

Proc. 9. 14/79 T
12
122

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL
FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS DOCTORAL

ALTERNANCIA DE LAS RUTAS GAMETOFITICA Y ESPOROFITICA
EN POLEN DE *Nicotiana tabacum*: ESTUDIO
CELULAR, FISIOLOGICO Y MOLECULAR

UNIVERSIDAD DE GRANADA
16 MAR. 1993
COMISION DE DOCTORADO

DOLORES GARRIDO GARRIDO
GRANADA, 1993

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 619663492
Nº Copia 21212531

Memoria presentada por la Licenciada
Dña. Dolores Garrido Garrido
para aspirar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

GRANADA, MARZO de 1993

Dolores Garrido

Fdo. Dolores Garrido Garrido

VO. BO

EL DIRECTOR DEL TRABAJO



Fdo. Angel Matilla Carro
Catedrático de Fisiología Vegetal
Facultad de Ciencias
Universidad de Granada

INDICE

INTRODUCCION

Generalidades.....	2
Anteras y desarrollo del microsporangio.....	3
Formación del grano de polen	5
Microsporogénesis	5
Microgametogénesis.....	7
Maduración del grano de polen	9
Germinación	10
Pared del grano de polen	12
Control esporofítico del desarrollo de polen:	
el tapetum	13
Factores de crecimiento durante el desarrollo	
del polen	16
Cultivos.....	17
Antecedentes de cultivos de polen	18
Cultivos de polen y anteras para la	
formación de haploides.....	19
Ventajas del uso de haploides en agricultura ..	21
Adquisición de la capacidad embriogénica	22
Tipos de cultivos de polen.....	24
A) Cultivos de polen con precultivo	
de anteras.....	24
B) Cultivo de polen tras un pretrata-	
miento de frío de los capullos	
florales.....	25
C) Cultivos de polen basados en el	
dimorfismo del mismo.....	25
D) Cultivos de polen sometido a un	
choque térmico.....	26
E) Cultivos de polen sometidos a un	
tratamiento de ayuno.....	26

Papel de la pared de la antera en la embriogénesis del polen.....	27
Reguladores de crecimiento y otras sustancias .	29

<u>OBJETIVOS</u>	31
------------------------	----

MATERIAL Y METODOS

1. Material vegetal utilizado	36
2. Cultivos de polen.....	36
a) Determinación de los estadios del grano de polen.....	36
b) Preparación de los medios de cultivo...	36
c) Cultivos embriogénicos de polen aislado de <i>Nicotiana tabacum</i>	38
3. Análisis de proteínas.....	39
a) Preparación de extractos de proteínas de polen.....	39
b) Medida de la concentración de proteínas.	40
c) Electroforesis SDS/PAGE.....	40
d) Electroforesis bidimensional.....	42
e) Tratamiento de los geles.....	44
- Autorradiografía.....	44
- Fluorografía.....	44
- Tinción con azul de Coomassie....	45
- Tinción de plata.....	45
4. Ensayo de Quinasas.....	45
5. Medida de la síntesis de ARN y proteínas....	47
a) Síntesis de ARN.....	47
b) Síntesis de proteínas.....	47
6. Extracción de ARN de polen.....	48
7. Traducción de proteínas in vitro	49
a) Preparación del lisado de reticulocitos	

de conejo.....	49
b) Condiciones para traducción endógena...	50
c) Tratamiento del lisado con nucleasa S7.	51
8. Búsqueda de un cDNA homólogo a un clon	
de heat shock en alfalfa	51
a) Titulado de la biblioteca	51
b) Screening	52
c) Secuenciación	55
9. Cuantificación de poliaminas endógenas	55
a) Extracción	55
b) Determinación de las poliaminas	
dansiladas	57
c) Patrones internos empleados	57
d) Características del cromatógrafo	57
e) Cuantificación de las muestras	57
f) Análisis de las muestras	58
10. Marcaje con ³ H-timidina y	
microautorradiografía	58
11. Técnicas de microscopía electrónica	59
a) Procesamiento de las muestras	
para MO/MET.....	59
b) Fijación e inclusión en Lowicryl K4M .	62
c) Hibridación in situ	64
d) Citoquímica sobre cortes ultrafinos	
para MET ..	67

RESULTADOS

1. Cultivos de polen.....	70
2. Estudio ultraestructural	
(Morfológico y citoquímico)	75
3. Ciclo celular	84
4. Aspectos fisiológicos y bioquímicos de la	
inducción de la embriogénesis	88
4.1 Análisis de proteínas	94

4.2 Estudios con inhibidores	99
5. Análisis bidimensional de los ARNm	
sintetizados in vitro	105
5.1 Eliminación del ARNm endógeno y	
traducción con mensajero exógeno ...	105
6. Ensayo de quinasas.....	109
7. Poliaminas durante embriogénesis	111
<u>DISCUSION</u>	118
<u>CONCLUSIONES</u>	129
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	131

ABREVIATURAS

Aa : Aminoácidos
ABS : Albúmina de suero bovino
ARN : Acido ribonucleico
ARNm : Acido ribonucleico mensajero
ARNt : Acido ribonucleico de transferencia
ATC : Acido tricloroacético
ATP : Adenosín trifosfato
Ci : Curios
cpm : cuentas por minuto
DTT : Di-tio-treitol
EDTA : Acido etilen-diamino-tetra-acético
EGTA : Etilenglicol-bis (B-amino-etil-éter)NN'tetraacético
g : gramos
GA : glutaraldehido
h : horas
HEPES : Acido N-2-hidroxietilpiperazina-N'2-etanosulfónico
KDa : Kilodalton
Kg : Kilogramos
l : litros
mA : miliamperios
mCi : milicurios
 μ Ci : microcurios
mg : miligramos
 μ g : microgramos
min : minutos
ml : mililitros
 μ l : microlitros
mM : milimolar
 μ M : micromolar
MET : microscopio electrónico de transmisión
MO : microscopio óptico

ng : nanogramos
NP-40 : Nonidet-P-40
PA: poliaminas
PF : paraformaldehido
pI : Punto isoeléctrico
PMSF : Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PSA : Persulfato amónico
p/v : peso/volumen
Put : putrescina
rpm : revoluciones por minuto
SDS : Dodecil sulfato sódico
Spd : espermidina
Spm : espermina
TEMED : N,N,N',N'-tetrametilendiamina
v/v : volumen/volumen
V : voltios

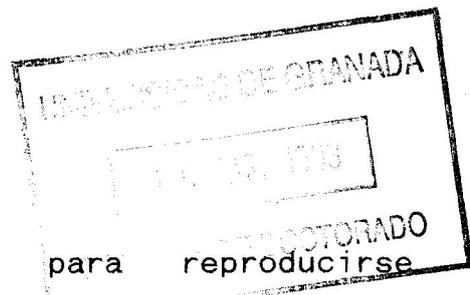
INTRODUCCION

INTRODUCCION

Las plantas superiores utilizan para reproducirse un microorganismo multicelular: el gametofito masculino o grano de polen, que, al fusionarse al gametofito femenino u óvulo dan lugar al cigoto, de naturaleza diploide y que servirá para regenerar el esporofito.

En las angiospermas tiene lugar una alternancia de generaciones, característica de la reproducción sexual en plantas. Una generación diploide productora de esporas (esporofítica) alterna con una haploide productora de gametos (gametofítica). Al contrario de lo que ocurre en algunas plantas más primitivas desde el punto de vista evolutivo, en los que el tejido de soporte es el gametofítico, los gametofitos masculino y femenino de las angiospermas se encuentran reducidos a estructuras microscópicas que dependen de los tejidos del esporofito para desarrollarse. En la evolución de las angiospermas ha imperado una reducción progresiva en tamaño y función de la generación gametofítica, atravesando estadios evolutivos comparables a los existentes en pteridofitas (gametofito más reducido que en briofitas y autótrofo; se dan algunos casos de heterosporia) y gimnospermas (gametofito heterótrofo, heterosporia y distintos grados de reducción y simplificación de los gametofitos) (Heslop-Harrison, 1972). El esporofito se ha convertido en la generación más elaborada desde el punto de vista morfológico, anatómico y bioquímico, viviendo el gametofito como endofito de éste. Los procesos de gametogénesis y embriogénesis tienen lugar en los tejidos del esporofito, y de esta manera se encuentran protegidos de influencias externas.

El que el esporofito haya ganado en dominancia sobre el gametofito a lo largo del proceso evolutivo indica que la diploidía posee ventajas selectivas. A partir de un cigoto pueden



ocurrir gran número de divisiones meióticas, y de esta manera pueden aparecer un gran número de recombinaciones genéticas en una sola fertilización.

La flor contiene estructuras especializadas, el androceo y el gineceo, en las cuales se forman, mediante meiosis, los gametofitos masculino y femenino respectivamente. La función de los gametofitos masculinos y femeninos es la producción de células espermáticas y células femeninas respectivamente, que deberán unirse tras la fecundación. El grano de polen es el gametofito masculino y el saco embrionario el femenino (Mascarenhas, 1989).

A pesar de que el grano de polen es un organismo bi, o a lo sumo, tricelular, experimentos genéticos o de mutagénesis revelan que las plantas superiores realizan una considerable inversión de material genético para la producción del gametofito (Bedinger, 1992). Estudios moleculares de genes específicos de anteras o polen apoyan la idea de que la construcción de un gametofito masculino funcional requiere un abundante grupo de estos genes (Willing y Mascarenhas, 1984; McCormick, 1991; Kamalay y Goldberg, 1980). Esto es explicable si se tienen en cuenta las estructuras tan especializadas que existen en el grano de polen, el rápido crecimiento del tubo polínico, así como los sistemas de comunicación célula-célula que tienen lugar durante la interacción polen-pistilo.

ANTERAS Y DESARROLLO DEL MICROSPORANGIO

La formación del gametofito masculino o microsporogénesis tiene lugar en un órgano floral especializado: el estambre, que se compone de una antera y un filamento por la que se une ésta al eje floral. Una antera madura contiene principalmente cuatro microsporangios elongados, agrupados en pares en los dos lóbulos de la antera. La pared de una antera contiene cuatro niveles

celulares que, del exterior al interior son: epidermis, endotecio, nivel medio y tapetum (Bedinger, 1992). El lóculo de la antera incluye células esporógenas, que darán lugar a las células madres del polen. En los estadios iniciales de la organogénesis floral el lóculo de la antera se compone de células arquesporiales que por división y diferenciación darán lugar a los distintos tejidos que componen una antera madura (Giles y Prakash, 1987). En el interior de la pared de la antera existen unas capas de células que constituyen el tapetum. El tapetum puede tener un origen parietal (procedente de la pared); también en algunas especies puede proceder de la región conectiva que separa los sacos de la antera. Más raramente, el tapetum se forma a partir del nivel externo del tejido esporógeno (Giles y Prakash, 1987).

El tapetum inicialmente está compuesto por células que se tiñen intensamente, con un núcleo prominente, a menudo poliploide. En angiospermas existen dos tipos mayoritarios de tapetum. El tapetum de tipo ameboide, compuesto por células que pierden su pared, penetrando los protoplastos entre los granos de polen en desarrollo y fundiéndose entre ellos para formar un periplasmodio que rodea a los granos de polen inmaduros, llegando incluso las membranas de las células del tapetum a penetrar en la exina del polen durante los últimos estadios del desarrollo (Mascarenhas, 1975, 1988). El tapetum tipo glandular o secretor se mantiene en su posición original en la antera, pero conforme avanza el desarrollo de polen y se alcanza el grado máximo de formación del grano de polen, sus células degeneran hasta llegar a autolisarse (Mascarenhas, 1975, 1988). El tapetum glandular parece estar más generalizado ya que según la revisión de Albertini y col. (1987) 175 familias de angiospermas presentan un tapetum glandular frente a 32 que lo poseen de tipo ameboide.

El tapetum es el tejido de la antera en más íntimo contacto con los granos de polen en desarrollo; por esta razón se asume que

juega un papel nutritivo esencial en el desarrollo gametofítico, ya que todo el material nutritivo que proviene del esporofito debe o bien pasar a través del tapetum, o ser metabolizado por éste. Además, su degeneración se va a producir en el momento en el que la microspora ya se encuentra bien desarrollada.

Formación del grano de polen

Las células madres del polen (CMP) se producen por mitosis del tejido esporógeno. La división meiótica de las CMP marca el comienzo del desarrollo del gametofito o fase haploide. La gametogénesis masculina en Angiospermas está constituida por dos procesos consecutivos: la meiosis o Microsporogénesis, y la maduración de las microsporas resultantes para dar lugar a los gametos o Microgametogénesis.

Microsporogénesis

Estudios de microscopía electrónica han demostrado que antes de iniciarse la meiosis las células esporógenas se encuentran conectadas entre sí por plasmodesmos (Heslop-Harrison 1966a,b), que van desapareciendo hacia el inicio de la profase meiótica, aunque la continuidad citoplasmática entre meiocitos se mantiene mediante conexiones citoplasmáticas diferentes a los plasmodesmos, que pueden llegar a alcanzar gran tamaño (1-1.5 μ) (Whelan, 1974; Bidle, 1979; Blackmore y Barnes, 1988), y a través de los cuales pueden pasar incluso organelas como plastos y mitocondrias (Heslop-Harrison, 1966a,b; Alche, 1992). Una cuestión muy interesante concerniente al inicio de la meiosis y que aún permanece sin resolver se refiere a los mecanismos por los cuales un número tan elevado de células puede comenzar la meiosis de manera sincrónica. La mayor parte de los estudios sobre la iniciación de la meiosis se han realizado en algas unicelulares o en levaduras. En *Chlamydomonas*, un cambio en su medio ambiente (cambio de régimen luminoso y disminución de la

cantidad de nitrógeno en el medio de crecimiento) es el responsable de la transformación de la célula somática en gametos (Siersma y Chiang, 1971). En *Schizosaccharomyces pombe* el gen *pat-1* codifica una proteína inhibidora de la iniciación de la meiosis, por lo que se especula que el proceso está controlado negativamente (Iino y Yamamoto, 1985). En *Lilium speciosum* se ha aislado y caracterizado una proteína nuclear de tipo histona, ausente en el tejido esporofítico y que aparece primeramente en las CMP entre el periodo S-G2 premeiótico y continúa expresándose hasta la fase de leptotene; esta proteína vuelve a expresarse en el polen maduro (Sasaki y col., 1990). La composición de aminoácidos de esta histona difiere de la de la histona H1 de células somáticas. Sin embargo, muestra similitudes en la composición aminoacídica con la histona H1t de testículos de mamífero (Sasaki y col., 1990)

Durante la profase meiótica una gran cantidad de ARN (mensajero y ribosomal) es eliminada en el meiocito (Dickinson, 1987). Este hecho podría indicar que existiría una degradación selectiva, de manera que se eliminarían gran parte de la información codificada por el esporofito (Dickinson, 1987). A nivel citoplasmático se ha observado una dediferenciación de mitocondrias y plastidios (Dickinson y Heslop-Harrison, 1970).

Hasta el momento aún no ha podido ser localizado el punto en el cual se inicia la expresión génica gametofítica. Según parece los ribosomas usados en el desarrollo gametofítico son sintetizados por el organizador nucleolar (NOR) durante la profase meiótica, pero se desconoce aún el momento en el cual es sintetizado el primer ARNm gametofítico. Majewska-Sawka y col. (1990) sugieren que las vacuolas nucleares que aparecen durante la profase meiótica, podrían estar relacionadas con los cambios preparatorios para la transición de la fase esporofítica a la gametofítica, ya que éstas podrían actuar a modo de compartimentos en los cuales serían almacenados los productos del metabolismo nuclear, y de esta manera participar en la

eliminación de productos nucleares hacia el citoplasma. Sangwan (1986), pudo demostrar que durante la profase meiótica tenía lugar degradación de ARN en la vacuola nuclear.

El resultado de la meiosis es la formación de una tétrada de células haploides, que permanecen unidas entre sí por una pared especial de calosa (1,3 β -glucano). Una vez concluida la meiosis, la calosa comienza a sufrir un proceso de degradación que culmina con la liberación de las microsporas en el lóculo de la antera.

Microgametogénesis

Con la aparición de los primeros indicios de la pared del grano de polen (la primexina), en el estadio de tetrada avanzada, finaliza el proceso de microsporogenesis, y comienza la formación y desarrollo del grano de polen (microgametogénesis), que comprende el desarrollo de la microspora y la formación del grano de polen.

La disolución de la pared de calosa está controlado por el tejido esporofítico del tapetum, de gran importancia para el desarrollo y nutrición del grano de polen. Las células del tapetum segregan calasa (1,3 β -glucanasa) enzima que degrada la calosa (Kaul, 1988; Vicente y col., 1991). Tras ser liberadas en el lóculo, las microsporas aumentan rápidamente de volumen y experimentan un cambio de forma. Las microsporas atraviesan un largo periodo de interfase que concluye con la división asimétrica de éstas (mitosis de la microspora), que da lugar al grano de polen bicelular, con una célula vegetativa y una generativa, ambas rodeadas por la pared celular de la antigua microspora. La célula vegetativa es la de mayor tamaño, mientras que la célula generativa hereda muy poca cantidad de citoplasma y orgánulos y se engloba dentro de la célula vegetativa. La placa celular se curva alrededor del núcleo generativo y se fusiona a la pared del polen.

La mitosis en la microspora parece ser el punto en el que se inicia la vía gametofítica. La asimetría de la primera mitosis parece ser necesaria para la continuación con esta vía de desarrollo, ya que el uso de distintos tratamientos (calor, frío, colchicina) que causan una división simétrica, pueden inducir desarrollo esporofítico en la microspora, dando lugar en ocasiones a plantas haploides (Zaki y Dickinson, 1991; Giles y Prakash, 1987). Al igual que sucede en otros sistemas, una división asimétrica induce una señal de diferenciación, como es el caso de la primera división en *Fucus* (Quatrano, 1990), el desarrollo embrionario en *Caenorhabditis elegans* (Strome, 1989), o la división asimétrica que tiene lugar antes de la diferenciación de las células guarda del estoma (Cho y Wick, 1989).

Estudios sobre poblaciones de ARN y proteínas (Bedinger y Edgerton, 1990), así como de síntesis de proteínas en microsporas aisladas (Mandaron y col., 1990) indican que el mayor cambio en expresión génica tiene lugar en el paso de microspora a grano de polen. Estudios de expresión génica han revelado que la mayor parte de los genes específicos de polen se transcriben tras la primera mitosis (Stinson y col., 1987; McCormick, 1991). Utilizando diferentes clones de ADNc de polen, se ha visto que existen al menos dos grupos distintos de ARNm (desde el punto de vista de su síntesis). Un primer grupo de ARNm (correspondiente a genes tardíos, específicos de polen) que comienzan su síntesis tras la mitosis de la microspora y van aumentando su concentración hacia la maduración, lo que hace pensar que estos ARNm estarían implicados en procesos de germinación y maduración. El segundo grupo de ARNm (representado por el ARNm de actina), que comienza a acumularse tras la meiosis (genes tempranos), alcanza su máxima concentración durante la interfase tardía del polen, disminuyendo apreciablemente en el polen maduro (Stinson y col., 1987); otros ejemplos de genes expresados de acuerdo al

segundo grupo son los que codifican para la enzima ADH en maiz (Stinson y Mascarenhas, 1985) y para la β -galactosidasa en *Brassica campestris* (Singh y col., 1985).

En *Lilium* y *Tradescantia* se sintetizan grandes cantidades de ARN ribosomal durante el periodo previo a la mitosis de la microspora; tras la división se produce un fuerte descenso en la síntesis de ARNr, permaneciendo los genes ribosomales transcripcionalmente inactivos durante las últimas etapas de la maduración y germinación (Mascarenhas, 1975, 1989). La transcripción de los genes de ARN de transferencia sigue un patrón similar al anterior. A pesar de esto, durante la germinación y crecimiento del tubo polínico, algunas proteínas son sintetizadas utilizando ARNr y ARNt fabricado y acumulado durante la maduración del polen.

Tras la división, la transcripción se realiza en el núcleo de la célula vegetativa (Giles y Prakash, 1987; Mascarenhas, 1990; McCormick, 1991). En la célula generativa, por el contrario, no se ha observado transcripción.

En estadios más avanzados, la célula generativa se separa de la pared del polen y se desplaza hacia el extremo opuesto del grano de polen. En el grano bicelular joven la vacuola de la célula vegetativa procedente de la antigua microspora se va reabsorbiendo, y ya se visualiza el almacenaje de almidón.

Maduración del grano de polen

En algunas plantas, entre las que se incluyen las gramíneas, la célula generativa sufre una segunda división mitótica dentro del grano de polen, dando lugar a las dos células espermáticas (polen tricelular). Sin embargo, en la mayoría de las plantas (incluyendo tabaco), el polen es bicelular y la división de la célula generativa tiene lugar durante el crecimiento del tubo

polínico por el estilo. Previo a la dehiscencia de la antera, tiene lugar en el polen una reducción de la síntesis de proteínas y ARN (Tupy y col., 1983), al igual que un incremento en el contenido en sacarosa (Hoekstra y col., 1988). El polen maduro también contiene una elevada concentración en prolina (Stanley y Linskens, 1974). Durante la dehiscencia el grano de polen sufre una deshidratación progresiva y una disminución de su volumen.

La acumulación de ARNm procedente de los genes tardíos muestra su máximo en el polen maduro, los genes ribosomales son transcripcionalmente inactivos durante los últimos estadios de maduración y no se produce síntesis de ARNt en el polen maduro. Sin embargo, el grano de polen maduro contiene ARNm almacenados que se va a traducir durante la germinación utilizando las reservas de ribosomas y ARNt acumuladas en anteriores estadios de desarrollo (Giles y Prakash, 1987; Capkova y col., 1988; Mascarenhas, 1990). No existen experimentos que expliquen la posibilidad de un control traduccional de la expresión génica de polen, a pesar de que existen ciertas analogías de este tipo de controles en células espermáticas y oocitos, que acumulan ARNm para uso posterior.

Germinación

Tras la dehiscencia de la antera, el grano de polen maduro permanece en estado de latencia. Al entrar éste en contacto con el estigma de una planta genéticamente compatible se hidrata, recupera su actividad metabólica, y comienza la formación de un tubo polínico que atraviesa el estilo hasta alcanzar un óvulo, que se va a fusionar con una de las dos células espermáticas para dar el cigoto, mientras que la otra célula espermática se fusiona con el núcleo diploide secundario del saco embrionario, desarrollando el endospermo secundario. De esta manera se produce la llamada doble fecundación, propia de las angiospermas.

Debido al uso de inhibidores de la síntesis de ARN durante la germinación de polen (Tupy, 1966), y ante la observación de la rapidez de formación de polisomas durante este proceso (Mascarenhas y Bell, 1969; Linskens y col., 1970; Tupy, 1977), se especuló sobre la existencia en polen maduro de un ARNm estable que codifica las primeras proteínas de germinación, sin necesidad de transcripción "de novo" durante el proceso.

La presencia de ARNm almacenado en polen maduro de *Tradescantia paludosa* fue demostrada mediante traducción de ARN total y poly(A⁺) en un sistema de germen de trigo (Frankis y Mascarenhas, 1980). También se ha demostrado la presencia de ARNm presintetizado en maíz (Mascarenhas y col., 1984), en *Nicotiana tabacum* (Capková y col., 1988). En el helecho *Onoclea sensibilis* se ha observado la existencia de ARNm almacenado que es utilizado para la síntesis de proteínas durante imbibición y maduración de esporas en oscuridad (Raghavan, 1991). Dupuis y Dumas (1991) no encuentran respuesta al choque térmico durante la germinación del polen, a pesar de haberse observado que éste es transcripcionalmente activo. Este hecho apoyaría la idea de que ARNm presintetizado existente en el polen maduro sería utilizado para la síntesis de nuevas proteínas durante la germinación.

El grano de polen maduro acumula en su pared sustancias hidrosolubles que son liberadas al medio tras la rehidratación, y contribuyen a la interacción de grano de polen con el estigma, el estilo, el ovario y el óvulo, asegurando así el éxito de la fecundación. Estas sustancias pueden ser azúcares, aminoácidos, proteínas y sustancias de crecimiento. Los flavonoides, sustancias que se han encontrado en la exina (Mascarenhas, 1988), se ha visto que estimulan la germinación y el crecimiento del tubo polínico (Ylstra y col., 1992). También se han encontrado en la pared sustancias con carácter reductor que parecen desempeñar un papel en las interacciones polen-estigma.

Pared del grano de polen

La pared del grano de polen está formada por dos capas. Una capa externa: exina, y una capa interna: intina.

La exina está compuesta principalmente de un biopolímero muy resistente, la esporopolenina, del que aún no se conoce su estructura molecular. En la síntesis de la exina intervienen tanto las células del tapetum como la microspora (Bedinger, 1992). Se piensa que la microspora (o tal vez el meiocito) elabora una matriz fibrilar conocida como primexina o glicocalyx (Heslop-Harrison, 1971), en donde se determina el patrón de la exina. El papel del tapetum en la síntesis de la exina no está claro. Sin embargo, parece ser que las células del tapetum secretan precursores de esporopolenina que contribuyen a la formación de la exina (Bedinger, 1992). Mediante el aislamiento y la purificación de la exina se han obtenido anticuerpos específicos de ésta (Southworth y col., 1988), y se han podido caracterizar algunas proteínas estructurales (Chay y col., 1992). Los componentes proteicos de la exina parecen provenir de la expresión génica esporofítica (células del tapetum) (Knox y Heslop-Harrison, 1969; Vithanage y Knox, 1980; McCormick, 1991).

La intina comienza a formarse según las especies, bien antes de la primera mitosis, o bien en el estadio de grano de polen bicelular joven. Está formada por microfibrillas de celulosa incluidas en una matriz de material péctico y hemicelulósico (ref). En la región de la apertura el espesor de la intina es considerablemente mayor. También se ha localizado material proteico en esta capa, especialmente en la región de la apertura (Knox, 1984). Los componentes proteicos de la intina parecen ser de origen gametofítico (McCormick, 1991).

Control esporofítico del desarrollo de polen: el tapetum

La producción de gametos en plantas superiores requiere la participación, tanto de las células haploides gametofíticas en desarrollo como de las células diploides del tejido esporofítico. En concreto, el tapetum es un tejido esporofítico que desempeña un papel crucial en el desarrollo de polen.

1. El grano de polen es heterótrofo. En algunos miembros de la familia Malvaceae se han visto cloroplastos en el grano de polen (Maheshwari, 1950), aunque se duda de su funcionalidad desde el punto de vista fotosintético. Se ha propuesto que el tapetum podría actuar a modo de tejido nutritivo de la microspora, de manera análoga a las células nodriza en mamíferos.

2. El tapetum parece estar involucrado en la disolución de la pared de calosa para liberar a las microsporas de la tetrada, mediante la secreción de la enzima 1,3- β glucanasa o calasa (Kaul, 1988). En estudios de localización de actividad calásica, no se ha detectado ésta en ninguno los estadios meióticos de los microsporocitos, estando presente exclusivamente en los tejidos somáticos de la antera en el momento de ruptura de la tetrada. Numerosos estudios parecen indicar que el enzima que degrada la calosa es sintetizado en el tapetum de manera transitoria; para ser secretado al lóculo y degradar las paredes de calosa que rodean a las microsporas. El tiempo de producción y secreción de esta enzima por el tapetum parece ser crítico para el normal desarrollo del polen (Eschrich, 1961; Mepham y Lane, 1969; Frankel y col., 1969; Izhar y Frankel, 1971; Stiegliz y Stern, 1973). Así, en un caso de esterilidad citoplasmática masculina (ECM), se encontró que la disolución de la pared de calosa era prematura, conduciendo a la muerte de la microspora (Izhar y Frankel, 1971). Worral y col. (1992) obtuvieron esterilidad masculina en plantas transformadas con un gen modificado de calasa unido a un promotor de *Arabidopsis* activo en el tapetum durante meiosis. En este último caso se observó que tanto las células del tapetum como las microsporas presentaban anomalías,

lo que abre la posibilidad de que estos dos tipos de células puedan ser interdependientes durante el desarrollo del gametofito.

3. El tapetum también parece estar relacionado en algunos casos con la producción de precursores de la exina, como se ha indicado anteriormente. Tras la degradación del tapetum en estadios avanzados de microspora o primera mitosis, se liberan de estas células lípidos de origen plastidial y que constituyen el llamado polenkitt, o bien material lipídico y proteínico procedente de la degradación del tapetum y que forma las llamadas trifinas. Polenkitt y trifinas constituyen la cubierta del polen.

La naturaleza recesiva de la mayor parte de las mutaciones que resultan en esterilidad masculina indica que la expresión de estos genes ocurre en células diploides, y no en el gametofito haploide. En la mayor parte de las mutaciones recesivas esporofíticas en distintos loci, causantes de esterilidad masculina, los estudios citológicos han revelado que el tejido esporofítico más afectado corresponde a las células del tapetum (Bedinger, 1992; Majewska-Sawka y col., 1993). En plantas transformadas de tabaco se ha inducido esterilidad masculina mediante destrucción de las células del tapetum utilizando un gen de ribonucleasa citotóxica fusionado a un promotor específico del tapetum (Mariani y col., 1990). Utilizando un gen inhibidor de esta ribonucleasa la planta puede volver a ser fértil (Mariani y col., 1992).

Heslop-Harrison (1980) rechazó la idea de la "neutralidad" de la microspora desde el punto de vista de que su desarrollo dependa exclusivamente de su propio genoma. Propone que el esporofito ejerce un control parcial, bien mediante la regulación directa del genoma haploide durante la ontogenia gametofítica, o bien mediante determinantes esporofíticos transmitidos a la espora durante la meiosis.

Actualmente se sabe que un gran número de genes se expresa en polen. En *Tradescantia*, un 60 % de genes son expresados tanto en el gametofito como en el tallo (esporofito); en maíz, esta expresión se eleva a un 65%. Un 10-20 % de genes expresados en maíz y *Tradescantia* parecen ser específicos de polen (Mascarenhas, 1990). A pesar de que la mayoría de los isoenzimas expresados en el gametofito masculino también se encuentran en el esporofito, ciertas enzimas son codificadas en polen por genes diferentes de aquellos que codifican para la misma actividad enzimática en tejidos del esporofito (por ejemplo, genes que codifican para isoenzimas no alélicas, isoformas específicas en antera y/o polen de α y β tubulinas) (Mascarenhas, 1990).

La maduración in vitro de la microspora aislada de la antera constituye un sistema muy interesante para el estudio de la influencia del esporofito en el desarrollo del polen, ya que todo lo que necesitan estas células para su desarrollo ha de ser añadido al cultivo. La manera de comprobar la viabilidad de ese polen madurado in vitro es mediante polinización in situ y obtención de semillas viables. Benito-Moreno y col. (1988a) fueron los primeros en obtener un sistema viable de maduración de microsporas en *Nicotiana tabacum*. Este sistema ha sido perfeccionado por Tupy y col. (1991). Ylstra y col. (1992), utilizando el sistema de maduración in vitro para *Nicotiana tabacum*, encuentran que los flavonoles quercetina, kaempferol y myricetina añadidos al medio de maduración, estimulaban fuertemente la frecuencia de la germinación y crecimiento del tubo polínico, así como la producción de semillas. En *Triticum aestivum* también se ha logrado la maduración in vitro de polen a partir de microspora (Stauffer y col., 1991).

Durante la germinación una gran cantidad de sustancias que se encuentran en la exina pueden estar relacionadas con las interacciones polen-estigma. El origen esporofítico y/o

gametofítico de estas sustancias todavía no se conoce. Los flavonoides parecen ser sustancias producidas exclusivamente por el esporofito. En *Petunia*, el gen que codifica para una de las principales enzimas de síntesis: flavono chalcona flavonona isomerasa, se expresa exclusivamente en la pared de la antera, pero no en polen (Van Tunen y col., 1990, 1991)

Un fenómeno derivado de la interacción polen-estigma es el de autoincompatibilidad. La autoincompatibilidad es una manera de prevenir la endogamia en plantas; está controlada genéticamente por un locus de múltiples alelos (McCormick, 1991). Se produce si un tipo de proteínas que se encuentran en el polen son idénticas a las que se encuentran en el estigma; en este caso se inhibe el crecimiento del tubo polínico, impidiéndose la fertilización. Existen dos tipos de autoincompatibilidad: a) gamética, en la que el fenotipo del polen está determinado por el genotipo de éste, y b) esporofítica, en la que el fenotipo del polen está determinado por el genotipo de la planta parental diploide.

FACTORES DE CRECIMIENTO DURANTE EL DESARROLLO DEL POLEN

Existen muy pocos trabajos en los que se estudie el contenido o el papel de las hormonas y otros factores de crecimiento durante el desarrollo del gametofito masculino. La mayor parte de los efectos se conocen por estudios indirectos con mutantes deficientes en alguno de estos compuestos, o en las enzimas implicadas en su metabolismo.

El posible papel que juegan las poliaminas durante el desarrollo del grano de polen, así como en la germinación de éste, ha atraído muy poca atención. Bagni y col. (1981) demostraron que la síntesis de poliaminas precede la emergencia de tubo polínico en polen de manzana. Speranza y col. (1983), encontraron poco efecto de las poliaminas exógenas en la germinación, viendo sin embargo que estas podían suplantar el efecto del Ca^{++} . Prakash y col. (1988) encontraron que durante la germinación de polen de

Catharanthus la espermina tenía un efecto positivo en germinación a 0.01 mM, y un efecto inhibitorio a 0.1 mM. La presencia del inhibidor de la síntesis de espermidina MGBG a 0.5 mM, sin adición de espermidina, redujo el porcentaje de germinación, y a 1.5 mM la germinación se vió inhibida totalmente. Malmberg y McIndoo (1983) encontraron una línea celular de *Nicotiana tabacum* resistente al inhibidor MGBG; al regenerar plantas procedentes de estas líneas celulares observaron en los ovarios la presencia de anteras en lugar de óvulos, así como un porcentaje putrescina:espermidina 1:4, frente al 1:1 del fenotipo salvaje. Otro mutante resistente a MGBG presentó esterilidad masculina y fertilidad femenina. El que los mutantes afectados en el metabolismo de poliaminas tengan a su vez alterada la expresión de los meristemos florales sugiere la importancia de las poliaminas en el desarrollo gametofítico.

CULTIVOS

Las células vegetales aisladas y puestas en un medio de cultivo, no continúan con la vía de desarrollo a la que estarían destinadas si formaran parte de la planta entera. En medio de cultivo pueden desdiferenciarse y dividirse de manera ilimitada formando un callo, o bien pueden regenerar una nueva planta. En las células vegetales no existen líneas celulares para formar tejidos y órganos, como existe en animales, sino que las células se diferencian en función a la posición y no a un programa genético (Vicente y col., 1991). Se dice de esta manera que una célula vegetal es totipotente. El grano de polen en principio parecía ser una excepción a ésto. El desarrollo del grano de polen normalmente sigue una vía perfectamente programada, que no es fácil de interrumpir mediante aislamiento y cultivo in vitro de estas células, que carecen de totipotencia. Sin embargo, en ocasiones se ha podido interrumpir in vitro el desarrollo

gametofítico en condiciones especiales, consiguiendo que el polen inmaduro desvíe su vía de desarrollo gametofítica hacia el esporofítico (embriogénesis).

Antecedentes de cultivos de polen

En los inicios del cultivo in vitro de plantas se intentó la regeneración de las mismas utilizando cualquier parte del vegetal, incluidas las anteras. Sin embargo, como ocurrió con muchos otros órganos, en anteras los resultados no fueron los esperados. En 1953, Tulecke observó por primera vez que los granos de polen maduro de la gimnosperma *Ginkgo biloba* cultivados in vitro podían generar callos haploides; sin embargo, no pudo regenerar la planta entera. Hasta 1964 y de una manera circunstancial no se obtuvieron los primeros embriones haploides a partir de microsporas de *Datura innoxia* (Guha y Maheshwari, 1964). Estos embriones dieron lugar a plantas con un número de cromosomas haploides (gamético). Más tarde, Bourgin y Nitsch (1967) obtuvieron las primeras plantas haploides a partir de polen de *Nicotiana tabacum*. Antes de este descubrimiento ya se conocían las plantas haploides (Blakeslee y col. 1922), así como su importancia en la mejora genética e investigación básica (Blakeslee y Belling 1924). Sin embargo, la producción de haploides a partir de polen dió lugar a un nuevo e interesante campo de estudio, a la vez que nuevas posibilidades en el campo de la investigación aplicada, debido a la abundancia de polen producido por una planta. Durante los 15 años siguientes, utilizando cultivos in vitro tanto de anteras como de polen aislado, se intentó inducir androgénesis en un gran número de especies interesantes desde el punto de vista científico y económico. Algunas especies de Solanáceas repondieron muy bien. Sin embargo, en otras los rendimientos fueron muy bajos o totalmente nulos. Posteriormente, se pudieron identificar algunos factores que aumentaban la producción de plantas a partir de cultivos de anteras (Maheshwari y col. 1980, 1982); pero

comparado con el potencial de polen disponible en una planta, estos incrementos no resultaron significativos. Otros investigadores trataron de utilizar cultivos de polen aislado, que lo hicieran más manejable (Nitsch y Norreel, 1973; Nitsch 1974; Reinert y col. 1975) pero las mejoras en el rendimiento tampoco fueron las esperadas.

Por otra parte, la maduración de pólen in vitro para el estudio del desarrollo gametofítico normal disminuyó en importancia durante los años 70 y 80. Sin embargo, la germinación de polen in vitro, así como el desarrollo del tubo polínico incrementaron en interés, principalmente por sus aplicaciones en la mejora genética (autoincompatibilidad, almacenaje de pólen, etc.)(Ref)

Recientes avances han hecho posible en polen conseguir las dos rutas (gametofítica y esporofítica) in vitro, principalmente en trabajos en los que se ha usado el tabaco *Nicotiana tabacum* como planta modelo (Heberle-Bors, 1989).

CULTIVOS DE POLEN Y ANTERAS PARA LA FORMACION DE HAPLOIDES

La formación de haploides por medio de cultivos de anteras es hoy en día una técnica establecida a nivel comercial en el campo de la mejora genética (Morrison y Evans, 1988). Algunas variedades de trigo obtenidas de esta manera han sido ya usadas en China (Hu y Zeng, 1984) y Francia (De Buyser y col., 1987).

Sin embargo, la aplicación de los cultivos de anteras en plantas cultivables es limitada y, considerando el gran número de granos de polen que contiene la antera, el rendimiento es todavía muy bajo. A diferencia de lo que ocurre con los métodos de regeneración de plantas vía micropropagación o por producción de protoplastos, la inducción de la división celular en el polen inmaduro no es sólo consecuencia del aislamiento del órgano y de los factores de crecimiento usados en el medio de cultivo, sino que a veces se requieren pretratamientos sofisticados de la

planta donadora entera, del capullo floral aislado o de la propia antera; entre los tratamientos que inducen androgénesis están las altas temperaturas (Keller y Armstrong, 1979); bajas temperaturas (Nitsch y Norreel, 1972, Sunderland y col., 1981, Wenzel y col., 1977); tratamiento anaerobio (Imamura y Harada, 1981); altas concentraciones de CO₂ (Johansson y col., 1982) e irradiación gamma (McDonald y col., 1988).

Los esfuerzos dirigidos a conseguir un rendimiento significativo en producción de haploides a partir de cultivos de anteras han sido negativos. Esto ha conducido a intentar la producción de haploides a partir de cultivos de polen aislado, o a usar el potencial de los óvulos no fertilizados para este fin. En ningún caso ha sido posible la producción de haploides en cultivos de polen aislado de especies en las que previamente no se había conseguido con los cultivos de anteras, y en contadas ocasiones se ha recurrido con éxito al cultivo de óvulos no fertilizados (ver revisión de Yang y Zhou, 1990). Hasta la fecha, según las referencias bibliográficas, la obtención de haploides en los cultivos de anteras es un requisito necesario para conseguirlos a partir de cultivos de polen. Solanáceas y Gramíneas son las familias que cuentan con un mayor número de especies de las que se pueden obtener haploides. Debido al hecho de que para cada planta las condiciones experimentales para la obtención de haploides sean específicas de cada especie, y no exista un protocolo unificador para la obtención de haploides, se ha visto la necesidad de profundizar en este aspecto mediante el uso de plantas modelo. El tabaco se ha convertido en una de las más apropiadas por poseer anteras grandes y en número relativamente alto, obteniéndose un número relativamente alto de embriones haploides a partir de sus cultivos.

El uso de los cultivos de polen aislado permite un control de los procesos de desarrollo mucho más ajustado. Los factores usados in vitro actúan directamente sobre el polen y embriones

por él producidos, mientras que en anteras el efecto de las condiciones in vitro no es directo, sino mediado por la pared de la antera que rodea al polen. Si bien el cultivo de anteras parece ser la técnica escogida para la producción comercial de haploides, el cultivo de polen es una técnica mucho más apropiada para el estudio de la embriogénesis de polen a nivel de investigación básica.

Ventajas del uso de haploides en agricultura

El uso de haploides es ventajoso por:

1. La presencia de un único juego de cromosomas facilita mucho el aislamiento de mutantes, siendo la embriogénesis in vitro de polen un sistema muy útil a la hora de inducir, detectar y analizar mutantes en gran número de células haploides, que van a dar lugar a una plántula. A este respecto se han obtenido algunos mutantes deficientes en la enzima nitrato reductasa y auxotróficos de protoplastos y cultivos celulares obtenidos a partir de haploides derivados de polen en *Datura*, beleño y *Nicotiana*, así como células haploides de mayor calidad nutricional en arroz (Sangwan y Sangwan-Norreel, 1990).

2. Mediante diploidización de los cromosomas es posible obtener diploides isogénicos (homocigotos) a partir de ellos. Por técnicas de autofecundación y retrocruzamiento es posible la obtención de líneas puras, pero es un proceso muy tedioso. Mediante cultivos de anteras o de polen es posible la obtención de haploides en un plazo de semanas, y mediante diploidización se pueden obtener homocigotos diploides en una sola generación. Estas plantas homocigotas pueden ser usadas para producir híbridos.

3. El potencial embriogénico del polen puede ser utilizado para la transformación génica de los embriones, consiguiéndose de esta

manera plantas transformadas haploides que expresarían los genes transferidos, incluyendo mutaciones recesivas.

4. La sencillez del método de la embriogénesis de polen hacen de éste un sistema ideal para el estudio de los mecanismos inductores de embriogénesis a nivel molecular, y el estudio de la expresión de genes reguladores del proceso.

Los cultivos de polen aislado pueden ser también utilizados para estudios genéticos, especialmente de mutaciones y modificaciones celulares.

ADQUISICION DE LA CAPACIDAD ANDROGENICA

Parece ser que el polen de algunas especies está predispuesto genéticamente a seguir una vía de desarrollo androgénica cuando se cultiva in vitro, siendo la capacidad androgénica una propiedad innata de cierto tipo de plantas. Sangwan y Sangwan-Norreel (1987), estudiando especies androgénicas y no androgénicas, encuentran que los plastidios juveniles (proplastidios) son típicos de especies androgénicas, mientras que los plastos diferenciados o amiloplastos lo eran de las no androgénicas, sugiriendo que el almidón juega un papel esencial en la androgénesis. Por otro lado, los pretratamientos a los que se somete la planta o la antera pueden aumentar el rendimiento en plantas androgénicas, pero nunca se consiguió inducir androgénesis en variedades recalcitrantes. Con respecto al estadio del polen a partir del cual se pueden obtener embriones, sólo estadios determinados, normalmente entre tetrada y joven binucleado y medio, dependiendo de la especie, son susceptibles de inducir androgénesis (Heberle-Bors, 1989; Sangwan y Sangwan-Norreel, 1990). El estadio del polen es también importante para la determinación de la ploidía de los embriones producidos por él. En *Datura*, la microspora en estadio de tetrada produjo mayormente embriones haploides, mientras que los granos

binucleados dieron lugar a embriones con un mayor nivel de ploidía (2n, 3n, 4n, etc) (Sangwan y Sangwan-Norreel, 1990).

En cultivos de anteras inmaduras de tabaco la mayoría de los granos de polen mueren al cabo de un determinado periodo de tiempo y solamente una pequeña fracción mantiene su viabilidad. De éstos, algunos continúan el desarrollo gametofítico normal, formando el tubo polínico o los llamados granos de polen gigantes (Sunderland, 1971; Sunderland y Wicks, 1971). En otros, el núcleo vegetativo se divide para formar el embrión. Las divisiones no comienzan inmediatamente tras la iniciación del cultivo, sino que han de trascurrir de 4-10 días. Antes de que estas divisiones puedan visualizarse puede ser distinguido un tipo particular de grano de polen en los cultivos. Observaciones al microscopio óptico muestran que en estos granos el núcleo está situado en el centro y prácticamente todo el espacio citoplasmático está ocupado por compartimentos de tipo vacuolar, quedando el citoplasma reducido a una fina zona limitante con la pared del polen, y otra rodeando al núcleo, conectadas ambas por delgadas fibras citoplasmáticas. El citoplasma de este tipo de granos se tiñe débilmente con carmín propiónico, y los núcleos son claramente localizables. Este tipo de polen se conoce por polen embriogénico y va a ser el que dará lugar a divisiones embriogénicas (Sunderland, 1971; Sunderland y Wicks, 1971).

Las características más notables del polen embriogénico en *Nicotiana tabacum* son diferentes a las de un grano de polen normal en cualquiera de sus estadios de desarrollo. Estas características han sido recogidas por diferentes autores y son:

- Amplios compartimentos de tipo vacuolar,
- No contienen gránulos de almidón. Los plastos se encuentran reducidos en número y se consideran plastidios sin diferenciar.
- Menor número de mitocondrias, y éstas condensadas en los

últimos estadios.

- Orgánulos agrupados alrededor del núcleo vegetativo.
- Pocos ribosomas, no agrupados en polisomas.
- Núcleo vegetativo en fase G2 del ciclo celular (Zarsky y col. 1992).

Los granos de polen embriogénico han sido llamados granos-E (Sunderland, 1978) o granos-P (Heberle-Bors, 1982) y se forman en cultivos de anteras como consecuencia de un proceso degradativo (Dunwell y Sunderland, 1974a,b). Sin embargo, poco se sabe con respecto a la inducción de androgénesis en granos de polen aislados, tanto a nivel ultraestructural como en lo referente a los mecanismos bioquímicos y moleculares que controlan el proceso.

TIPOS DE CULTIVOS DE POLEN

A) Cultivos de polen con precultivo de anteras

En tabaco, el periodo de precultivo de la antera es de 4-10 días, dependiendo del estadio inicial del polen y de las condiciones de cultivo (Wernicke y Kohlenbach, 1977; Wernicke y col., 1978). Este periodo coincide con el tiempo necesario para la formación de los granos embriogénicos a partir de microspora o de polen binucleado temprano. En plantas cultivables, este pretratamiento ha sido aplicado con éxito (en centeno, Wenzel y col., 1975; beleño, Wernicke y Kohlenbach, 1977; patata, Weatherhead y Henshaw, 1979). Tras el precultivo de la antera, el polen se aísla y se cultiva en un medio que contiene azúcar. En cultivo directo de microsporas o polen binucleado joven en un medio con azúcares nunca se consiguieron embriones, sino sólo la muerte del polen o la maduración del mismo (Takuchi y Mii, 1982). En algunos casos se ha demostrado que el tipo de azúcar utilizado es esencial para la división, como sucede en *Brassica campestris* con la sacarosa

(Hamaoka y col., 1991).

B) Cultivos de polen tras un pretratamiento de frío de los capullos florales

En *Nicotiana tabacum*, los capullos florales conteniendo polen en el estadio binucleado temprano fueron sometidos a un choque de frío. Posteriormente, el polen fue aislado y cultivado en un medio con sacarosa (Rashid y Reinert, 1980,1983). Estudios a nivel de microscopía óptica y electrónica revelaron la presencia de granos-P, del mismo tipo que los encontrados en cultivos de anteras. Este sistema ha sido también aplicado con éxito a *Datura innoxia* (Sangwan-Norreel,1977) , *Brassica napus* (Lichter,1982), *Petunia* (Sangwan y Norreel, 1975) y *Hyosciamus* (Nagmani y Raghawan, 1983).

C) Cultivos de polen basados en el dimorfismo del mismo

En flores casi maduras de ciertas plantas, incluyendo tabaco y cereales (Sunderland,1978), se pueden observar en condiciones naturales dos tipos distintos de polen. La población más numerosa está formada por polen gametofítico normal capaz de formar el tubo polínico, polinizar y fertilizar el óvulo. Estos granos son binucleados o trinucleados (dependiendo del género o la familia) y su citoplasma está muy enriquecido en granos de almidón. La población menos numerosa se compone de granos más pequeños, incapaces de formar el tubo polínico en un medio de germinación apropiado (Heberle-Bors,1982). Estos granos también pueden ser binucleados o trinucleados. En tabaco, estos granos coinciden con los granos de polen embriogénicos formados en cultivo de anteras o durante el choque de frío.

En tabaco ha sido posible el separar las dos poblaciones de polen por centrifugación en gradiente de densidad, y cultivar in vitro la fracción más ligera conteniendo los granos de polen más

pequeños.

A partir de estos cultivos ha sido posible obtener embriones y plantas haploides con un alto rendimiento, una vez mejorado el medio y las condiciones de cultivo (Benito-Moreno y col. 1988b).

D) Cultivos de polen sometido a un choque térmico

En *Brassica napus* es posible la inducción de la embriogénesis a partir del estadio de microspora. Para ello las microsporas son sometidas a un choque térmico durante un corto periodo de tiempo (6 horas a 33°C), y son cultivadas posteriormente a 25°C (Pechan y Keller, 1988; Zaki y Dickinson, 1991). También se ha visto que los granos de polen binucleados de *Brassica* pueden formar embriones tras ser sometidos a un choque térmico (Pechan y Keller, 1988). Hamaoka y col. (1991), utilizando cultivos de anteras de *Brassica campestris* demuestran que las altas temperaturas son necesarias en esta especie para la división simétrica de la microspora, y por tanto la formación de embrioides.

E) Cultivos de polen sometido a un tratamiento de ayuno

Este sistema de cultivo está basado en los trabajos de Gandhimathi (1982) e Imamura y col. (1982), en los que el polen aislado era sometido a un pretratamiento con agua pura. Posteriormente, el sistema fue optimizado y el medio no sólo incluía agua, sino también manitol, elementos minerales sin nitrógeno, y un pH elevado (Kyo y Harada, 1985, 1986). De esta manera era posible inducir la capacidad embriogénica en granos de polen inmaduro, para formar granos embriogénicos de una manera muy eficaz. Una vez formados los granos embriogénicos, estos morían si permanecían en el medio de ayuno; sin embargo, transfiriéndolos a un medio con azúcar éstos formaban proembriones en alto porcentaje, aunque nunca se logró obtener embriones y plántulas en estos experimentos. Benito-Moreno y col.

(1988b) han desarrollado un medio en el que estos granos embriogénicos inducidos mediante tratamiento de ayuno pueden formar grandes cantidades de embriones, y se ha conseguido también la regeneración de plántulas a partir de éstos. El tratamiento de ayuno ha sido también aplicado con éxito en cebada (Wei y col. 1986).

El proceso degradativo que tiene lugar en el grano de polen ha sido descrito como el factor de inducción de la androgénesis (Dunwell y Sunderland, 1974a,b,1975). La presencia de lisosomas, la formación de vacuolas en el citoplasma del polen, la degradación de granos de almidón y la desdiferenciación de plastos, el mantenimiento de la integridad mitocondrial y el descenso de la población ribosómica, son factores típicos de una célula en ayuno que metaboliza los nutrientes almacenados para la obtención de energía. Sucesos similares caracterizan el proceso de ayuno de una célula de levadura que se está preparando para la esporulación (Espósito y Klapholz,1981).

Debido a la alta eficacia con la que se forman granos embriogénicos en un medio sin azúcar y/o sin nitrógeno, se ha llegado a la conclusión de que el proceso de ayuno es quien desencadena el proceso degradativo. En cultivos de polen aislado, la inducción embriogénica afecta a casi todos los granos de polen; mientras que en cultivos de anteras y capullos florales sometidos a distintos pretratamientos, así como en el desarrollo de polen in vivo (dimorfismo del polen), sólo una fracción de la población de granos va a ser susceptible a la inducción embriogénica.

PAPEL DE LA PARED DE LA ANTERA EN LA EMBRIOGENESIS DEL POLEN

La pared de la antera tiene efectos muy importantes en la embriogénesis del polen, tanto a la hora de activar como de inhibir el proceso (Heberle-Bors, 1985).

Durante el desarrollo normal de la antera in vivo, el tapetum degenera en el estadio de tétrada (Misoo y Matsubayashi, 1981), o bien durar hasta la primera mitosis del polen, momento en el que las células del tapetum desaparecen como tejido, continuando la pared de la antera y los tejidos conectivos con la administración de nutrientes a los granos de polen. El almidón se agota en estos tejidos cuando los granos de polen son capaces de sintetizar este polímero por ellos mismos (Aruga y Nakajima, 1985). Durante el cultivo de anteras, el almidón desaparece de los tejidos conectivos y de la pared de la antera mucho más rápidamente, tras dos días de inicio del cultivo (Misoo y Matsubayashi, 1981; Aruga y Nakajima, 1985). El contenido en azúcar de los cultivos de anteras decrece muy rápidamente, alcanzando un nivel muy bajo tras 8 días de cultivo; in vivo el contenido en azúcar se duplica desde el estadio de primera mitosis hasta el de polen maduro (Aruga y Nakajima, 1985).

En cebada, el tapetum degenera en el estadio de primera mitosis de polen, pero desaparece completamente tras dos días de cultivo (Chen y col. 1984). En anteras de *Datura* tras el choque de frío, ha sido observada la degradación de la pared de la antera y la pérdida de granos de almidón (Sangwan y Camefort 1984).

Estos estudios indican que los granos de polen también pueden experimentar un proceso de ayuno en cultivos de anteras y en la flor. La pared de la antera actúa a modo de barrera que impide el paso de nutrientes del medio de cultivo al polen. Después de una semana de cultivo, la degradación de la pared de la antera permite el paso de azúcar al interior del saco polínico (Aruga y Nakajima 1985); es en este momento cuando los granos de polen pueden usar los nutrientes para la regeneración del citoplasma durante las primeras divisiones esporofíticas.

Estos estudios a nivel de cultivos de anteras van a explicar las diferencias en el estadio óptimo de partida para la obtención de haploides a partir de anteras o de polen aislado. En cultivos de polen aislado de tabaco, el estadio óptimo durante el desarrollo

del polen es el que va desde binucleado temprano a binucleado medio (Heberle y Reinert 1977; Rashid y Reinert 1980; Kyo y Harada 1986). En cultivos de anteras el estadio óptimo se halla menos definido, considerándose como óptimo el de la primera mitosis de polen. Durante los primeros días del cultivo de anteras el grano de polen mantiene su desarrollo gametofítico normal hasta alcanzar el estadio binucleado temprano-medio, comenzando a partir de aquí el proceso de degradación de citoplasma encaminado a la formación de los granos embriogénicos (Dunwell y Sunderland 1974a). Por tanto, la antera no sólo actúa a modo de barrera para el flujo de nutrientes, sino que también genera un ambiente cerrado que mantiene el desarrollo gametofítico normal hasta que se agota el contenido interno de nutrientes. Si se aísla el polen de la antera este puede responder al medio de una manera inmediata.

Distintas especies pueden diferir en la cantidad de materiales de reserva disponibles (enzimas que degradan almidón) almacenados en el tapetum u otros tejidos de la pared de la antera. Esto puede determinar la duración de la maduración y el número de granos de pólen con un desarrollo gametofítico normal en cultivos de anteras. Es posible que el fuerte incremento en el número de plantas que se obtienen en cultivos de anteras de cebada en un medio sin azúcares y con almidón como fuente de energía (Sorvari y Schieder, 1987) sea debido a un periodo inicial de "ayuno", necesario para que se forme un nivel determinado de azúcares a partir del almidón.

REGULADORES DE CRECIMIENTO Y OTRAS SUSTANCIAS EN ANDROGENESIS

El hecho de que en plantas modelo como *Datura*, *Nicotiana* y *Brassica* la embriogénesis de polen no necesite de aportación exógena de reguladores de crecimiento sugiere que el aporte exógeno de hormonas no es esencial para la en androgénesis. A pesar de esto algunas hormonas han sido utilizadas para la embriogénesis de polen in vitro, aunque se desconoce el papel que

éstas desempeñan en el periodo de inducción de embriogénesis. En cultivos de anteras de *Hyoscyamus niger* la auxina 2,4 D aumentó la eficiencia de la antera pero no afectó al número de pólenes embriogénicos; a altas concentraciones, 2,4 D redujo de manera significativa la formación de callos a partir del polen (en Sangwan y Sangwan-Norreel, 1990). Las citoquininas kinetina, BAP y zeatina redujeron la eficiencia del polen en *Hiosciamus niger* hasta un 40-60 % incluso a bajas concentraciones. Todas las citoquininas excepto ribósido de zeatina inhibieron el crecimiento embriogénico en estos cultivos.

La adición de poliaminas a los cultivos de anteras parece afectar de manera positiva a la embriogénesis de polen.

En cultivos de anteras de *Datura metel* los iones cobalto (inhibidores de la producción de etileno) y los iones plata (antagonistas del etileno) disminuyeron el número de embriones y plántulas desarrolladas a partir de cultivos de anteras. L-Metionina (precursor de etileno) y etrel (compuesto que libera etileno) estimularon la formación de embriones (Babbar y Gupta, 1986). Sin embargo, parece ser que el efecto positivo o negativo que ejerce el etileno en androgénesis depende de la especie.

El grano de polen puede ser recolectado en grandes cantidades y almacenado durante largos periodos de tiempo sin que pierda su viabilidad. Se comporta en cultivo como una única célula y por su naturaleza haploide representa un material genético más sencillo para el estudio bioquímico y molecular.

OBJETIVOS

La producción de haploides a partir del grano de polen es un proceso muy importante en el campo de la mejora genética de plantas con interés agrícola. Así, a partir de una planta con características importantes, bajo el punto de vista económico, y como una alternativa a los repetidos ciclos de reproducción que se necesitan para obtener unos caracteres determinados en especies que se autopolinizan, se podrían obtener plantas homocigotas para esos caracteres mediante diploidización del haploide obtenido. La haploidía también puede ser de gran utilidad en estudios de genética cuantitativa de especies cultivables (interacción génica, estimación de las desviaciones genéticas, etc), así como para estudios sobre diferenciación celular y alternancia de generaciones.

Las ventajas de los cultivos androgénicos de polen aislado de la antera sobre cultivos de anteras estriban en que todas las plántulas que se deriven de los primeros serán con seguridad haploides, mientras que en los cultivos de anteras puede darse el caso de que se formen plántulas a partir de tejido esporofítico (diploide).

La sencillez del método de inducción embriogénica a partir de cultivos de polen aislado de *Nicotiana tabacum* hacen de éste un sistema ideal para el estudio de los mecanismos inductores de la androgénesis. Nuestros estudios se han centrado en el periodo de ayuno que atraviesa el polen para adquirir la capacidad embriogénica.

En la presente memoria los objetivos que se han perseguido han sido:

1. La obtención de cultivos embriogénicos de polen aislado de Nicotiana tabacum con alto rendimiento.

2. Estudio ultraestructural (morfológico y citoquímico) del grano de polen al que se le ha inducido la capacidad embriogénica (tratamiento de ayuno). Estas características ultraestructurales pueden servir de ayuda para planificar posteriores estudios bioquímicos y moleculares.

3. Estudios sobre el ciclo celular en las células vegetativa y generativa del polen embriogénico. Se sabe que tras la primera mitosis, durante el desarrollo normal, el núcleo de la célula vegetativa pasa del periodo G₁ a un periodo de interfase, en el que permanece hasta la germinación. Ya que las divisiones embriogénicas se producen a partir de la célula vegetativa, nuestro interés ha sido el de averiguar en qué momento comienza la síntesis de ADN en condiciones de androgénesis.

4. Se ha realizado a nivel bioquímico un estudio de la síntesis de proteínas y ARN durante el proceso de inducción, estableciendo mediante análisis electroforético si durante el proceso de inducción se produce síntesis de nuevas proteínas y/o de nuevos ARNm.

5. Las poliaminas se ha visto que son compuesto que pueden estar implicados en la regulación del ciclo celular. Por este motivo hemos realizado un estudio de los niveles endógenos de poliaminas, antes y después de la inducción embriogénica, utilizando cromatografía líquida de alta resolución. También hemos analizado en cultivos el efecto de inhibidores de poliaminas y etileno, hormona muy relacionada con el metabolismo de poliaminas.

6. Mediante el uso de cDNA heterólogos que puedan estar relacionados con procesos embriogénicos o de stress, búsqueda de homólogos a dichos cDNA en el polen embriogénico, y análisis de la expresión génica. Mediante la técnica de hibridación in

situ, se pretende el análisis de la expresión de los clones que pueden estar relacionados con el proceso androgénico.

El propósito final es el de aclarar los mecanismos moleculares que intervienen en el proceso, con la idea de, a partir de una planta modelo como es Nicotiana tabacum, extrapolar nuestros resultados a otras plantas más importantes desde el punto de vista económico.

MATERIAL Y METODOS

1. MATERIAL VEGETAL UTILIZADO

Para los experimentos presentados en esta memoria se ha utilizado polen procedente de anteras de plantas de *Nicotiana tabacum* cv 'Petit Havana SR1' crecidas en cámara de cultivo a 25°C, y con un fotoperiodo de 16 h. luz y 8 h. oscuridad.

2. CULTIVOS DE POLEN

a) Determinación de los estadios del grano de polen.

Los distintos estadios de desarrollo del grano de polen se determinaron con ayuda del microscopio óptico, tras tinción con el colorante carmín propiónico preparado como sigue: Carmín al 4% (p/v) en ácido propiónico al 40% (v/v).

Se tomaron anteras de flores de distintas longitudes, se colocaron sobre un portaobjetos con una gotita de carmín propiónico y con una varilla de vidrio se aplastó la antera. Se quitaron los restos de antera antes de colocar el cubreobjetos y tras 1 o 2 minutos se observó al microscopio óptico.

Este colorante tiñe más intensamente el material genético, y de manera más ligera el citoplasma.

b) Preparación de los medios de cultivo.

Todos los medios utilizados en este trabajo fueron esterilizados en frío por filtrado en filtros Nalgene de 0.2 μ m de diámetro de poro.

- MEDIO AM4

Sales Miller Macro.....10%

Manitol.....0.4 M

pH : 7

- MEDIO M1S

Sales Miller Macro.....10%
Sales Miller Micro.....0.1%
Fe-EDTA.....1mM
Sacarosa.....0.25M
pH : 7

- MEDIO T8

Sales Nitsch Macro.....10%
Sales MS Micro.....0.1%
Fe-EDTA.....1mM
Sacarosa.....0.125%
Agar.....0.8%
pH : 5.8

Composición de las sales utilizadas

- Sales Miller Macro

KNO₃10g/l
NH₄NO₃10g/l
(NO₃)Ca₂4H₂O.....3.47g/l
PO₄KH₂3.0g/l
KCl..... 0.65g/l
MgSO₄.7H₂O..... 0.35g/l

- Sales Murashige y Skoog (MS) Micro

MnSO₄.4H₂O..... 22.3g/l
ZnSO₄.7H₂O..... 8.6g/l
H₃BO₃ 6.2g/l
Na₂MoO₄ 0.25g/l
CoCl₂.6H₂O..... 0.025g/l
CuSO₄.5H₂O..... 0.025g/l
KI..... 0.87g/l

c) Cultivos embriogénicos de polen aislado de N. tabacum.

El estadio apropiado para la embriogénesis es aquel en el que el grano de polen ha sufrido ya la primera mitosis y la vacuola ha comenzado a reabsorberse (pólen binucleado). Tanto el estadio binucleado temprano como el medio dieron lugar a divisiones embriogénicas. Sin embargo, con el binucleado tardío, en el que los granos de almidón comienzan a formarse, no fue posible la formación de polen embriogénico.

En primer lugar, se recolectaron flores de una longitud de aprox. 17mm, y a partir de una de las anteras se determinó el estadio, por medio de una tinción con carmín propiónico. Una vez determinado el estadio se esterilizaron las flores en 70% de etanol, durante 1 min., se depositaron las anteras en un pocillo de cristal, previamente esterilizado, al que se añadió 1 ml de medio de cultivo. Con una varilla de vidrio se presionó la antera para dar salida a los granos de polen. Se recogió la suspensión en un tubo de centrifuga de 12ml y lo centrifugamos a 3000 rpm 20 seg. Desechamos el sobrenadante y repetimos la operación anterior una vez más. Al final resuspendemos el polen en 1 ml de medio y lo pasamos a un tubo Eppendorff. De aquí tomamos una cantidad determinada para contar el número de granos de polen en una cámara de Neubauer.

Ajustamos el medio hasta conseguir una concentración de 100.000 pólenes por ml y colocamos el cultivo en una placa de Petri estéril. Mantenemos el cultivo en este medio durante 7-8 días a 25-28°C.

Pasado este tiempo, observamos el cultivo en un microscopio de fase reversa. En estos cultivos encontramos tanto polen de tipo embriogénico como granos muertos. Para obtener un cultivo más homogéneo antes de pasarlo al medio de división, separamos el pólen embriogénico del muerto en un gradiente de Percoll. Para ello preparamos Percoll al 50% en AM4. En un Eppendorff,

añadimos 0.5 ml de Percoll y 100 μ l de medio con el polen a separar; centrifugamos a 400 g y recogemos el polen que ha quedado en la interfase Percoll/medio, que es el polen embriogénico. El polen embriogénico, al que llamamos P-polen, lo pasamos ahora a un nuevo medio M1S, medio rico en azúcar.

Al cabo de unos 7-8 días en el medio M1S comenzamos a observar divisiones en el polen embriogénico, y al final se forman embriones globulares y torpedo.

Una vez alcanzado el estadio de embrión torpedo éste puede ser sacado del medio M1S con unas pinzas estériles y ser colocado en un medio sólido, T8, y en una cámara de luz. En este medio van a aparecer los cotiledones y se va a formar la plántula haploide.

3. ANALISIS DE PROTEINAS

a) Preparación de extractos de proteínas de polen

Las muestras de polen, a partir de las cuales se hicieron los extractos se resuspendieron en un volumen determinado de tampón de extracción, de la siguiente composición:

- HEPES pH 7.5..... 10 mM
- KCl..... 10 mM
- MgCl₂ 1.5 mM
- DTT..... 10 mM

Al tampón de extracción se añadió una muestra de inhibidores de proteasas, de composición:

- Benzamidina..... 1mM
- Apronitina..... 0.002 mg/ml
- Leupeptina..... 0.002 mg/ml

- Bacitracina..... 0.1 mg/ml
 - Antipaina..... 0.001 mg/ml
 - Pepstatina-A..... 0.7 µg/ml
 - PMSF..... 0.01 m
- * PMSF: Fenil-Metil-Sulfonil-Fluoruro.

Se procedió a la homogenización de la muestra en un homogenizador de cristal de 2 ml. Se comprobó que se había roto la pared del polen mediante la toma de una muestra y la observación de la misma al microscopio óptico.

Una vez obtenido el homogenizado añadimos a la suspensión un volumen (1:10) de tampón de alta sal, para ayudar la extracción de proteínas nucleares. La composición del tampón es la siguiente:

- HEPES pH 7.5..... 300 mM
- KCl..... 1.5 M
- MgCl₂ 30 mM

Centrifugamos las muestras en una centrífuga de mesa (Sigma) a 10000 rpm durante 10 min.. Recogimos el sobrenadante en un nuevo Eppendorff y de este tomamos una alícuota que usamos, bien para medir la concentración de proteínas o bien para medir la radiactividad incorporada.

b) Medida de la concentración de proteínas: Bradford.

El reactivo de Bradford que utilizamos fue el comercializado por Biorad. Como proteína patrón se usó la albúmina de suero bovino (BSA). La longitud de onda a la que se midió fue de 595 nm

c) Electroforesis en geles de poliacrilamida/SDS (PAGE/SDS).

Se siguió el método de Laemmli (1970) con algunas

modificaciones. El aparato utilizado para la corrida de los geles fue el Mighty Small de Pharmacia.

Preparación del gel separador.

- Acrilamida:Bis-Acrilamida (37:1)..... 12%
- Tris-HCl pH 8.8 0.37 M.
- SDS 0.1 %
- Glicerol 0.5 %
- TEMED 0.025 %
- PSA 0.03 %

Se deja gelificar la mezcla durante 2-3 horas, al cabo de las cuales se prepara el gel espaciador que se coloca sobre éste.

Gel espaciador:

- Acrilamida 3 %
- Bis-Acrilamida 0.0181 %
- Tris-HCl pH 6.8 125 mM
- SDS 0.1 %
- TEMED 0.1 %
- PSA 0.032 %

Se degasificó antes de añadir Temed y PSA, y se dejó polimerizar 1h.

Tampón de corrida:

- Tris-base 25 mM
- Glicina 192 mM
- SDS 0.1 %

Las muestras con las proteínas a separar en el gel se mezclaron con 0.5 volúmenes de Tampón I y 0.25 volúmenes de Tampón II. Se

- TEMED 0.01 %

Solución del electrodo del ánodo:

- 0.01 M H₃PO₄

Solución del electrodo del cátodo:

- 0.02 M NaOH (degasificado)

Tampón de lisis:

- Urea 8 M
- NP-40 2 %
- Anfolitos pI 5-7 1.6 %
pI 3.5-10... 0.4 %
- DTT 10 mM

Tampón de relleno:

- Urea 8 M
- Anfolitos 1 %
- NP-40 5 %
- DTT 10 mM

Tampón de equilibrado SDS:

- Tris HCl pH 6.8 62.5 mM
- SDS 2 %
- Glicerol 10 %
- Mercaptoetanol 0.5 %

Preparamos los geles para la primera dimensión y los dejamos polimerizar durante 1-2 h. Una vez polimerizados añadimos en la parte superior de cada gel 10 µl de tampón de lisis, y sobre éste 10 µl de tampón de relleno. Colocamos los geles en el

aparato de electroforesis y procedemos a realizar una preenfocaje, una vez puesto el tampón del ánodo y el del cátodo.

Precorrida:

- 200 V. 15 minutos
- 300 V. 30 minutos
- 400 V. 60 minutos

Terminado el preenfocaje quitamos el tampón de lisis y el de relleno, y añadimos la muestra resuspendida en tampón de lisis. Corremos los geles a 400 V. durante 24 horas. Al cabo de ese tiempo sacamos los geles y los equilibramos de 1/2 - 2 h. en tampón de equilibrado-SDS. Una vez realizado este paso, los geles están ya listos para ser corridos en una segunda dimensión. Para la segunda dimensión, en la que separamos las proteínas según su peso molecular, utilizamos el sistema de electroforesis SDS/PAGE descrito anteriormente. Para ello colocamos los geles ya equilibrados en la parte superior del gel SDS y los corremos a 20 mA.

e) Tratamiento de los geles

Para los casos en los que se utilizaron proteínas marcadas con ^{35}S -Metionina o con ^{32}P -ATP, utilizamos las técnicas de autorradiografía o fluorografía. En los casos en los que nos interesó detectar proteínas totales utilizamos técnicas de tinción con azul de Coomassie o tinción con plata.

1. Autorradiografía: Una vez secados los geles los expusimos a una película Kodak radiográfica X-Omat, dentro de un cassette especial para esta.

2. Fluorografía (Chamberlain, 1979): Una vez corridos los geles los fijamos durante 10 minutos con 5% de ATC a 95°C , tras un lavado en agua equilibramos 10 min. en Tris-base 0.1 M,

volvemos a lavar con agua y los llevamos a Salicilato sódico 1 M pH 5.5 durante 30 minutos, secamos y exponemos a -80°C .

3. Tinción en azul de Coomassie: Tras la corrida, fijamos el gel en Metanol/Acético/Agua (5/1/5), más 0.25% de azul de Coomassie. Teñimos durante 1 h, y desteñimos en Metanol/Acético (5/0.7) hasta ver las bandas. Una vez sean visibles las bandas dejamos en 10 % de acético durante unas horas.

4. Tinción de plata: Fijamos el gel en 0.0074 % de formaldehído en metanol al 50 % 1 o más horas. Teñimos en NaOH 21 mM, 0.375 % de NH_4OH y 8g/l de nitrato de plata 15 min. Revelamos en 50 mg/l de ácido cítrico y 0.0185 % de formaldehído hasta ver aparecer las bandas, tras lo cual paramos la reacción en 500 mg/l de ácido cítrico y 0.0165 % de metilamina. En cada paso siempre lavamos con agua destilada.

-Revelado de las películas de autorradiografía y fluorografía

Se realizó en una cámara de revelado fotográfico. Se utilizó como revelador Tetenal EUKOBROM y como fijador AGFA AGEFIX. Entre revelador y fijador se lavó la película en una solución 10% de acético en agua.

4. ENSAYO DE QUINASAS

Con estos ensayos pretendíamos comparar la actividad quinasa del sobrenadante post-ribosomal de distintos tipos de polen. Para ello comenzamos por hacer un extracto crudo de proteínas de cada muestra (detallado anteriormente). Con estos extractos procedimos a realizar una ultracentrifugación a 55.000 rpm durante 1 h en una Beckman con un rotor SW-TL-100-2. Tomamos el sobrenadante y lo dializamos durante toda la noche, siendo la composición del tampón de diálisis la siguiente:

- Hepes pH 7.5 20 mM
- KCl 50 mM
- Glicerol 5 %
- DTT 1 mM

Al día siguiente pasamos las muestras de las bolsas de diálisis a nuevos Eppendorff, centrifugamos durante 5 min. a 10.000 rpm en una centrífuga (Sigma) de mesa y medimos la concentración de proteína por Bradford. La cantidad de proteínas procedente del sobrenadante postribosomal que utilizamos en los ensayos de quinasas fue de 3.2 µg.

Medimos, tanto la actividad quinasa endógena del extracto como la capacidad del extracto de fosforilar otras proteínas añadidas de manera exógena al ensayo (mezcla de histonas, histona H1 o caseína).

Para los ensayos utilizamos un volumen final de 10 µl, de forma:

- Muestra o tampón D 3 µl
- H₂O u otras adiciones 4 µl
- (1)- *ATP premix 2 µl
- (2)- 10X tampón PK 1 µl

- (1) *ATP premix:
- H₂O 1.4 µl
 - ATP 5 mM 0.1 µl
 - ³²P-ATP 0.5 µl

- (2) 10X tampón PK:
- Hepes pH 7.5 240 mM
 - KCl 350 mM
 - MgCl₂ 40 mM
 - DTT 7 mM
 - Glicerol 15 %

Tras la preparación de las mezclas incubamos a 30°C durante 10 min. Añadimos entonces 5 µl de tampón I y 2.5 µl de tampón II

(ver apartado 3.c) y calentamos a 95°C 5 min. Las muestras una vez tratadas se corrieron en geles SDS/PAGE al 12 % . Los geles se fijaron, se secaron y se pusieron a exponer para autorradiografía.

5. MEDIDA DE LA SINTESIS DE ARN Y PROTEINAS

a) Síntesis de ARN

Para la síntesis de ARN se utilizó como marcador ^3H -uridina (Act. esp. 48 Ci/mmol). El marcaje de las muestras se realizó en las mismas placas de cultivo. Añadimos 2 μl por cada ml de medio durante 24 h, al cabo de las cuales recogimos las muestras, centrifugamos y lavamos el material 3 veces en el mismo medio de cultivo sin isótopo. Al sedimento añadimos 150 μl de Tris 100 mM pH 9 con 0.5 % de SDS; homogeneizamos la suspensión y añadimos 150 μl de fenol y 150 μl de Cl_3CH /alcohol isoamílico (24/1). Centrifugamos en una Sigma de mesa a 10.000 rpm durante 2 min. De la fase superior acuosa recogimos un volumen determinado al que añadimos : 1/10 volúmenes de albúmina de suero bovino 0.1 % y 1/5 volúmenes de ácido tricloroacético 50% Tras 5 min. en hielo filtramos en filtros GF/C (Waters) y lavamos con ATC 5%, 0.1% de Pi y 70% de etanol. Secamos en una estufa a 100°C y medimos en un contador de centelleo.

b) Síntesis de proteínas

Para la síntesis de proteínas utilizamos como marcador ^{35}S -metionina (Act. esp. 1500 Ci/mmol). El marcaje de las muestras se realizó en el mismo medio de cultivo. Añadimos 0.5 μl de isótopo por ml de medio. Tras un día de marcaje recogemos la muestra, la sedimentamos y la lavamos 3 veces. Resuspendemos el sedimento en 150 μl de Tris 100 mM pH 9 con 0.5 % de SDS; homogeneizamos y centrifugamos a 4°C 5 min. Tomamos un volumen

fijo de sobrenadante y añadimos 1/5 Volúmenes de ATC 5%. Mantenemos 10 min. en hielo, filtramos en filtros GF/C, lavando con ATC 5%, Pi 0.1% y 70% de etanol. Secamos y medimos la radiactividad incorporada.

7. EXTRACCION DE ARN DE POLEN

Para aislar el ARN se utilizó el método de Chomczynski y Sacchi (1987) con algunas modificaciones.

Se homogeneizaron los granos de polen en un mortero previamente enfriado con N₂ líquido; el material se mantuvo en todo momento también congelado para evitar la actuación de las ARNasas. Tras la descongelación del material y homogenización del mismo se añadió una cantidad determinada de solución D.

Solución D: - Tiocianato de guanidinio..... 4M
- Citrato sódico pH 7..... 25mM
- Sarcosil 0.5%
- β- Mercaptoetanol..... 0.1M

El homogenado fue traspasado a un tubo Corex, al que también se añadieron 0.1 volúmenes de Acetato sódico 2M (pH 4), 1 volumen de fenol saturado en agua y 0.2 volúmenes de Cloroformo:Alcohol isoamílico (49:1).

Se centrifugó a 10000 rpm en Sorvall con un rotor SS34 20 min. a 4°C. Se transfirió la fase superior acuosa a un nuevo tubo Corex, y se añadió 1 volumen de isopropanol. Se mantuvo a -20°C al menos durante 1 h., tras la cual se centrifugó a 10000 rpm. Se resuspendió el precipitado en un volumen pequeño de solución D y se traspasó a un eppendorff al que se añadió 1 volumen de isopropanol. Una nueva centrifugación en una Sigma de mesa a 12000 rpm 15 min sirvió para sedimentar el ARN precipitado. Este se resuspendió finalmente en una cantidad de agua bidestilada estéril tratada con dietilpirocarbonato.

En los casos en los que el precipitado contenía restos de

material glucídico se realizó una última extracción con 2 volúmenes de Cloroformo:n-Butanol (4:1), se centrifugó a 11000 rpm en una Sigma de mesa y se precipitó la fase acuosa como se detalla anteriormente.

6. TRADUCCION DE PROTEINAS "in vitro"

a) Preparación del lisado de reticulocitos de conejo

Se usaron para este propósito 5 conejos machos blancos de la variedad Nueva Zelanda a los que se inyectó durante 4 días cantidades decrecientes de una solución de fenilhidracina al 2.5 % para inducirles un estado anémico.

- Día 1: 0.35 ml de solución/Kg.
- Día 2: 0.30 ml de solución/Kg.
- Día 3: 0.20 ml de solución/Kg.
- Día 4: 0.15 ml de solución/Kg.

Tras el tratamiento se deja a los animales unos días en recuperación y finalmente se procede a la extracción de la sangre mediante punción cardíaca.

Centrifugamos la sangre a 3300g 10 min. a 4°C y resuspendemos el sedimento celular en un tampón salino, de composición:

- NaCl..... 134 mM
- KCl..... 5 mM
- MgCl₂..... 7.5 mM
- D-glucosa..... 5 mM
- Hepes pH 7.5.. 10 mM

Centrifugamos nuevamente esta suspensión a 6000 rpm en Sorvall (rotor SS34), 10 min. 4°C, retiramos el sobrenadante y repetimos la operación 3 veces para lavar las células.

Por último, para obtener el lisado resuspendemos los reticulocitos en agua estéril bidestilada y agitamos vigorosamente durante 5 minutos. Centrifugamos a 15000 rpm en una Sorvall (rotor SS34) 15min. 4°C y filtramos el sobrenadante en filtros de Nylon. Repartimos el sobrenadante en alíquotas, lo congelamos rápidamente en N₂ líquido y lo conservamos, bien en N₂ líquido o a -80°C.

b) Condiciones para la traducción endógena

Volumen estándar de reacción: 20 µl

- Creatina fosfato..... 10 mM
- KCl..... 90 mM
- MgCl₂..... 0.3 mM
- Hemina..... 20 µM
- Creatina quinasa..... 100 µg/ml
- Aa no radiactivos..... 100 µM
- Lisado..... 11.5 µl
- Aminoácido radiactivo... a elegir
- H₂O..... Hasta 20 µl

Solución decolorante:

- NaOH..... 1 M
- Leucina o Metionina.... 0.5 g
- H₂O₂..... 1.5 %

Preparar la mezcla de reacción e incubar a 30°C durante 60 a 90 minutos. Al cabo de ese tiempo tomamos alíquotas de 4 µl y las llevamos a 1ml de agua. Añadimos entonces 0.5 ml de solución decolorante, mezclamos e incubamos a 40°C durante 15 minutos. Precipitamos mediante adición de 0.5 ml de ATC al 50 % y lo mantenemos a 4°C durante 5 minutos. Filtramos a través de filtros GF/C, lavamos los filtros con 25 ml de ATC al 8 %, los

secamos y medimos la radiactividad incorporada a proteínas en un contador de centelleo.

c) Tratamiento del lisado con Nucleasa S7

La nucleasa S7 dependiente de calcio es específica para ARNm, no degradando el ARN ribosómico. Mediante este tratamiento se degrada el ARNm endógeno del lisado, de manera que podemos añadir ARNm preparado por nosotros para que sea traducido a proteínas, sin que haya solapamiento con proteínas traducidas por el propio lisado.

Descongelamos una alícuota de lisado de 10 ml y añadimos:

- Creatina quinasa..... 150 µg/ml
- Hemina..... 25 µM
- CaCl₂..... 1 mM
- Nucleasa 150 u/µl

Incubamos a 20°C durante 20 minutos, paramos la reacción añadiendo 100 µl de EGTA (agente quelante de calcio) 200 mM. Mezclamos. Añadimos 50 µl de ARNt de hígado de ternera (10 mg/ml), mezclamos y hacemos alíquotas, congelamos rápidamente y almacenamos a -80°C.

8. Búsqueda de un cDNA homólogo al clon Mshsp17 de alfalfa en una biblioteca de cDNA de polen binucleado de tabaco.

a. Titulado de la biblioteca.

La biblioteca fue preparada por Norbert Eller utilizando un kit de síntesis ZAP-cDNA de STRATAGENE.

Se realizaron distintas diluciones de los fagos en tampón SM:

NaCl.....	5.8 g/l
MgSO ₄	2.0 g/l
Tris-HCl 1M pH 7.5...	50 ml/l
Gelatina 2%	5 ml/l

Se tomaron 200 µl de células huésped de la cepa XL1-blue de *Escherichia coli* junto con 200 µl de la dilución de fagos y se incubaron 15 minutos a 37°C. A cada mezcla se añadieron 3 ml de agar-top, y se sembró en placas NZY, incubadas a 37°C durante la noche. Al día siguiente se contó el número de placas.

Agar-top

NaCl.....	5g/l
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	2g/l
Extracto de levadura..	5g/l
Caseina hidrolizada...	10g/l
Agarosa.....	0.7%

Placas NZY

NaCl.....	5g/l
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	2g/l
Extracto de levadura..	5g/l
Caseina hidrolizada...	10g/l
Agar Difco.....	15g/l

b. Screening

1) Preparación de los filtros

Preparar 6 placas de Petri de 15 mm y se platearon con aprox. 40000 pfu de la biblioteca de cDNA. En primer lugar se procedió a traspasar el ADN de los fagos a filtros de Nylon (Hybond-N, Amershan, de 0.45 Micron 132 mm). Para ello colocamos los filtros sobre cada una de las placas y esperamos 2 min., al cabo de ese tiempo retiramos los filtros y los sumergimos

primero en solución denaturalizante 5 min., 5 min en solución neutralizante y 30 min en solución de lavado. Finalmente sumergimos los filtros en etanol al 80 %, dejamos secar y fijamos el DNA al filtro durante 2 horas a 80°C.

Solución denaturalizante

NaCl..... 1.5 M
NaOH..... 0.5 M

Solución neutralizante

NaCl..... 1.5 M
Tris-Cl pH 8.0..... 0.5 M

Solución de lavado

Tris-Cl pH 7.5..... 0.2 M
2xSSC

2) Preparado de la prueba radiactiva mediante "Random Priming"

I. Partimos de 30-100 ng de DNA correspondiente al fragmento del clon que queremos analizar, y en un Eppendorff le añadimos 4 µg de "Primers". Calentamos a 100°C 5 minutos y rápidamente ponemos en hielo (en total 5 µl)

II. A los 5 µl de la mezcla anterior añadimos:

- 2.5 µl dNTP (-dATP) 0.5 mM
- 2.5 µl 10x Tampón M
- 3.0 µl 32-P dATP
- 1.5 µl H₂O
- 2.5 µl enzima Klenow (2 u/µl)

Incubamos durante 2 horas a temperatura ambiente, y finalizamos la reacción añadiendo:

- 1 μ l EDTA 0.5 M
- 3 μ l tRNA (10 mg/ml)
- 100 μ l TE (tris-EDTA pH 8, 150 mM)

Separamos el fragmento marcado en una columna Sephadex G50, centrifugando durante 30 segundos a 3000 rpm.

3) Hibridación

En un recipiente de plástico colocamos los filtros y los mojamos uno por uno en solución de hibridación; al final deben de quedar todos cubiertos en solución de hibridación. Desnaturalizamos la prueba radiactiva hirviéndola durante 10 minutos con 1 ml (10 μ g) de ADN de arenque, pasando rápidamente a hielo y finalmente añadiéndola a los filtros con la solución de hibridación.

Solución de hibridación:

- Formamida..... 48 ml
- 20xSSC 24 ml
- 2 M Tris-HCl pH 7.6 .. 1 ml
- 100x Denhardts 1 ml
- 50% Sulfato dextrano . 20 ml
- 10% SDS 1 ml
- H₂O desionizada 5 ml

- 20xSSC: - 3M ClNa
- 0.3M Citrato trisódico
- 0.5M tampón fosfato pH 7.2

Hibridamos a 37°C durante la noche. A la mañana siguiente lavamos en 5xSSC y 0.1% SDS, y vamos aumentando la estringencia hasta que el fondo nos vaya desapareciendo. Al final metemos los filtros en bolsas de plástico, los cerramos herméticamente y exponemos en una película de rayos X. Una vez revelada la película intentamos localizar los positivos marcados de manera más prominente en las placas de petri. Con un asa de platino extraemos la zona de agar-top correspondiente a la señal positiva, y la pasamos a un eppendorff añadiendo también 500 µl de tampón SM, sacudiendo durante 3 horas a 4°C. Después, procedemos al titulado de las muestras, y finalmente podemos conservar los fagos a 4°C añadiendo una gota de cloroformo a cada eppendorff.

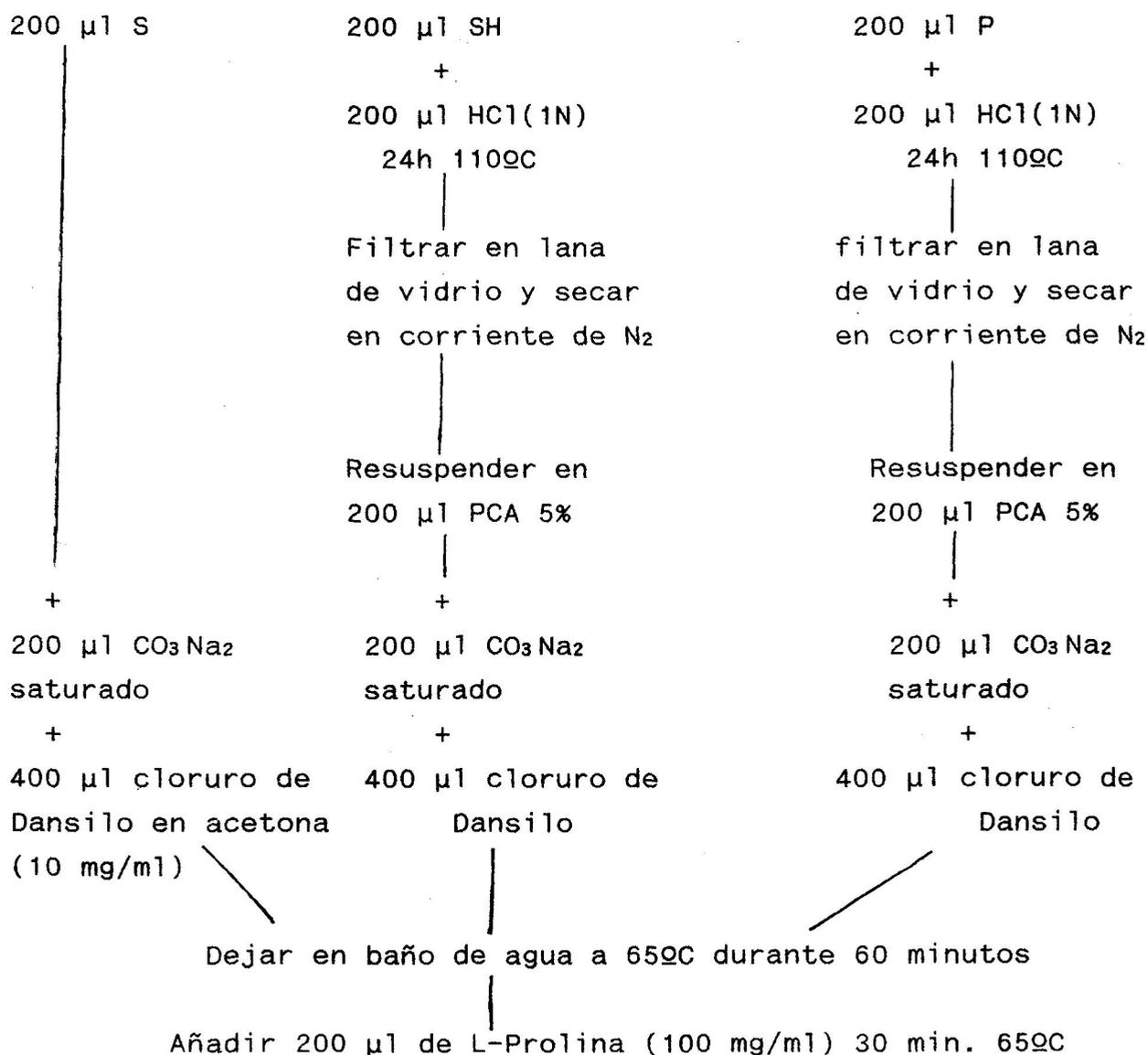
Una vez obtenidos los fagos el vector Uni-ZAP permite la excisión "in vivo" y la recircularización de cualquier inserto clonado incluido en el vector lambda formando un fagomid que contiene el inserto clonado.

8. CUANTIFICACION DE PAs ENDOGENAS

a) Extracción.

Para la extracción y cuantificación de PAs se siguió el método descrito por Smith y Davies (1985) con algunas modificaciones. Una determinada cantidad de polen se homogenizó en 0.25 M de tampón fosfato-K pH 8 y se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min. Una pequeña cantidad del sobrenadante se utilizó para medir el contenido en proteínas por la técnica del Bradford. Posteriormente se añadió un volumen igual al del sobrenadante de ácido sulfosalicílico al 4%; se centrifuga de nuevo a 12.000 rpm 15 min. y se seca el sobrenadante bajo corriente de N₂. Resuspendimos el residuo seco en un volumen de ácido perclórico al 5% y 1,6 hexano diamina en perclórico 5% (0.116 g/l) en proporción 4:1.

Para medir el contenido en poliaminas del precipitado procedente de la primera homogenización, se resuspendió éste en 400 μ l de NaOH 1N; a partir de aquí el proceso se realizó según se esquematiza:



Extraer con 800 µl de tolueno y secar bajo corriente de N₂

b) Determinación de las PAs dansiladas:

El residuo seco se disolvió en 200 µl de acetonitrilo (grado HPLC) y se filtró a través de filtros Millipore HV-4 (0.45 µm de diámetro de poro), pudiendo ser analizadas inmediatamente o ser almacenadas a -20°C durante unos días.

c) Patrones internos empleados

Se usó el mismo procedimiento de dansilación para las PAs patrones: Cad (dihidrocloruro), 1,6, diamino-hexano, Put (dihidrocloruro), SPD (trihidrocloruro) y SPM (tetrahidrocloruro) procedentes de Sigma (St. Louis, Mo).

Se inyectaron alícuotas de las muestras (20-25 µl), utilizándose como fase móvil acetonitrilo:agua (60:40 v/v) con un flujo de 1.5 ml/min, manteniéndose éste constante durante todo el cromatograma.

d) Características del cromatógrafo

Se utilizó un HPLC (Pharmacia) dotado con un espectrofotómetro fluorescente (las longitudes de onda de excitación y emisión de 365 y 425 nm respectivamente), columna de fase reversa Hypersil ODS (5µm 4.6 x 200 mm), horno para mantener la columna a 35°C, 2 bombas acopladas a un mezclador de gradientes, y un registro (KIP NONEN BD 41).

e) Cuantificación de las muestras

Para los cálculos de PAs endógenas se hallaron los factores respuesta a partir de los patrones (c). Para calcular la cantidad de cada poliamina se aplicó la fórmula siguiente:

$$P_{pa} = \frac{Fr \times A_{pa}}{A_{p1}} \times P_{p1}$$

Fr: factores de respuesta de las distintas PAs, calculadas por la inyección de concentraciones conocidas de las mismas.

A_{pa}: área de la poliamina problema.

A_{p1}: área del patrón interno.

P_{p1}: la cantidad de patrón interno que se le añadió inicialmente.

f) Análisis de las muestras

Para el análisis de las muestras se realizaron inyecciones de 20µl, en las mismas condiciones indicadas en el apartado c. Las condiciones fueron un gradiente de 60% a 90% de acetonitrilo durante los primeros 30 min, seguido de una elución isocromática durante los siguientes 5 min. Finalmente un gradiente del 90 al 60% de acetonitrilo estabilizaba la columna para la siguiente inyección.

Todos los disolventes utilizados fueron específicos de la técnica de HPLC, previamente filtrados y sonicados.

9. MARCAJE CON ³H-TIMIDINA Y MICROAUTORADIOGRAFIA

Se añadió 1µCi de [6-³H] timidina (Amersham, actividad específica 5 Ci/mmol) a 1 ml de medio de cultivo durante intervalos de 2 días de duración. Para cada experimento se utilizaron fracciones de un mismo cultivo. Tras el marcaje se

lavarón los cultivos 3 veces en una solución concentrada de timidina fría y se fijaron en etanol:ácido acético (3:1 v/v). El marcaje del polen en el medio de maduración MR26 y M1S (embriogénico) se llevó a cabo solamente durante los dos primeros días de cultivo.

a) Microautorradiografía

Los granos de polen se aplastaron en ácido acético 45% sobre portas gelatinizados. Se cubrieron los portas con una emulsión Ilford K-2 y se expusieron durante 2 semanas a 50C. Tras el revelado en el revelador Kodak D19, se tiñeron los portas en DAPI, y se contaron 300 granos de polen para observar la formación de precipitado de plata sobre los núcleos bajo el microscopio de epifluorescencia (Leitz).

10. TECNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

a) Procesamiento de las muestras para MO/MET

El material utilizado para la preparación de las muestras para microscopía electrónica ha sido siempre granos de polen aislados de la antera, en cualquiera de los estadios utilizados. Cada estadio se aisló utilizando un medio de cultivo adecuado:

- Microspora: MR26
- Polen binucleado: AMGlu
- Polen maduro: AMGlu
- Polen embriogénico: AM4

La fijación química se realizó en glutaraldehído 3% (v/v) diluído en tampón cacodilato sódico o tampón fosfato disódico-monopotásico (100mM pH 7.2). El periodo de fijación fue de 1 a

2 horas. Al final de la fijación las muestras se lavan en tres pases de 15 min. cada uno en el mismo tampón con el que se prepara el fijador.

En los casos de estudio exclusivamente ultraestructural las muestras se postfijan en tetróxido de osmio 2% (p/v) en el mismo tampón de fijación durante 2h. a temperatura ambiente, y posteriormente se lavan en tres pases de 15 minutos del mismo tampón.

Deshidratación

Tras la fijación, el material se deshidrata a través de una serie gradual de etanol al 10%, 30%, 50%, 70% y 90% (v/v) (1h. en cada paso) y finalmente tres pasos de etanol absoluto de 1h. cada uno. Posteriormente el disolvente empleado se cambia gradualmente por óxido de propileno a través de los siguientes pasos:

Mezcla	Relación	Tiempo
Etanol/Oxido de propileno	1:1	5 min.
Oxido de propileno	puro	3x10 min.

Infiltración

La infiltración se realiza gradualmente a través de varios pasos de mezclas de concentración creciente de resina (EPON o SPURR) y óxido de propileno:

Mezcla	Relación	Tiempo
Oxido de propileno/resina	3:1	2 h.
Oxido de propileno/resina	1:1	2 h.
Oxido de propileno/resina	1:3	2 h.

Polimerización

Las muestras se colocan debidamente orientadas y etiquetadas en el fondo de cápsulas de gelatina rellenas con resina y se polimerizan a 65°C durante 48 h.

Microtomía

De cada bloque se obtienen secciones semifinas de 1 µm de espesor en un ultramicrotomo "Ultracut E" de REICHERT-JUNG, utilizando cuchillas de vidrio. A su vez se obtienen secciones ultrafinas de unos 70 nm. de espesor que se recogen por contacto sobre rejillas de cobre de 200, 300 ó 400 agujeros.

Tinción de preparaciones

Las secciones semifinas se tiñen inespecíficamente utilizando la siguiente solución:

- Azul de metileno..... 0.130 g.
- Azul II..... 0.020 g.
- Glicerol..... 10 ml.
- Metanol..... 10 ml.
- Agua destilada..... 50 ml.
- Tampón fosfato 0.1 M pH 6.9..... 30 ml.

Las preparaciones se secan sobre una placa caliente y se montan

con medio DPX.

Contrastado de rejillas

Las secciones ultrafinas se contrastan según Reynold (1963), haciendo flotar las rejillas sobre gotas de:

- Acetato de uranilo 5% (p/v) en agua bidestilada durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- Lavado exhaustivo en agua bidestilada.
- Citrato de plomo en medio alcalino durante 10 minutos a temperatura ambiente, limitando la concentración de CO₂ ambiental mediante lentejas de NaOH y bajo una placa de petri invertida para reducir la aparición de precipitados. Esta solución se prepara a partir de:

- Nitrato de plomo..... 1.33 gr.
- Citrato trisódico dihidrato..... 1.67 gr.
- NaOH 1N..... 8 ml.
- agua bidestilada..... hasta 50 ml.

- Lavado intensivo en agua bidestilada.

Observación

Las observaciones a MET se realizaron en un Microscopio Electrónico de Transmisión ZEISS modelo EM10C. Para MO se utilizó el microscopio ZEISS modelo Stándar.

b) Fijación e inclusión en Lowicryl K4M

Fijación

Las muestras con polen aislado se colocaron en hielo (0°C) y se mantuvieron en la solución de fijación (2% de

paraformaldehido (PF) p/v + 0.1 % de glutaraldehido (GA) v/v en tampón fosfato) durante 1 h, al cabo de la cual se lavó la muestra 3x20 minutos en el mismo tampón del fijador.

Preparación del fijador:

- Poner 0.5 gr de PF en 10 ml de agua.
- Calentar al baño María.
- Añadir unas gotas de NaOH 1N hasta que se disuelva el paraformaldehido.
- Enfriar.
- Poner 0.1 ml de GA al 25%
- Añadir 12.5 ml de tampón fosfato 0.2 M.
- Ajustar pH a 7.2
- Enrasar hasta 25 ml con agua.

Deshidratación

- Etanol 30% 15 min. a 40C
- Etanol 50% 15 min. a 40C
- Etanol 70% 15 min. a 40C

Infiltración

- Mezcla etanol/Lowicryl puro sin acelerador (3:1), a 40C durante la noche.
- Mezcla etanol/Lowicryl puro (1:1) durante 3 h. a -200C.
- Lowicryl puro a -200C durante la noche.
- Lowicryl puro durante 1 h. a -200C.

Polimerización

Se colocan las muestras en cápsulas de gelatina etiquetadas o tubos Eppendorff tamaño pequeño, se rellenan con Lowicryl puro y se exponen a luz ultravioleta de 360 nm (tubos fluorescentes

