

Germinación *in vitro* de polen de girasol

Nazario MUÑOZ-FERNÁNDEZ y José M' DURAN-ALTISENT

Departamento de Producción Vegetal: Fitotecnia. Universidad Politécnica de Madrid.
28040 Madrid (Spain)

Resumen

La siembra del polen sobre un papel de celofán embebido con medio líquido ha dado porcentajes de germinación más altos y más regulares que otras técnicas ensayadas. El contenido en sacarosa y la presión osmótica del medio influyen de forma importante. El polen de girasol germina mejor en medios con altas concentraciones de sacarosa (400 g L⁻¹). El boro no es necesario para la germinación, pero la adición de ácido bórico al medio (30 mg L⁻¹) incrementa el porcentaje de germinación y reduce el número de tubos polínicos estallados.

Introducción

La germinación del polen en un medio artificial ha sido estudiada en profundidad en numerosas especies (VASIL 1987), pero los estudios con polen de girasol son muy escasos. La germinación del polen *in vitro* ha sido empleado por algunos autores para estudiar el efecto de diversos factores sobre la viabilidad del polen de girasol (ANDREICA y SPÁRCHEZ 1990; SEGALA *et al.* 1980; VRÂNCEANU *et al.* 1978), pero el único trabajo que conocemos en el cual se estudia el efecto de las condiciones de cultivo y composición del medio sobre la germinación del polen de girasol es la publicación de BOBEK y KOVACIK (1972).

En experiencias preliminares llevadas a cabo se observó una germinación muy baja del polen en numerosos medios de cultivo descritos en la bibliografía tanto para girasol como para otras especies. Para intentar mejorar la germinación *in vitro* se estudió el efecto de la técnica de cultivo y del contenido en sacarosa y ácido bórico del medio, por ser estos los dos componentes del medio que más influencia suelen tener sobre la germinación del polen.

Material y Métodos

El polen, procedente de plantas de girasol cultivadas al aire libre de los híbridos Enano (Koipesol Semillas), Toledo 2 (Arlesa Semillas) y Topflor (Agrar Semillas), fue recogido entre 9 y 11 h (a.m.) de flores recién abiertas y conservado en oscuridad y a temperatura ambiente hasta su empleo.

El polen, tras ser tamizado a través de un filtro de 200 μm e hidratado durante 30 minutos en una atmósfera saturada de humedad en oscuridad y a temperatura ambiente fue distribuido de forma homogénea sobre el medio de cultivo. La germinación se llevó a cabo en placas Petri ($\phi = 5$ cm) colocadas en el interior de una caja de plástico transparente hermética sobre

un papel de filtro humedecido con agua, a 25 °C y con iluminación artificial. El tiempo transcurrido entre la recolección del polen y su entrada en contacto con el medio de germinación no fue superior a 3 horas.

A las 24 horas de iniciarse la germinación se contaron los granos de polen germinados (longitud del tubo polínico superior al diámetro del grano del polen) con tubo polínico íntegro y con tubo polínico estallado. En cada tratamiento se contabilizaron 300 granos de polen y cada ensayo se repitió 3 veces. Se optó por repetir cada ensayo varias veces debido a la considerable variación entre ensayos observada en las experiencias preliminares. Los datos presentados corresponden a los valores medios de los tres ensayos (900 granos/tratamiento). Para conocer las diferencias entre poblaciones y realizar comparaciones múltiples se empleó el test G según lo indicado por SOKAL y ROHLF (1969) para poblaciones binomiales.

Resultados y Discusión

Las técnicas de cultivo estudiadas fueron: 1, medio sólido en placa Petri; 2, gota suspendida; 3, medio líquido en tubo estático de 30 mL; 4, medio líquido en tubo volteado 12 veces por minuto; 5, medio líquido con papel de celofán (técnica descrita por ALEXANDER y GANESHAN en 1989). Los resultados obtenidos están recogidos en la Tabla 1.

El porcentaje de granos de polen germinados en un medio líquidos sin agitación (técnica 3) fue menor que sobre un medio sólido (técnica 1), pero en el medio líquido se observó un mayor número de granos de polen con el tubo polínico sin explotar. La agitación del medio líquido no parece tener consecuencias positivas sobre la germinación, lo cual contrasta con las observaciones de EENINK (1983), quién obtuvo un importante incremento de la germinación del polen de lechuga al oxigenar el medio de germinación por agitación.

El porcentaje de polen germinado sobre un papel de celofán con medio líquido fue mas del doble del porcentaje obtenido por cualquiera de las otras técnicas ensayadas (Tabla 1). Con ésta técnica no solo se incrementó el porcentaje de germinación medio, sino que se logró hacer germinar el polen del cv. Enano, el cual no fue capaz de germinar de forma reproducible con las otras técnicas de cultivo. Esto puede ser debido a que el papel de celofán evita la axfisia del grano por hundimiento en el medio líquido, facilita la aireación y mejora la hidratación del grano de polen (ALEXANDER y GANESHAN 1989).

El contenido en sacarosa influyó de forma decisiva sobre la germinación del polen de girasol. Para concentraciones inferiores a 400 g L⁻¹ el porcentaje de granos de polen germinados aumenta a medida que se incrementa el contenido en sacarosa del medio, pero para concentraciones superiores a éste valor la germinación se vió fuertemente reducida (Fig. 2A). La sacarosa tiene además un efecto protector del tubo polínico, incrementándose el porcentaje de tubos polínicos no estallados al aumentar el contenido en sacarosa (Fig. 2B).

La concentración de sacarosa con la que se obtiene un mayor porcentaje de granos de polen germinados con tubo polínico no estallado parece situarse alrededor de 400 g L⁻¹. La mayor germinación del polen en medios con elevado contenido en sacarosa es característico del polen tricelular. Valores similares han sido publicados en la familia de las compuestas (*Asteraceae*): en lechuga se precisa 450 g L⁻¹ (EENINK 1983) y en girasol 350 g L⁻¹ (BOBEK y KOVACIK 1972) de sacarosa para obtener la máxima germinación.

Aceptando la suposición de que el manitol no es metabolizado por los granos de polen, y que su principal efecto sería modificar la presión osmótica del medio de cultivo, de la Tabla 2 puede deducirse que el efecto de la sacarosa sobre la germinación del polen es debido en parte a la modificación de la presión osmótica del medio. El polen de girasol tiene una germinación óptima entre -20 y -30 bar, siendo significativamente menor la germinación a -10 y a -40 bar, independientemente del contenido en manitol y sacarosa del medio.

El polen de girasol no requiere boro para germinar, pero la presencia de éste elemento en el medio de cultivo aumenta el porcentaje de granos germinados (Fig. 3), obteniéndose la máxima germinación con 30 mg L⁻¹ de ácido bórico. Al igual que sucede con la sacarosa, al incrementarse el contenido en ácido bórico del medio se reduce el número de tubos polínicos explotados. El porcentaje de tubos polínicos no estallados pasa de menos del 50 % en un medio sin boro a más del 80 % en un medio con 30 mg L⁻¹ de ácido bórico. Posiblemente esto sea debido al papel que juega el boro en la regulación de la absorción de agua y en la acumulación de carbohidratos y proteínas en las paredes celulares (VASIL 1987).

De acuerdo con lo descrito en la bibliografía (ANDREICA y SPÁRCHEZ 1990; SEGALA *et al.* 1980; BOBEK y KOVACIK 1972) y con los resultados obtenidos por nosotros se puede afirmar que la germinación *in vitro* del polen de girasol muestra las características que son comunes a la mayoría de las especies con polen tritelular: un bajo porcentaje de germinación, rara vez superando el 50 %, y un crecimiento del tubo polínico muy inferior al obtenido en el pistilo.

La germinación del grano del polen en condiciones naturales tiene lugar sobre la superficie del estigma y en cambio el crecimiento del tubo polínico se produce a través de los tejidos del estilo. Las condiciones en que suceden estos dos fenómenos son distintas, y por tanto parece lógico pensar que los requerimientos puedan ser también distintos. Es posible que la determinación de los requerimientos del crecimiento del tubo polínico de girasol *in vitro* deba ser abordada con posterioridad, pero de forma independiente, al estudio de la emisión del tubo polínico.

Conclusiones

1. La germinación del polen de girasol sobre papel de celofán embebido de medio líquido es superior y más regular que la germinación de polen en contacto directo con el medio líquido o sólido.
2. La composición del medio de germinación con el que se obtuvo la mejor germinación sobre papel de celofán fue: 400 g L⁻¹ de sacarosa, 30 mg L⁻¹ de ácido bórico y 600 mg L⁻¹ de nitrato cálcico.
3. El polen de girasol tiene un comportamiento similar al de otros tipos de polen tritelular: elevadas necesidades de sacarosa en el medio de germinación, bajo porcentaje de germinación y escaso crecimiento del tubo polínico *in vitro*.

Bibliografia

- ANDREICA, A.; SPÂRCHEZ, C. (1990). Germinarea *in vitro* a polenului de floarea soarelui pastrat in conditii de temperatura scazuta. *Studii si Cercetari de Biologie. Seria Biologie Vegetala*, 42: 51-53.
- ALEXANDER, M.; GANESHAN, S. (1989). An improved cellophane method for *in vitro* germination of recalcitrant pollen. *Stain Technology*, 64: 225-227.
- BOBEK, J.; KOVACK, A. (1972). Pollen germination in sunflower (*Helianthus annuus L.*) *in vitro*. *Genetika A Slechteni*, 8: 243-250.
- EENINK, A. (1983). Preliminary results of research on storage and *in vitro* germination of lettuce pollen as an aid in lettuce breeding. *Euphytica*, 32: 521-526.
- SEGALA, A.; SEGALA, M.; PIQUEMAL, G. (1980). Recherches en vue d'améliorer le degré d'autogamie des cultivars de tournesol (*Helianthus annuus L.*): II. Étude de quelques caractères facilitant l'accès du pollen aux papilles du stigmate. *Annales Amélioration des Plantes*, 30: 161-174.
- SOKAL, R.; ROHLF, F. (1969). *Biometry*. W.H. Freeman, New York.
- VASIL, I. (1987). Physiology and culture of pollen. *Review of Cytology* 107. G.H. Bourne; K.W. Jeonand; M. Friedlander (eds.), *Pollen: Cytology and Development*. Academic Press, New York, pp. 127-171.
- VRÂNCEANU, A.; STOENESCU, F.; SCARLAT, A. (1978). The influence of different genetic and environmental factors on pollen self- compatibility in sunflower. 8th. *International Sunflower Conference*, Minneapolis.

Tabla 1. Influencia de la técnica de cultivo sobre el porcentaje de granos de polen de girasol germinados (G). Se indican los granos de polen computados (N°) en cada tratamiento. Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($p = 0.05$). Los porcentajes son valores medios de los cv. Enano, Toledo 2 y Topflor.

Técnica de cultivo	Medio	N°	G (%)
Placa Petri	Sólido	2600	12.5 ^b
Gota suspendida	Líquido	2600	0.1 ^d
Tubo vidrio 30 mL estático	Líquido	2700	11.4 ^b
Tubo vidrio 30 mL volteado	Líquido	2700	6.6 ^c
Papel de celofán	Líquido	2700	27.0 ^a

Medio de cultivo: 400 g L⁻¹ de sacarosa, 2 m g L⁻¹ de ácido bórico y 600 mg L⁻¹ de nitrato cálcico; 10 g L⁻¹ de agar en el medio sólido.

Tabla 2. Influencia del contenido en sacarosa y presión osmótica del medio sobre el porcentaje de granos de polen de girasol (cv. Topflor) germinados. Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($p = 0.05$).

Sacarosa (g L ⁻¹)	Presión Osmótica (bar)			
	-10	-20	-30	-40
128	19 ^d	<u>36</u> ^{ab}	<u>31</u> ^{bc}	
256		43 ^a	<u>27</u> ^c	1 ^e
385			43 ^a	<u>0</u> ^e
513				1 ^e

Medio de cultivo: sacarosa, 2 m g L⁻¹ de ácido bórico y 600 mg L⁻¹ de nitrato cálcico. Los valores subrayados corresponden a medios que contienen la cantidad de manitol que sea necesaria para alcanzar la presión osmótica indicada.

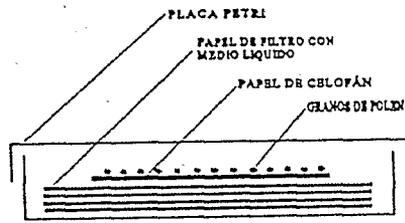


Fig. 1.: Germinación del polen sobre papel de celofán según la técnica descrita ALEXANDER y GANESHAN (1989).

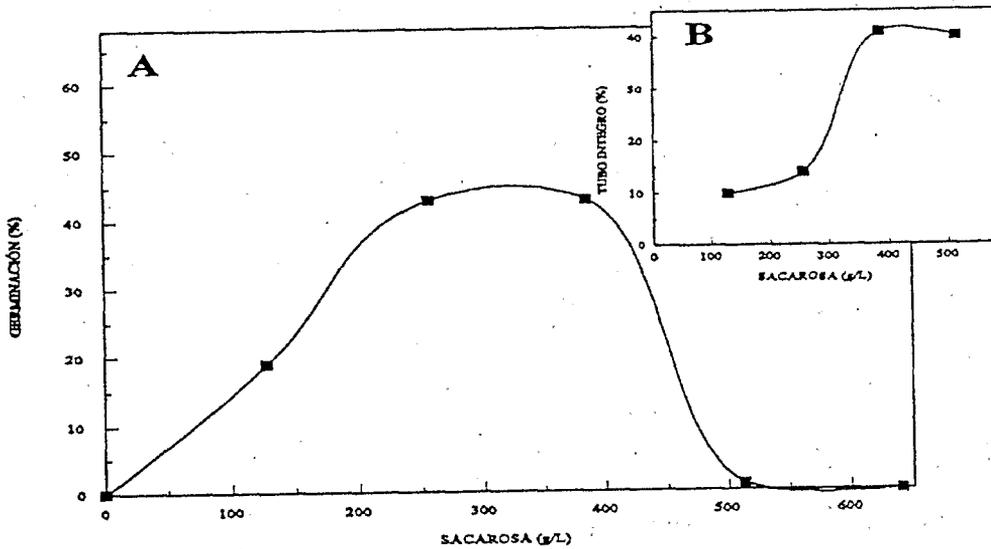


Fig. 2.: Influencia del contenido en sacarosa del medio en la germinación del polen de girasol (cv. Topflor): A, Porcentaje de polen germinado; B, porcentaje de tubos polínicos no estallados del total de tubos polínicos emitidos. Medio de cultivo: sacarosa, 2 mg L⁻¹ de ácido bórico y 600 mg L⁻¹ de nitrato cálcico

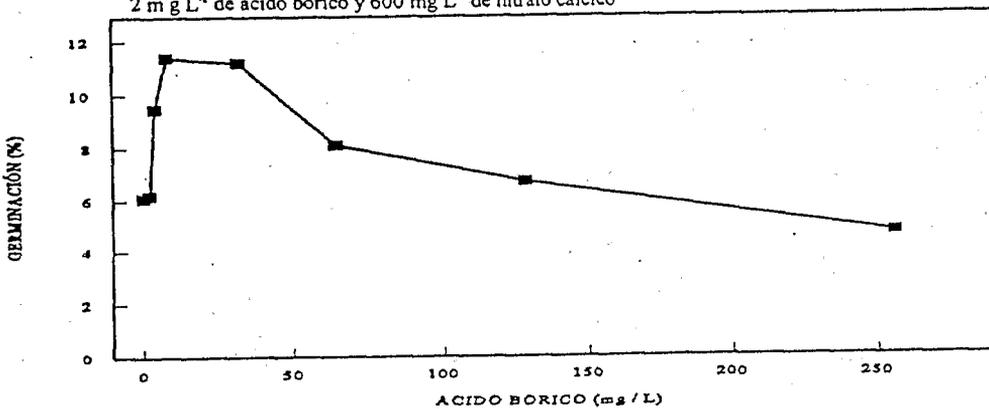


Fig. 3.: Influencia del contenido en ácido bórico del medio en la germinación del polen de girasol. Los porcentajes son valores medios de los cv. Toledo 2 y Topflor. Medio de germinación: 400 g L⁻¹ de sacarosa, ácido bórico y 600 mg L⁻¹ de nitrato cálcico.