

# Bromuro de tetrazolio y viabilidad del polen de remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.)

por J. M. LASA

Estación Experimental de Aula Dei, Zaragoza

Recibido el 11 - III - 1975

## A B S T R A C T

J. M. LASA, 1975. — Tetrazolium bromide and sugar beet pollen viability (*Beta vulgaris* L.) *An. Aula Dei*, **13** (1/2): 111-121.

With the common morphological stains, now in use, no good results can be obtained in tests of viability for stored pollen of sugar beet.

A «wet chamber» procedure is described for tests with tetrazolium bromide. The results indicate the usefulness of the technique for long time stored samples of sugar beet pollen.

## INTRODUCCION

En los trabajos de mejora vegetal, en general, y en particular en el caso de la remolacha azucarera, es de gran interés el conocimiento de la viabilidad de distintos tipos de polen.

En unos casos el problema es únicamente el conocimiento de la citada viabilidad en polen fresco, en otros, en cambio, se trata de conocer la capacidad del polen que ha sido conservado durante ciertos períodos de tiempo, bien por no haber coincidido las floraciones, o bien por el gran interés del material.

Dos tipos de tinciones han sido empleadas con este fin. Las primeras se basan en una buena configuración morfológica del grano de polen, tales como la del iodo-ioduro potásico, el aceto-carmin y

el lactofenol azul algodón. Las segundas se basan en cierta actividad respiratoria del citoplasma.

Las tinciones del primer grupo, de carácter morfológico, no ofrecen datos rales sobre la vitalidad de los granos de polen en estudio, principalmente en el caso de polen conservado, según ha quedado demostrado por diversos autores.

KUHN y JERCHEL, en 1941, presentaron los primeros resultados sobre indicadores de vitalidad, con el uso del 2,3,5-trifenil tetrazolio, como tinción de bacterias y levaduras, tal como vita VIEITEZ (1952).

Según el mismo autor, LAKON comenzó en 1942 a emplear esta propiedad de las sales de tetrazolio, en su método topográfico de determinación de la capacidad germinativa de las semillas en función de la coloración roja observada en los embriones.

Ya trabajando con polen, VIEITEZ (1952), expuso sus primeros resultados en maíz con el cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio. Se basaba en que en general, las soluciones neutras de tetrazolio, incoloras, son reducidas, tomando color rojo, debido a la formación de trifenil formazan reducido, en presencia de ciertos sistemas enzimáticos contenidos en las células vivas.

Continuando en esta línea de tinciones de vitalidad en polen, KING (1960) empleó la oxidación de benzidina. HECKER (1963, 1966) realizó un estudio bastante completo sobre las diferentes sales de tetrazolio y su empleo en la determinación de la viabilidad del polen de remolacha azucarera. HAUSER y MORRISON (1964) resaltan nuevamente el interés de encontrar un sistema citoquímico para determinar la capacidad respiratoria del grano de polen, como medio para comprobar su viabilidad. ASLAM (1964) y MANTHRIRITNA y HAYWARD (1973) presentan algunos resultados parciales sobre el problema.

Pero en resumen nos encontramos con que no existe una técnica realmente apropiada para determinar la viabilidad del grano de polen, ya que observando los resultados más esperanzadores de HECKER (1963), el bromuro de tetrazolio muestra un gran defecto en el caso de polen conservado. Esta es la razón que nos ha inducido a profundizar sobre el tema en un nuevo intento de determinar la viabilidad del polen con técnicas sencillas.

## MATERIAL Y METODOS

Las plantas productoras de polen son cultivadas en invernadero bajo iluminación continua. Las muestras se toman a partir de la última flor abierta, la próxima cerrada y en algunos casos por simple agitación.

Se emplea, asimismo, polen conservado en tubos al vacío, a  $-18^{\circ}\text{C}$ , por períodos de un mes y un año.

Algunas muestras de polen se tratan en estufa a 80, 90 y  $110^{\circ}\text{C}$ , por períodos entre 15 minutos y 4 horas.

Las tres tinciones empleadas, son:

1. Azul algodón-lactofenol, ampliamente descrito en la bibliografía y que actúa como representante de las tinciones de carácter morfológico. LCB.
2. Cloruro de tetrazolio: Cloruro de 2-(p-yodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio al 0,5 % con conteo a los 60-100 minutos.
3. Bromuro de tetrazolio: Bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazolil-1-2)-2,5-difenil tetrazolio al 0,5 % con conteo a los 20 minutos. MTT.

En los experimentos iniciales del trabajo, encontramos que los resultados obtenidos empleando el cloruro de tetrazolio, son muy similares a los que presentan las tinciones morfológicas, por lo que posteriormente concentramos nuestra atención sobre el bromuro de tetrazolio (MTT).

Da buenos resultados una modificación de la técnica, basada en un pretratamiento del polen en cámara húmeda, preparada en placa de Petri con papel de filtro humedecido, en la que se sitúa el porta con el polen. La tinción se hace inmediatamente después de sacar el porta de la cámara húmeda. La duración del tratamiento húmedo se hace variar según la edad del polen entre 30 minutos para polen reciente y 90 minutos para polen conservado durante un año.

En los casos en que se realizan germinaciones en medio de cultivo se emplea la técnica descrita por IWANAMI y BREWBAKER (1970). Dada la irregularidad de las germinaciones, después de la tinción con LCB, nos limitamos a estimar si se presenta en forma amplia, con tubos germinativos mayores de dos veces el diámetro del grano polínico.

## RESULTADOS

Sin modificar la técnica de HECKER (1963), los resultados obtenidos, según el tipo de polen empleado, han sido:

### a) POLEN FRESCO

#### 1. *De flor cerrada*

Resultados muy similares entre el LCB y el MTT, el promedio que se obtiene es de 97,3 y 88,6 %, respectivamente, con diferencias, según la planta, entre 21 % en el caso extremo y 0,5 % en el más próximo.

#### 2. *De flor abierta*

Resultados totalmente confusos, desde casos con tinción similar en ambos productos, a otros con prácticamente nula tinción del MTT y buena del LCB, no pudiendo justificarse por diferencias entre plantas, ya que dentro de la misma se presentan grandes variaciones.

#### 3. *De flor cerrada, rompiendo la antera sobre el porta, manteniéndolo unos minutos al aire, antes de su tinción.*

El porcentaje de polen teñido por MTT decrece rápidamente según el tiempo de exposición al aire, variando los resultados grandemente de planta a planta.

	<i>MTT</i>	<i>LCB</i>
0 m.	89,5	92,3
10 m.	39,0	—
25 m.	7,0	92,7

En otras plantas la disminución es mucho más lenta, encontrándose a los 40 minutos. tinciones del 38 %.

### b) POLEN CONSERVADO

#### 1. *A temperatura de habitación*

La disminución en porcentaje de polen teñido es muy rápida, variando, asimismo, entre plantas, no habiéndose podido encontrar tinción en polen conservado más de 18 horas.

2. *Durante un mes a  $-18^{\circ}\text{C}$  y en vacío*

Tinción nula.

3. *Durante un año a  $-18^{\circ}\text{C}$  y en vacío*

Tinción nula.

c) POLEN TRATADO

Tras el tratamiento térmico de 30 minutos a  $110^{\circ}\text{C}$ , o de 15 minutos a  $80$  y  $110^{\circ}\text{C}$  la tinción es nula.

En vista de estos resultados, que no pueden explicarse únicamente en razón a la viabilidad del polen, ya que polen claramente viable, por pruebas que luego comentaremos, no presenta tinción, intentamos eliminar aquel factor o factores causantes de estos resultados.

Dado que el problema aparece al estar el polen en contacto con el aire, se comienza a emplear la técnica descrita anteriormente, técnica húmeda, obteniéndose los siguientes resultados.

a) POLEN FRESCO

En el caso de flores abiertas que es el problemático con la técnica seca, tras el tratamiento en cámara húmeda, se obtienen muy similares resultados a los de flor cerrada de las mismas plantas, con una pequeña disminución del 4,3 % en el promedio.

b) POLEN CONSERVADO

1. *A temperatura de habitación*

Los resultados varían mucho entre plantas, pero utilizando esta técnica se consiguen tinciones en polen que ha permanecido 300 horas conservado.

Es posible observar que los resultados permanecen más o menos uniformes en las primeras horas, para posteriormente decrecer y permanecer algunos días con porcentajes de alrededor de 15-25 % y perder finalmente su capacidad de tinción.

<i>Conservación</i>	<i>Exp. 1</i>		<i>Exp. 2</i>	
	<i>LCB</i>	<i>MTT</i>	<i>LCB</i>	<i>MTT</i>
22 h.	80,6	48,2	—	—
45 h.	82,6	40,7	72,0	44,8
69 h.	86,5	32,7	—	—
75 h.	83,0	34,6	—	—
117 h.	81,7	27,7	—	—
192 h.	—	—	69,5	30,5
264 h.	63,5	19,0	—	—
312 h.	61,2	15,5	60,2	13,0
480 h.	63,1	0,0	61,2	0,0

## 2. Durante un año a $-18^{\circ}\text{C}$ y en vacío

Se realizan observaciones justo después de la apertura del tubo, e incluso tras dejar el polen al aire a temperatura de habitación, durante un cierto tiempo.

Los resultados obtenidos con polen al poco de abrir los tubos de conservación en vacío, son muy variables, encontrándose porcentajes muy distintos, comprendidos entre 9,7 y 68,6 %.

La pérdida de la capacidad de tinción de este polen, cuando se le deja posteriormente expuesto al aire, es más rápida que en el caso de polen fresco, pero se mantiene del tipo de 200 horas.

Se analiza asimismo, el polen contenido en un tubo que ha perdido el vacío durante su conservación, no pudiendo lograrse tinción alguna con el mismo.

### c) POLEN TRATADO

#### 1. A $80^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos

Se obtienen tinciones muy similares a las del mismo polen sin tratar. En promedio

<i>LCB</i>	<i>MTT (Trat)</i>	<i>MTT (No trat)</i>
92,2	82,0	87,7

#### 2. A $90^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos

Resultados muy similares a los del caso de  $80^{\circ}\text{C}$ .

## 3. A 110 °C durante 15 minutos

Con polen recién tratado los resultados son similares:

<i>LCB</i>	<i>MTT (Trat)</i>	<i>MTT (No trat)</i>
85,2	82,5	84,5

Un hecho que parece interesante, es que el polen tratado pierde muy rápidamente su capacidad de tinción, como en el caso de polen conservado, encontrándose porcentajes muy bajos, con el 5 % al cabo de 120 horas, desapareciendo por completo a las 150 horas.

## 4. A 110 °C durante 30 minutos y 4 horas

En ninguno de los casos se logra obtener tinción.

Por último se realiza una comparación entre la capacidad de germinación en medio de cultivo, del polen, y su capacidad de tinción con MTT en técnica húmeda.

Empleando polen conservado a —18 °C en vacío durante un mes, durante un año, polen tratado térmicamente a 80 y 110 °C, no se logra conseguir germinación alguna.

Empleando polen fresco, conservado a temperatura de habitación, se consiguen los siguientes resultados:

<i>Conservación</i>	<i>Germinación</i>	<i>LCB</i>	<i>MTT</i>
0 h.	+	—	—
7 h.	+	—	—
24 h.	+	98,0	96,0
48 h.	+	99,0	95,0
72 h.	+	98,5	93,0
99 h.	+	90,3	85,5
123 h.	+ (1)	90,6	75,5
147 h.	—	91,2	66,8
171 h.	—	88,2	62,2
240 h.	—	90,2	38,3
480 h.	—	87,6	0,0

(1) Muy bajo número de granos de polen germinados.

Los resultados según el origen del polen y la técnica empleada, pueden resumirse como sigue:

<i>Origen polen</i>	<i>MTT</i>		
	<i>Tec. seca</i>	<i>Tec. húmeda</i>	<i>Germinación</i>
Polen fresco			
— Flor cerrada	Positivo	Positivo	Positivo
— Flor abierta	Confuso	Positivo	Positivo
Polen conservado			
— A temp. habita.	Negativo	Positivo	Positivo
— En vacío a — 18 °C	Negativo	Positivo	Negativo
— Muerto	Negativo	Negativo	Negativo
Polen tratado			
— A 80-90-110 °C durante 15 min.	Negativo	Positivo	Negativo
— A 110 °C 30 min.	Negativo	Negativo	Negativo

## DISCUSION

Como se puede observar, empleando el bromuro de tetrazolio tal como fue descrito por HECKER (1963) se encuentra una capacidad de tinción sólo existente en polen claramente viable, desapareciendo la misma en algunos tipos de polen de conocida viabilidad. El caso principal está en aquellos que han sido conservados en vacío a 18 °C. y que es experiencia generalizada entre los mejoradores de remolacha su aptitud para producir buenas fecundaciones.

Igualmente no parece normal la pérdida de capacidad de teñirse el polen, a las pocas horas de la antesis.

Con la técnica descrita de cámara húmeda, los resultados, en ciertos aspectos, parecen más próximos a la realidad.

Si observamos el caso del polen fresco, mantenido durante un cierto número de horas a temperatura de habitación, los resultados parecen confirmar la capacidad del bromuro de tetrazolio para



comprobar la vitalidad de un polen, aunque el mantener la capacidad de teñirse durante períodos de tiempo de 312 horas parece demasiado largo período de viabilidad de un polen conservado a temperatura de habitación.

Por otro lado, la prueba de vitalidad del polen conservado al vacío a  $-18^{\circ}\text{C}$ , parece ser positiva, siendo normal la variación de porcentaje según plantas.

El problema principal aparece al referirnos a los tratamientos térmicos. Los resultados a  $110^{\circ}\text{C}$  y 30 minutos o más, son normales, ya que el polen tras un tratamiento de ese tipo puede considerarse muerto. En cambio, es curioso el caso de 15 minutos a 80, 90 y principalmente  $110^{\circ}\text{C}$ , ya que son temperaturas y tiempo que parecen suficientes para provocar la pérdida de vitalidad de un grano de polen.

Finalmente, en los experimentos conjuntos de germinación en medio de cultivo y tinción con MTT, es conocido el problema de granos de polen viables, tales como los conservados durante un mes o un año, que no tienen vitalidad suficiente para germinar artificialmente. Al observar el caso del polen fresco conservado a temperatura de habitación, parece entonces comprensible que mantenga durante más tiempo su capacidad de tinción que de germinación, sobre todo observando cómo la desaparición de germinaciones coincide con una caída brusca en el porcentaje de polen teñido.

## CONCLUSIONES

Aun con el problema que se presenta en cortos tratamientos térmicos, que no se logra explicar, parece concluirse los siguientes puntos:

1. El bromuro de tetrazolio como tinción en cámara húmeda parece apropiado para comprobar la vitalidad del polen de remolacha azucarera.
2. Su principal valía parece reflejarse en el caso de muestras de polen conservado durante largo tiempo y sobre el que las tinciones de tipo morfológico no ofrecen resultados fiables.

3. Algunos resultados que se presentan parecen indicar diversos grados de vitalidad en el polen que podrían ser ordenados decrecientemente en:
- a) Polen capaz de germinar en medio artificial.
  - b) Polen capaz de fecundar (viable).
  - c) Polen capaz de teñirse con bromuro de tetrazolio.
  - d) Polen muerto.

### RESUMEN

Se presenta un estudio sobre la capacidad del bromuro de tetrazolio para determinar la viabilidad del polen de remolacha azucarera.

Los resultados obtenidos parecen indicar que con el uso de una técnica en cámara húmeda, que se describe, el bromuro de tetrazolio puede ser muy útil para muestras de polen conservado, de las que con las tinciones morfológicas, actualmente en uso, no pueden obtenerse resultados fiables.

#### *Agradecimiento*

Este trabajo fue llevado a cabo, con la ayuda de una beca de la O.C.D.E. en la Hillehög Seed Co (Suecia). A ambas organizaciones, así como al Dr. N. O. BOSEMARK, quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

### REFERENCIAS

- ASLAM, L. M.  
1964 Evaluation of seven tetrazolium salts as vital pollen stains in cotton. *Crop Science*, 4: 508-510.
- HAUSER, E. J. P. y J. H. MORRISON  
1964 The cytochemical reduction of nitro blue tetrazolium as an index of pollen viability. *Amer. Jour. Bot.*, 51 (7): 748-752.

HECKER, R. J.

1963 Use of tetrazolium salts in determining viability of sugar beet pollen. *J. Amer. Soc. Sugar Beet Tech.*, **12** (6): 521-528.

1966 Pollen viability determination with tetrazolium bromide. *J. Amer. Soc. Sugar Beet Tech.*, **13** (8): 748.

IWANAMI, R. y J. L. BREWBAKER

1970 A method of making permanent preparations of pollen tube cultures. *Bot. Mag. Tokyo*, **83**: 36-37.

KING, J. R.

1960 The peroxidase reaction as an indicator of pollen viability. *Stain Tech.*, **35**: 225-227.

MANTHIRIRATNA, M. A. y M. D. HAYWARD

1973 Pollen development and variation in the genus *Lolium*. *Z. Pflanzenzüchtg.*, **69**: 210-220.

VIEITEZ, E.

1952 El uso del cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolium para determinar la vitalidad del polen. *An. Edaf. y Fisiol. Veg.*, **11**: 297-308.