

## PASO DE MATERIAL A TRAVÉS DE LA PARED DEL GRANO DE POLLEN DE TOMATE (*LYCOPERSICUM ESCULENTUM*) EN CULTIVO *IN VITRO*

M.B. CARRETERO & M.I. RODRIGUEZ-GARCÍA

Dpto. Bioquímica Celular y Molecular en Plantas. Estación Experimental del Zaidín.  
Profesor Albareda 1, 18008 Granada.

Recibido: octubre 1993.

Palabras Clave: Polen, *Lycopersicum Esculentum*, Nitrato de lantano. Vías de paso.

Key words: Pollen, *Lycopersicum Esculentum*, *Lanthanum nitrate*, *Path ways*.

### RESUMEN

En este trabajo se estudia el posible paso de material a través de la pared del polen de tomate. Se ha utilizado nitrato de lantano como elemento traza, añadido a una solución fijadora o bien medio de cultivo en el que se mantuvieron los granos previamente a su fijación. Nuestros resultados muestran paso de material, existiendo una relación entre el grado de maduración del grano y las vías de paso encontradas. Es importante destacar que la incorporación de lantano antes o simultáneamente a la fijación no parece influir en el paso del mismo hacia el citoplasma.

### SUMMARY

We studied the passage of material through the tomato pollen grain wall. Lanthanum nitrate was used as trace element and it was added to a fixative solution or a culture medium, in which pollen grains were cultured before the fixation. We observed the passage of material depends of stage of development of the pollen grain; the passage is lower when the pollen grain is more nature. It is important to note that the trace element incorporation before or simultaneously with the fixation have not influence in lanthanum passage to the cytoplasm.

### INTRODUCCIÓN

El grano de polen es una estructura de gran importancia dentro del ciclo de vida de plantas superiores. De todos es conocido que el grano de polen se encuentra rodeado de una pared cuya naturaleza esporopolenínica ha sido considerada como una barrera que lo aísla del medio externo.

Sin embargo el grano de polen es una estructura dinámica que debe mantener relación con su entorno durante su desarrollo. Existen trabajos previos en los que

se demuestra, como el nitrato de lantano, utilizado como elemento traza, puede penetrar hacia el interior del grano de polen a través de su exina (ROWLEY & FLYNN, 1971; ROWLEY, 1975; FERNANDEZ & RODRIGUEZ-GARCÍA, 1990). Otros marcadores utilizados como son hierro coloidal (ROWLEY & DUMBAR, 1970), peroxidasa exógena y ferritina (ROWLEY, 1975) también han demostrado que estos elementos pueden llegar hasta el citoplasma del grano, para lo cual deben atravesar la pared del mismo. Se han descrito varias vías de paso a través de la pared del polen: a) del material de la exina (ROWLEY & FLYNN, 1971); b) de microcanales existentes en la exina (ROWLEY *et al*, 1987; ABADIE *et al*, 1986 y 1988) c) por regiones aperturales (ROWLEY & DUMBAR, 1970). Además el lugar o lugares de paso pueden variar según el estadio de desarrollo del grano de polen (FERNANDEZ & RODRIGUEZ-GARCÍA, 1990).

El objeto de este trabajo es estudiar en el polen del tomate (*Lycopersicum esculentum*) el comportamiento de su pared con respecto al paso del lantano tanto cuando éste se encuentra dentro de la antera como cuando ya está libre. Para ello utilizamos dos métodos diferentes: a) fijación de las anteras en soluciones de glutaraldehído y osmio a las cuales se le añade el elemento traza; b) incorporando el elemento traza en un medio de cultivo en el que se mantiene el polen durante un tiempo determinado para posteriormente ser fijado.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se fijaron anteras de tomate (*Lycopersicum esculentum*) de tamaño comprendido entre 5-8 mm de longitud de dos formas diferentes: 1) serie control siguiendo el proceso convencional de preparación de muestras para microscopía electrónica (FERNÁNDEZ & RODRÍGUEZ-GARCÍA, 1988); 2) serie problema en la que la fijación se realizó en soluciones fijadoras de glutaraldehído y osmio a las que se les añadió 1% de nitrato de lantano (FERNÁNDEZ & RODRÍGUEZ-GARCÍA, 1990). La deshidratación se llevó a cabo en serie gradual de etanol y la inclusión de las muestras fue en resina EPON.

Para la realización del cultivo se aislaron granos de polen maduros por aplastamiento de anteras. Una vez aislado se mantuvieron durante 2-4 horas en un medio de cultivo MR26, según indican BENITO MORENO *et al* (1988), al cual se le había añadido 1% de nitrato de lantano. Posteriormente estos granos de polen fueron fijados por el mismo procedimiento que la serie control.

Las secciones ultrafinas (70-80 nm) fueron realizadas con un ultramicrotomo Reichert Jung Ultracult-E. Sólo las secciones control fueron contrastadas con acetato de uranio y citrato de plomo (REYNOLD, 1963). Las observaciones fueron realizadas en Microscopio Electrónico de Transmisión Zeiss 10C a un voltaje de 60kV.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los experimentos realizados utilizando como elemento marcador el nitrato de lantano, se ha observado que la pared del grano de polen de tomate permite la entrada de material procedente del exterior. Estos resultados vienen a confirmar los anteriormente publicados en *Olea europaea* (FERNÁNDEZ & RODRÍGUEZ-GARCÍA, 1990). Es bien conocido que el polen bicelular medio y maduro consta de una pared bien desarrollada, constituida por exina e intina. Todas las muestras de tomate, excepto las muestras control, presentan trazas de lantano en forma de un precipitado denso a los electrones (Fig. 1, 2, 4). El lugar de acumulación de dicho precipitado varía según el estadio de desarrollo del grano de polen.

En el polen bicelular medio, es posible localizar precipitado de lantano tanto a nivel de pared como de citoplasma (Fig. 2). En la pared de las regiones interaperturales (Fig. 2) el precipitado fino de lantano se encuentra esparcido de forma homogénea entremezclado con el material que constituya la exina. Los microcanales, que atraviesan el tectum y permiten la comunicación entre el infratectum y el medio exterior, también se encuentran llenos de precipitado así como el infratectum. La intina de las regiones interaperturales también tiene una apariencia electrón densa como consecuencia de la acumulación del precipitado (Fig. 2). El citoplasma contiene pequeñas vesículas llenas de material electrodenso, las cuales se localizan cercanas o incluso en contacto con el plasmalema (Fig. 2). La membrana plasmática es impermeable al nitrato de lantano (REVEL & CARNOVSKY, 1967) lo cual ha llevado a sugerir que el origen de estas vesículas llenas de precipitado sea a partir de invaginaciones del plasmalema producidas como consecuencia de procesos de pinocitosis (ROWLEY *et al*, 1970; ROWLEY & DUMBAR, 1970; ROWLEY & FLYNN, 1971). En las regiones aperturales del polen medio, los depósitos de lantano se acumulan a nivel de las tubulaciones del oncus de la intina estando la matriz de la intina apertural libre de precipitado (Fig. 1).

En el polen maduro los depósitos de lantano localizados en la pared de las regiones interaperturales se acumulan en los mismos lugares descritos en el polen medio (microcanales, infratectun e intina). La diferencia más notable entre ambos estadios de desarrollo, es la completa inexistencia de marcado a nivel de las regiones aperturales del polen maduro, y consecuentemente la cantidad de precipitado apreciada es menor. El lantano se acumula especialmente en la intina, a ambos lados de la región apertural. Al igual que en el estadio anterior es posible encontrar vesículas dispersas por el citoplasma que contienen material electrodenso. Regiones aperturales, microcanales y material de la exina ya habían sido previamente descritas como posibles vías de comunicación entre el esporofito y el gametofito (RAWLEY & FLYNN, 1971).

La finalidad de añadir el nitrato de lantano al medio de cultivo fue la de intentar que las condiciones a las que era sometido el grano de polen fueran más parecidas a las condiciones fisiológicas que cuando el lantano era añadido a la solución fijadora y como consecuencia sometidas a un stress lento, ya que la fijación de la célula mediante procedimientos químicos es paulatina. Hay que tener en cuenta que la incorporación del lantano al medio también puede producir

efectos tóxicos en el grano, sin embargo, la baja concentración del elemento traza y la corta duración del cultivo nos hacen pensar que estos efectos podrían ser mínimos como lo demuestra el hecho de que la organización celular del grano no se ve afectada. La distribución de los depósitos de nitrato de lantano fue similar tanto en el polen cultivado en medio que contiene el elemento traza (Fig. 3, 4) como en el polen fijado en solución con lantano (Fig. 1, 2). Las regiones aperturales del polen maduro, en ambos casos, se encontraban libres de precipitado (Fig. 3), mientras que las regiones interaperturales muestran el precipitado localizado a nivel del infratectum, microcanales y entre el material de la exina (Fig. 4). En conclusión, podemos afirmar que las vías de paso por las cuales penetra el elemento traza hacia el interior del polen no se ven afectadas por la metodología empleada, ya que distintos procedimientos conducen a idénticos resultados. También se ha confirmado, que en el polen del tomate, las vías de paso disminuyen con el grado de madurez del grano, lo cual ya había sido anteriormente descrito para el polen del olivo (FERNÁNDEZ & RODRÍGUEZ-GARCÍA, 1990). Este hecho tiene una explicación razonable si tenemos en cuenta que las necesidades fisiológicas que tiene el grano de polen varían durante su desarrollo. Cuando el grano de polen ya está desarrollado y maduro es autosuficiente por contener gran cantidad de sustancias de reserva, por lo que la necesidad de aporte de material de origen externo es mínima.

---

**Figuras 1 y 2.-** Muestras fijadas en solución de glutaral-dehído más postfijación con osmio ambas con 1% de nitrato de lantano.

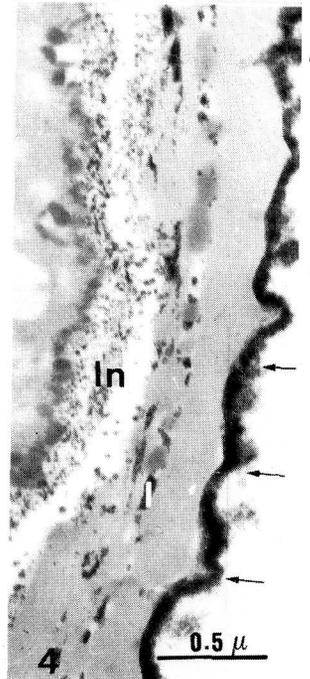
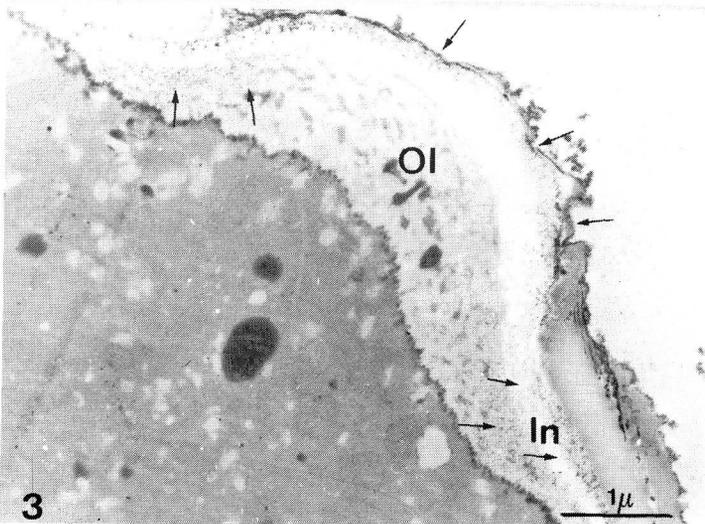
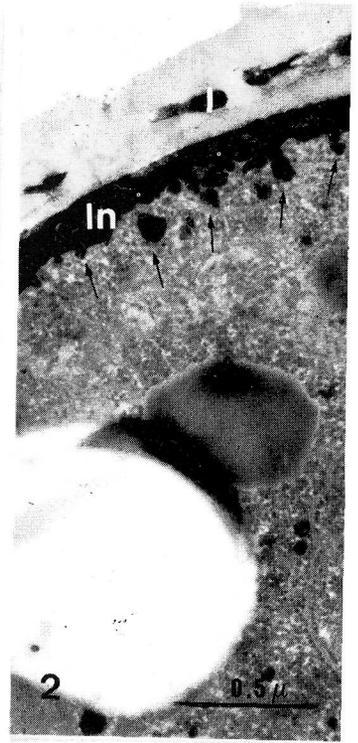
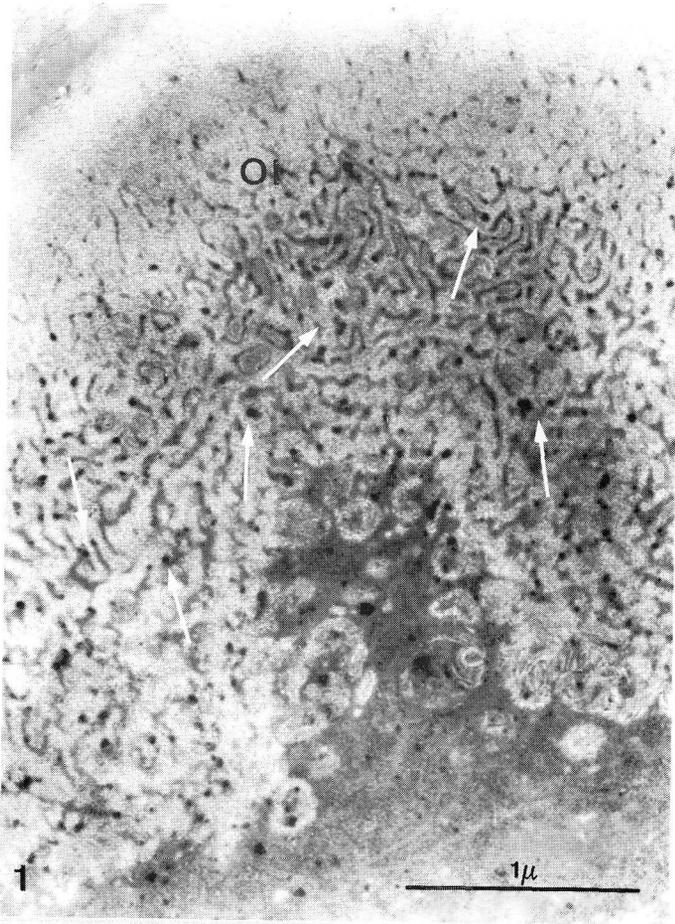
**Figuras 3 y 4 -** Muestras cultivadas *in vitro* en medio MR26 con 1% de nitrato de lantano.

**Figura 1 -** Región apertural de polen medio. obsérvese precipitado denso (flechas) localizado a nivel de las tubulaciones del oncus de la intina (OI).

**Figura 2 -** Región interapertural de polen medio. Infratectum (I) e intina (In) con gran cantidad de precipitado. Obsérvese la presencia de vesículas densas en las cercanías o en contacto con el plasmalema (flechas).

**Figura 3 -** Región apertural de polen maduro. El oncus de la intina (OI) se encuentra libre de precipitado. Las flechas señalan depósitos localizados sobre la superficie de la apertura y en la intina (In) a ambos lados de la región apertural (flechas).

**Figura 4 -** Región interapertural de polen maduro. El precipitado se observa en la superficie externa de la pared del grano (flechas); infratectum (I) e intina (In).



## REFERENCIAS

- ABADIE, M., E. BURY & M. HIDEAUX, 1986.- Dynamique des glycoprotéines et rôle des microcanaux au cours du développement des microspores et du pollen de *Dactylis glomerata* L. Etude ultrastructurale. French Swedish *Symposium on pollens of Loocfoot (Dactylis glomerata L.) and their Environment*. Stockholm (September 1986) Report No. 51: 33-39.
- ABADIE, M., M. HIDEAUX & E. BURY, 1988.- Démasquage des substances d'impregnation et de transfert de nature glycoprotéique et polisaccharidique au niveau des parois polliniques de *Dactylis glomerata* L. *Étude Botanique* 13è sèrie 9: 181-201.
- BENITO MORENO, R.M., F. MACKE, A. ALWEN & E. HEBERLE-BORS, 1988.- In situ seed production after pollination with in vitro matured, isolated pollen. *Planta* 176: 145-148.
- FERNÁNDEZ, M. & M.I. RODRÍGUEZ-GARCÍA, 1988.- Pollen wall development in *Olea europaea*. *New Phytol.*, 108: 91-99.
- FERNANDEZ, M.C. & M.I. RODRÍGUEZ-GARCÍA, 1990.- Passage of lanthanum through the pollen wall of *Olea europaea* L. during development. *Plant Cell Reports* 8: 667-671.
- LEONARD, R.T., G. NAGAHASHI & W.W. THOMSOM, 1975.- Effect of lanthanum on ion absorption in corn roots. *Plant Physiol.*, 55: 542-546.
- VERTON, J., 1969.- A fibrillar intercellular material between reaggregating embryonic chick cells. *J. Cell Biol.*, 40: 136-143.
- TAYLOR, A.R.D. & J.S. HALL, 1978.- Fine structure and cytochemical properties of tobacco leave protoplasts and comparison with the source tissue. *Protoplasma* 96: 113-126.
- REVEL, J.P. & M.J. KARNOWSKY, 1967.- Hexagonal array of subunits in the intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell Biol.* 33: 7-12.
- REYNOLD, E.S., 1963.- The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell biol.*, 17: 208-212.
- ROWLEY, J.R., 1975.- the permeability of the pollen grain wall to exogenous protein tracers. *J. Ultrastruc. Research* 50:394-395.
- ROWLEY, J.R. & A. DUMBAR, 1970.- Transfer of colloidal iron from sporophyte to gametophyte. *Pollen et Spores* 12: 305-328.
- ROWLEY, J.R. & J.J. FLYNN, 1971.- Migration of lanthanum through the pollen wall. *Cytobiol.* 3: 1-12.
- ROWLEY, J.R., J.J.FLYNN, A. DUNBAR & S. NILSON, 1970.- Influence of pinocytosis and membrane specializations on pollen wall form. *Grana* 10: 3-12.
- ROWLEY, J.R., GAMAL EL-GHAZALY & J.S. ROWLEY, 1987.- Microchannels in the pollen grain exine. *Palynology* 11:1-21.