tanto desde el punto de vista de la enseñanza de la Biotecnología Vegetal como por sus aplicaciones prácticas en la mejora genética de las plantas.

## Referencias

- Abdin M, Kamaluddin UK, & ALI A (2017). Plant Biotechnology: Principles and Applications (pp 410). Springer.
- Altman A, Hasegawa PM (2012). Plant Biotechnology and Agriculture (pp 424). Isevier Inc: Netherlands.
- Bahadur B, Rajam MV, Sahijram L, & Krishnamurthy KV (2015). Plant Biology and Biotechnology, Volume I: Plant Diversity, Organization, Function and Improvement (pp 8827). Springer: India.
- Bhojwani SS, Dantu PK (2013). Plant Tissue Culture: An Introductory Text (pp 318). Springer: India.
- Brewbaker JL, & Kwack BH (1963). The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Im J Bot*, 50, 859-865.
- Burke JJ, Velten J, & Oliver MJ (2004). Vitro Analysis of Cotton Pollen Germination. *Agron*, 96, 359-368.
- Cresti M, & Tiezzi A (1990.) Germination and pollen-tube Formation. In S Blackmore, & RB Knox, *Microspores: Evolution and Ontogeny* (pp. 239–63). New York: Academic.
- Crowe J, Derksen J, Rutten T, Van Amstel T, deWin A, Doris F, & Steer M (1995). Regulation of pollen tube growth. *Acta Bot. Neerl.* 44, 93–119.
- García del Moral Garrido LF (2021). Biotecnología Vegetal. Fundamentos y aplicaciones (pp 400). Editorial Universidad de Granada: Granada.
- Martos V y García del Moral LF (2016). Manual de Prácticas de Biotecnología Vegetal (pp 86), Universidad de Granada.
- Seguí Simarro JM (2010). Biología y Biotecnología Reproductiva de las Plantas (pp 448). Universidad Politécnica de Valencia.
- Shivanna KR, Linskens HR, & Cresti M (1991). Pollen viability and pollen vigor. *Theor App Genet* 81, 38–42.
- Taylor LP, & Hepler PK (1997). Pollen germination and tube growth. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48, 461–491.