



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

Determinación de la viabilidad de polen y semillas

Apellidos, nombre	Gisbert Doménech, Carmina (cgisbert@btc.upv.es) Picó Sirvent, Belén (mpicosi@btc.upv.es)
Departamento	Departamento de Biotecnología
Centro	ETSIAMN-Universidad Politécnica de Valencia



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



1 Resumen de las ideas clave

En este artículo se va a explicar por qué es importante determinar la viabilidad del polen y las semillas, y se va a describir cómo determinarla utilizando la tinción con cloruro de tetrazolio. Esta tinción es relativamente sencilla y con ella se ha obtenido una buena correlación entre tinción y viabilidad en distintas especies. Puesto que la viabilidad del polen está influenciada por distintos factores ambientales, en los programas de mejora en los que se requiere realizar cruzamientos, es importante conocerla para determinar el momento idóneo de realización de los cruces. También es interesante para descartar posibles problemas de esterilidad masculina en cruces que no funcionan por problemas de incompatibilidad. Así mismo, una estima de la viabilidad del polen es necesaria cuando se pretende almacenarlo para su utilización tras la recolecta. En el caso de las semillas, las pruebas de viabilidad son comunes en los bancos de germoplasma y se realizan con distintos fines: i) determinar las condiciones de almacenamiento que sean adecuadas para prolongar su vida útil, ii) evaluar cómo van envejeciendo y programar su siembra para la obtención de semilla nueva y, iii) determinar la dormancia en aquellas semillas que la presentan.

2 Introducción

La realización de cruzamientos entre especies cercanas o cultivares de la misma especie se realiza con distintos fines, como pueden ser la producción de plantas híbridas que muestren mayor vigor, la introgresión de genes de resistencia en cultivares sensibles, etc. Gran parte de estos cruzamientos se realizan de manera manual, lo que conlleva, en plantas hermafroditas, la emasculación de las flores de uno de los parentales antes de que éstas se abran y la polinización con polen del otro progenitor. En plantas unisexuales, se embolsarán las flores femeninas antes de que se abra la corola, para asegurar que no llega polen extraño, y se polinizarán posteriormente. La realización de estos cruzamientos controlados es pues un proceso laborioso en el que es importante obtener el mayor porcentaje de éxito posible. Por ello, resulta muy importante analizar la viabilidad del polen (que puede verse afectada por distintos factores ambientales), para determinar el momento idóneo de la realización de los cruces. Si el polen presenta buena viabilidad y no tenemos éxito en los cruzamientos, podemos pensar que entre los parentales que intentamos cruzar existen barreras de cruzabilidad. También, en algunas ocasiones, por ejemplo cuando cruzamos plantas que no coinciden en el momento de la floración, puede ser conveniente el almacenamiento de polen en condiciones en las que se mantenga viable para su posterior utilización.

Para determinar la viabilidad del polen se pueden realizar distintas pruebas, como tinciones con distintos colorantes, pruebas bioquímicas o la germinación de polen en medios artificiales. Aunque la germinación nos ofrecerá una información más real de si el polen es capaz de desarrollar tubos polínicos que alcancen el ovario, la utilización de la tinción o de reacciones que provoquen un cambio de color en función de si hay o no actividad enzimática son más rápidas y por ello se utilizan comúnmente. Entre estas últimas, el cloruro de tetrazolio ha mostrado una buena

correlación entre la viabilidad y posterior germinación en distintas especies. Esta correlación ha sido, en general, superior a la obtenida con otros colorantes vitales, como acetocarmin o fucsina, por lo que consideramos que es el más adecuado para determinar la viabilidad.

Los bancos de germoplasma ejercen un papel fundamental en la conservación *ex_situ* de la biodiversidad. La mayoría de los bancos de germoplasma son bancos de semillas que preservan éstas durante el mayor tiempo posible. Sin embargo, al almacenar las semillas se va perdiendo su viabilidad. La rapidez con la que esto ocurre depende del genotipo y del periodo y condiciones de almacenamiento. Por ello, es común la realización de pruebas de viabilidad para ajustar condiciones de conservación y determinar cuándo se deben reproducir las semillas almacenadas para reemplazarlas por semilla nueva. Determinar la viabilidad es también un aspecto muy importante en semillas que presentan dormancia, es decir, que no germinan en condiciones favorables de germinación aunque si son viables. Según el índice de Offord et al. (2004) una semilla presenta dormancia si el valor calculado con la expresión $=1-(\% \text{ germinación} / \% \text{ viabilidad})$ es igual ó superior a 0.4. Al igual que para el polen, la tinción con cloruro de tetrazolio para determinar la viabilidad de las semillas es una técnica muy empleada.

3 Objetivos

El objetivo de este artículo docente es que los alumnos conozcan la utilidad de determinar la viabilidad de polen y/o semillas mediante una tinción basada en la utilización del cloruro de tetrazolio.

4 Desarrollo

El cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio o cloruro de tetrazolio es un indicador redox. Es un compuesto incoloro, que se reduce en presencia de deshidrogenasas a 1,3,5-trifenilformazán (formazán), compuesto de color rojo. Se utiliza para diferenciar tejidos metabólicamente activos de aquellos que han perdido la actividad como consecuencia de una degradación o desnaturalización de las enzimas.

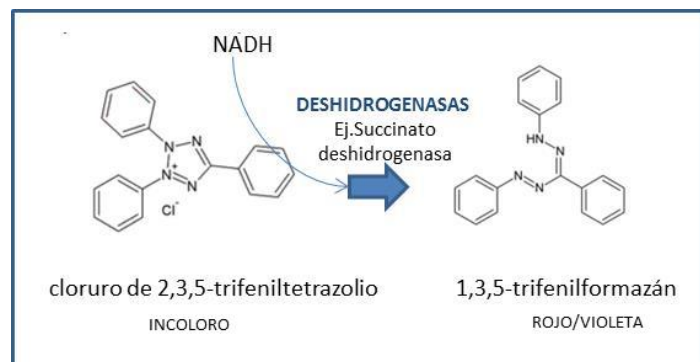


Figura 1. Esquema de la reacción que se produce en el cloruro de tetrazolio en presencia de deshidrogenasas.



Procedimiento para la tinción de polen

1. Sujetar las anteras con una pinza y golpear ligeramente para colocar los granos de polen en un portaobjetos.
2. Añadir una gota de cloruro de tetrazolio (0.5%) y dejar el portaobjetos en oscuridad (se recomienda no exponer este compuesto a la luz ya que es algo inestable térmica y lumínicamente). Esperar 15-20 minutos.
3. Cubrir con un cubreobjetos y observar al microscopio óptico (10x /40x).
4. Realizar un recuento del número de granos blancos o incoloros (muertos) y rojos o violáceos (viables).

Procedimiento para la tinción de semillas

1. Hidratar las semillas sumergiéndolas en agua.
2. Colocar las semillas en un papel y realizar un corte transversal.
3. Colocar las semillas en un vial.
4. Añadir el cloruro de tetrazolio (0.5-1%) e incubar en oscuridad un mínimo de 2 horas.
5. Contar las semillas que muestran tinción en el embrión y calcular su porcentaje respecto del total.

En la siguiente figura (Figura 2) se muestra polen (A) y semillas (B) tras la tinción con cloruro de tetrazolio. Como puede observarse muchos granos de polen han quedado sin teñir mientras que otros muestran un color violeta intenso. En el caso de las semillas utilizadas todas han mostrado coloración por lo que su viabilidad es buena, como era esperable al tratarse de semillas comerciales.

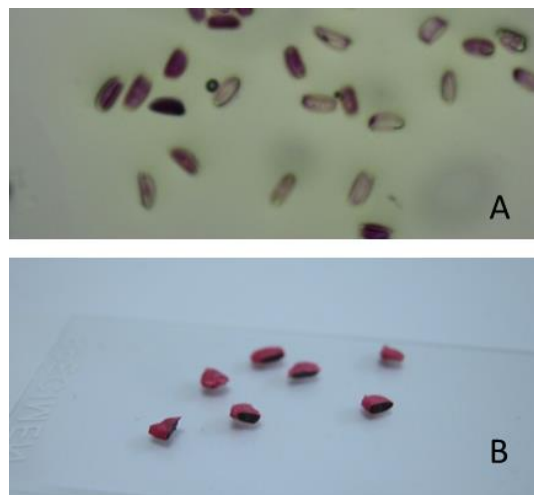


Figura 2. A. Polen de *Tandescantia pallida* B. Semillas comerciales de tomate

5 Cierre

En los apartados de introducción y desarrollo se ha explicado por qué es importante determinar la viabilidad de polen y semillas y cómo se realiza utilizando el cloruro de tetrazolio, que en la mayoría de las especies es un buen indicador ya que la correlación de la viabilidad que se obtiene y la posterior germinación es alta.

Repasa lo que acabas de aprender, respondiendo a la siguiente pregunta:

Imagina que eres un mejorador que estas realizando cruzamientos entre una especie silvestre y una cultivada para la introducción en ésta de un gen de resistencia y el cruzamiento no te funciona. Realizas una tinción de polen de la especie silvestre que estas empleando como parental masculino y observas:

- a) viabilidad muy reducida
- b) viabilidad normal
- c) viabilidad reducida cuando analizas el polen en el momento en que se abre la flor masculina y viabilidad normal si lo analizas al día siguiente.

¿Cuáles piensas que serían las principales causas del fallo en el cruzamiento en cada caso y qué medidas tomarías para llevar a cabo con éxito tu programa?

6 Bibliografía

OFFORD CA, MCKENSY ML, CUNEO PV. 2004. Critical review of threatened species collections in the New South Wales Seedbank: implications for ex situ conservation of biodiversity. *Pacific Conservation Biology* 10:221–236

RAO K.N., HANSON J., DULLOO M.E., GOSH K., NOWELL D., LARINDE M. 2007. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para bancos de germoplasma nº 8. Biodiversity international, Roma, Italia

STONE J.L., THOMSON J.D., DENT-ACOSTA S.J. 1995. Assessment of pollen viability in Hang-pollination experiments: A Review. *American Journal of Botany*, 82: 1186-1197

GODEFROID S., VAN DE VYVER A., VANDERBORGHT T. 2010. Germination capacity and viability of threatened species collections in seed banks *Biodiversity Conservation* 19:1365–1383