

GERMINACIÓN *in vitro* DEL POLEN DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L.)

In vitro germination of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) pollen

Javier Martínez Pacheco✉

ABSTRACT. Knowing the tobacco genotypes pollen viability during breeding programs is important. Culture media for *in vitro* pollen germination allows determining the germinative ability in a short period of time. To contribute to this knowledge, the chemical composition of a simple culture medium for *in vitro* germination of pollen grain was determined. The pollen grains *in vitro* germinations from seven tobacco genotypes: F₁ hybrids 'C-1', 'C-2'; 'Habana 2000' cv., 'Habana 92' cv., 'Corojo 99' cv., 'NC 1071' cv. and the breeding line 'Wz' were evaluated in the culture medium Brewbaker and Kwack (BK), SaCaBor(SCB), SaCaBorMag (SCBM) and SacaBorMag-PEG (SCBMP) through a random block experimental design with two replicates. The analysis of univariate factorial variance shows the highest general germination percentages were achieved in the solid medium SCB containing 150 mg L⁻¹ H₃BO₃, 400 mg L⁻¹ CaCl₂ and 15 % sucrose. No pollen grain and pollen tube destruction in any medium due to osmotic potential alterations were observed. The presence of PEG-6000 in the medium SCBMP did not have any significant effect on the germination whether comparing with the SCB medium. The effect of the tobacco genotypes and the culture media chemical composition over the *in vitro* pollen germination was evidenced.

Key words: boron, calcium, culture medium, viability

INTRODUCCIÓN

En los programas de mejora del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en Cuba, es necesario conocer la viabilidad y capacidad germinativa del polen de los progenitores seleccionados durante las primeras etapas del programa.

RESUMEN. Es importante conocer la viabilidad del polen de los genotipos de tabaco durante los programas de mejora. Los medios de cultivo para la germinación *in vitro* de polen permiten determinar la capacidad germinativa de los mismos en un corto período de tiempo. Para contribuir a este conocimiento se determinó la composición química de un medio de cultivo simple para la germinación *in vitro* de granos de polen de tabaco. Se evaluó la germinación *in vitro* del polen de genotipos de tabaco: híbridos F₁ 'C-1', 'C-2'; cultivares 'Habana 2000', 'Habana 92', 'Corojo 99', 'NC 1071' y la línea 'Wz' en los medios de cultivo Brewbaker y Kwack (BK), SaCaBor(SCB), SaCaBorMag(SCBM) y SaCaBorMag-PEG(SCBMP), mediante un diseño experimental completamente aleatorizado con dos repeticiones. El análisis de varianza factorial univariante de los resultados mostró que los mayores porcentajes generales de germinación se lograron en el medio sólido SCB que contiene 150 mg L⁻¹ de H₃BO₃, 400 mg L⁻¹ de CaCl₂ y 15 % de sacarosa. No se observó destrucción de los granos de polen o de los tubos polínicos por alteraciones del potencial osmótico en ninguno de los medios que se analizaron. La presencia de PEG-6000 en el medio SCBMP no tuvo un efecto significativo en la germinación con respecto al medio SCB o SCBM pero sí en comparación con el medio BK. Se evidenció el efecto de los genotipos de tabaco y de la composición química de los medios de cultivo sobre la germinación *in vitro* de los granos de polen.

Palabras clave: boro, calcio, medio de cultivo, viabilidad

De esto depende la ocurrencia de eventos exitosos de polinización y por consiguiente la obtención de semillas híbridas viables para la producción de tabaco. De igual forma, es de suma importancia evaluar con antelación la germinación del polen del progenitor masculino en los programas de obtención de semillas de híbridos F₁ comerciales de tabaco en el país. Así se garantiza la mayor producción de semillas de calidad durante la campaña tabacalera anual para evitar retrasos en el cronograma de siembra según la política varietal de tabaco establecida.

Departamento de Genética y Fitopatología, Instituto de Investigaciones del Tabaco, Carretera Tumbadero 8 ½ km, San Antonio de los Baños, Artemisa, Cuba, CP 38100
✉ biologica1@iitabaco.co.cu

En el Instituto de Investigaciones del Tabaco (IIT), Cuba, las pruebas de germinación del polen de tabaco se realizan con el medio de cultivo desarrollado por Brewbaker y Kwack en 1963 para la germinación *in vitro* del polen de diferentes especies incluida *N. tabacum* (1). En ocasiones resulta difícil contar con todos los elementos que conforman la composición química de este medio de cultivo lo que provoca que a muchos genotipos de tabaco no se les determine su capacidad germinativa del polen. Por tanto es necesario desarrollar un método de cultivo con una composición química simple, que permita estimar de forma confiable la capacidad germinativa de los granos de polen de tabaco en el menor tiempo posible.

Existen distintos métodos para evaluar la viabilidad del polen. Entre los más rápidos y precisos destacan la tinción con colorantes vitales y la germinación en medios artificiales. Las pruebas de tinción tienen ventajas como indicadores de la viabilidad del polen, ya que son más rápidas y fáciles que la germinación del polen; sin embargo, tienden a sobreestimar la viabilidad y el poder germinativo real de los granos de polen porque pueden teñir granos de polen no viables debido a la presencia de enzimas, almidón y otras sustancias. Por otro lado, la germinación *in vitro* depende del genotipo, las condiciones ambientales, la madurez del polen, la composición y el pH del medio de cultivo, por lo que es necesario determinar las condiciones óptimas para la germinación del polen (2,3).

La germinación *in vitro* permite hacer estimaciones confiables de la fertilidad (3). Esta técnica simula el desarrollo del tubo polínico en los tejidos estilares, ya que el medio de cultivo utilizado semeja en su composición al mucílago del estigma (4). El estudio de viabilidad del polen se usa en el mejoramiento de plantas de varias especies debido a la facilidad, rapidez, bajo costo y confiabilidad de la técnica (4). El genotipo de un individuo proviene de un gameto masculino y uno femenino; por tanto, entre más viable el polen, la probabilidad de obtener diferentes combinaciones de alelos y variabilidad genética es mayor (5).

Tomando todo lo anterior en consideración el presente trabajo se propuso los siguientes objetivos:

(a) determinar la composición química de un medio de cultivo simple para la germinación *in vitro* de polen de tabaco y, (b) evaluar la germinación *in vitro* de granos de polen de genotipos de tabaco que se cultivan en Cuba para el uso en programas de mejora genética.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Se seleccionaron 25 plantas de cinco genotipos de tabaco Negro, los cultivares comerciales cubanos: 'Corojo-99' (C-99), 'Habana-92' (H-92) y 'Habana-2000' (H-2000) e híbridos F1: 'C-1' y 'C-2'; y dos de tabaco Virginia, la línea 'Wz' (Wz) y el cultivar 'NC 1071' (NC). Todas las plantas se encontraban libres de enfermedades y con presencia de inflorescencias prominentes en inicio de floración. Al momento de la colecta (8:00 am-9:00 am) se eligieron 80 flores de cada genotipo que no presentaran ninguna antera abierta. Estas flores se depositaron en frascos secos de cristal y trasladaron inmediatamente al laboratorio para monitorear la dehiscencia de las anteras y coleccionar el polen. Se emplearon pinceles de cerdas suaves para remover todo el contenido de las anteras y depositarlo en placas de Petri, que se almacenaron a 4 °C, en un lugar seco y fresco hasta su uso.

GERMINACIÓN IN VITRO DEL POLEN

Se decidió evaluar la germinación de granos de polen de tabaco *in vitro* en cuatro medios de cultivo. Tres medios de cultivo desarrollados en el laboratorio de Genética del IIT sobre la base de la importancia de los iones Ca^{2+} , B^{3+} , Mg^{2+} y de la sacarosa en el desarrollo del tubo polínico, los medios sólidos: SaCaBor (SCB) y SaCaBorMag (SCBM) y el medio líquido SaCaBorMag-PEG 6000 (SCBMP). El medio de cultivo de Brewbaker y Kwack (BK) (1) desarrollado en 1963, del cual se conoce su capacidad para la germinación del polen de tabaco se tomó como Control. El pH de los medios de cultivo se ajustó a un valor de $5,52 \pm 0,02$ y sus composiciones químicas se muestra en la Tabla. Los medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Tabla. Composición de los medios de cultivo (n=4) para evaluar la germinación *in vitro* de granos de polen de genotipos (n=7) de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.)

Medio	H_3BO_3 (mg L^{-1})	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (mg L^{-1})	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mg L^{-1})	CaCl_2 (mg L^{-1})	KNO_3 (mg L^{-1})	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ (%)	PEG-6000 (%)
BK*	100	300	200	--	100	10	--
SCB*	150	--	--	400	--	15	--
SCBM*	100	--	300	450	--	20	--
SCBMP	100	--	300	450	--	20	12,5

*Para los medios sólidos de Brewbaker y Kwack (BK), SaCaBor (SCB) y SaCaBorMag (SCBM) se añadió 1g de agar por cada 0,5 L de medio de cultivo

Los granos de polen se dispersaron en placas de Petri que contenían 0,01 L de los medios de cultivo, se taparon y se incubaron a la luz durante 20 horas/22 °C para maximizar el tiempo de exposición del polen a los componentes de los medios de cultivo. Se realizaron dos repeticiones por genotipo de tabaco para cada medio de germinación *in vitro*. Pasado este tiempo se evaluó la germinación de 200±2 granos de polen que se seleccionaron aleatoriamente, con un microscopio invertido (Zeiss, Alemania), en diferentes campos de observación. El porcentaje de germinación se calculó como:

Germinación (%) = granos de polen germinados / total de granos seleccionados

Se consideró como grano de polen germinado aquel cuyo tubo polínico resultó dos veces mayor que el diámetro del grano de polen (6).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

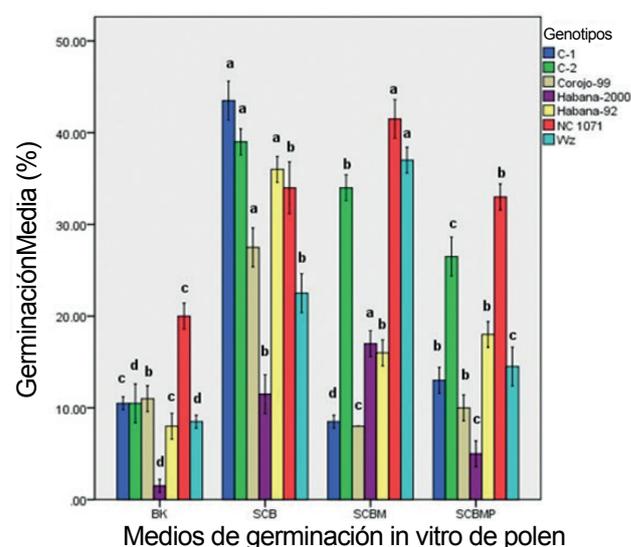
El estudio de la germinación *in vitro* se llevo a cabo mediante un diseño experimental completamente aleatorizado con dos repeticiones por medio de cultivo. Se realizaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para comprobar el ajuste de los datos a una distribución normal. Los datos se sometieron a un análisis de varianza factorial univariante. La comparación de las medias de los valores que se obtuvieron se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Posteriormente, no asumiendo homogeneidad de varianzas se realizó la prueba *post-hoc* de Games-Howell. Para el análisis de los datos se empleó el programa IBM® SPSS® Statistics Version 19 (SPSS Inc.; EE.UU, 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de germinación *in vitro* de los granos de polen para cada medio de cultivo, así como para cada genotipo de tabaco que se evaluó mostraron una gran variación. La Figura 1 muestra los resultados. Un análisis general de la germinación hace evidente que los tres medios de cultivo que se desarrollaron para este estudio permitieron la germinación *in vitro* del polen en la mayor cantidad de genotipos si se compara con el medio de cultivo BK.

El mayor porcentaje de germinación para un medio se logró con el medio de cultivo SCB donde el híbrido 'C-1' resultó ser el genotipo con la mayor germinación (43,50 %); sin embargo, el medio SCB no favoreció la germinación del polen de los cultivares 'Habana-2000' y 'Wz'. Una posible explicación para la mayor germinación de algunos genotipos de tabaco en el medio SCB es que este medio de cultivo ofrece suficiente consistencia, concentración y suministro de minerales para algunos genotipos, no así para los genotipos 'Habana-2000' y 'Wz'. Este medio de cultivo

sólo contiene como elementos minerales al Ca²⁺ y B³⁺ y sacarosa como elemento nutritivo. Brewbacker y Kwack (1), demostraron la importancia del calcio en el proceso de desarrollo del tubo polínico *in vitro* al comprobar que la ausencia de este ion en el medio de cultivo inhibe por completo la germinación de los granos de polen de 86 especies de 39 familias diferentes, incluido el género *Nicotiana*.



Las barras representan ME±DV. En el gráfico: BK(medio de cultivo Brewbaker-Kwack); SCB(medio de cultivo SaCaBor); SCBM(medio de cultivo SaCaBorMag) y SCBMP(medio de cultivo SaCaBorMag-PEG). Letras diferentes para cada medio de cultivo indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre genotipos evaluados según prueba *post-hoc* de Games-Howell

Figura 1. Porcentaje de germinación media de los genotipos (n=7) de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) luego de 20 horas de incubación en cuatro medios de cultivo

El desarrollo del tubo polínico es dependiente de la concentración de Ca²⁺. Una inhibición de la germinación, así como de la elongación del tubo polínico se observa en concentraciones de Ca²⁺ menores de 10 mg L⁻¹ y por encima de los 1000/ 10000 mg L⁻¹ dependiendo de la especie (1,7). Se conoce que en el grano de polen la concentración citoplasmática de Ca²⁺ aumenta en el sitio potencial de germinación y permanece alta hasta la emergencia del tubo polínico (8,9). El calcio es capaz de unirse a las pectinas de las paredes del tubo polínico, evento que aumenta la rigidez de la pared celular y regula la permeabilidad de las células del polen y de esta forma se potencia el crecimiento del tubo polínico sin que se provoque una ruptura de la membrana (10).

El medio de cultivo SCB contiene la concentración más alta de H₃BO₃ (150 mg L⁻¹) de los cuatro medios que se analizaron, por lo que aporta la mayor cantidad de iones B³⁺ para la

germinación y posterior desarrollo del tubo polínico. El boro está directamente involucrado en la síntesis de pectinas y ayuda en la síntesis de calosa (11), de esta forma se involucra de manera indirecta en el desarrollo de la membrana del tubo polínico durante su crecimiento. Se cree que el boro promueve la germinación del polen afectando la actividad de la H^+ -ATPasa que participa en el proceso (11,12).

El medio de cultivo SCBM favoreció la germinación del cultivar 'NC 1071' (41,50 %) y de la línea 'Wz' (37 %), ambos genotipos de tabaco tipo Virginia. La presencia de Mg^{2+} en este medio de cultivo particular puede contribuir a potenciar la germinación de los genotipos de tabaco Virginia sobre el resto de los genotipos de tabaco Negro. Los requerimientos específicos para la germinación *in vitro* del polen, de sacarosa, Ca^{2+} , B^{3+} o Mg^{2+} así como de otros iones, pueden variar entre los genotipos de tabaco evaluados, como se evidencia en los resultados.

Un medio de germinación de polen se puede considerar efectivo cuando se obtiene la máxima germinación y la mínima destrucción de los granos, por alguna alteración del potencial osmótico del medio, por ejemplo. En este trabajo, se puede considerar al medio SCB, como medio efectivo, aunque en los medios de cultivo BK, SCBM y SCBMP no ocurrió la destrucción de los granos, según observaciones al microscopio, el porcentaje de germinación general en estos no fue mayor que en el medio de cultivo SCB. Además, es posible que el medio de cultivo SCB proporcione condiciones de germinación similares a las condiciones *in vivo* de la germinación del grano de polen y del desarrollo y elongación del tubo polínico en flores de tabaco para la mayor parte de los genotipos que se evaluaron.

A pesar de que los medios BK, SCBM Y SCBMP aportan otros iones importantes como potasio, nitratos y magnesio, es evidente el papel esencial de los iones Ca^{2+} y B^{3+} , así como la presencia de sacarosa como fuente de carbono en el medio de cultivo SCB. Los medios de cultivo analizados pueden no reflejar de manera exacta el ambiente que rodea al polen en el estigma durante el evento de la polinización; sin embargo, las concentraciones de los elementos nutritivos en el medio SCB que se requieren para estimular la germinación del polen, quizás sean similares o se acerquen a las concentraciones en las condiciones *in vivo* para la mayoría de los genotipos de tabaco que se evaluaron.

Un aspecto importante a analizar es la influencia del genotipo *per se* en la germinación *in vitro* de los granos de polen. No existen relaciones de parentesco entre el conjunto de genotipos, solo entre 'C-1' y 'C-2' y entre 'Habana-2000' y 'Corojo-99'. Los genotipos 'C-1' y 'C-2' corresponden a híbridos F_1 que se obtuvieron mediante un cruzamiento recíproco entre sus progenitores y se esperaba que sus porcentajes

de germinación en un mismo medio de cultivo tuvieran valores similares. Sin embargo, el comportamiento de los híbridos en cuanto a la germinación no es uniforme, con diferencias significativas para los medios de cultivo SCB, SCBM y SCBMP. De forma general, las diferencias en la germinación del polen y en el crecimiento del tubo polínico que se encontraron en este estudio, pueden estar dadas por diferencias reales en el vigor intrínseco del polen entre los genotipos de tabaco, como consecuencia del origen genético diferente de cada genotipo. De forma particular, el alto grado de heterocigocidad de 'C-1' y 'C-2', un elemento característico de los híbridos F_1 , puede ser la causa posible de variación entre ambos genotipos.

La sacarosa juega un papel nutritivo para el polen y las variaciones en el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa se asocian con diferentes potenciales osmóticos. Este doble papel de la sacarosa es bien aceptado actualmente (3,13). Las concentraciones de los diferentes medios de cultivo oscilaron entre 10-20 % y no afectaron negativamente la germinación del polen, con una concentración óptima de un 15 % para el SCB. La sacarosa (15 %) en combinación con el ácido bórico (150 mg L^{-1}) en el medio de cultivo SCB mostró buenos resultados para la germinación. El boro puede crear un complejo con la sacarosa y este complejo borato-azúcar es capaz de translocarse a través de las membranas mejor que las moléculas de azúcares no ionizadas (11).

La presencia de Polietilenglicol-6000 (PEG-6000) en el medio SCBMP, en su función de regulador osmótico no metabolizado por el polen, perseguía el objetivo de evitar la destrucción de los granos de polen, evento muy común cuando existen alteraciones de los componentes del medio de germinación *in vitro* (14), además de comprobar si su incorporación al medio de cultivo potenciaba la germinación del polen de tabaco. Se determinó el potencial osmótico del medio con un valor aproximado de 800 mOsm, donde la concentración inicial de sacarosa tiene la mayor contribución al potencial osmótico (20 %, 584 mM) en relación con la concentración de PEG-6000 (12,5 %, 21 mM).

Se demostró que el PEG es efectivo en la germinación del polen y su adición al medio de cultivo se recomienda para diferentes géneros, como *Brassica* (15), *Cicer* (16) y *Nicotiana* (17). Los mayores porcentajes de germinación en este medio de cultivo se obtuvieron para el cultivar 'NC 1071' (33 %) y el híbrido 'C-2' (26,50 %) aún así estos fueron menores que sus valores equivalentes en el medio de cultivo SCB.

En ninguno de los medios de cultivo se observaron anomalías morfológicas en los granos de polen, destrucción del tubo polínico o destrucción del ápice del tubo polínico (Figura 2), todos estos efectos son consecuencias de un choque osmótico por alteraciones o deficiencias en las concentraciones de los iones u otros componentes osmóticamente activos

en el medio de cultivo (11,12). La deficiencia de B^{3+} reduce la extensibilidad plástica de la pared celular e impide la elongación celular normal en tejidos vegetales en crecimiento. También puede causar anomalías morfológicas como la destrucción de los ápices del tubo polínico que puede aumentar el número de granos de polen que se destruyen con la consiguiente liberación del contenido citoplasmático al exterior y una disminución de la tasa de germinación (11,18).

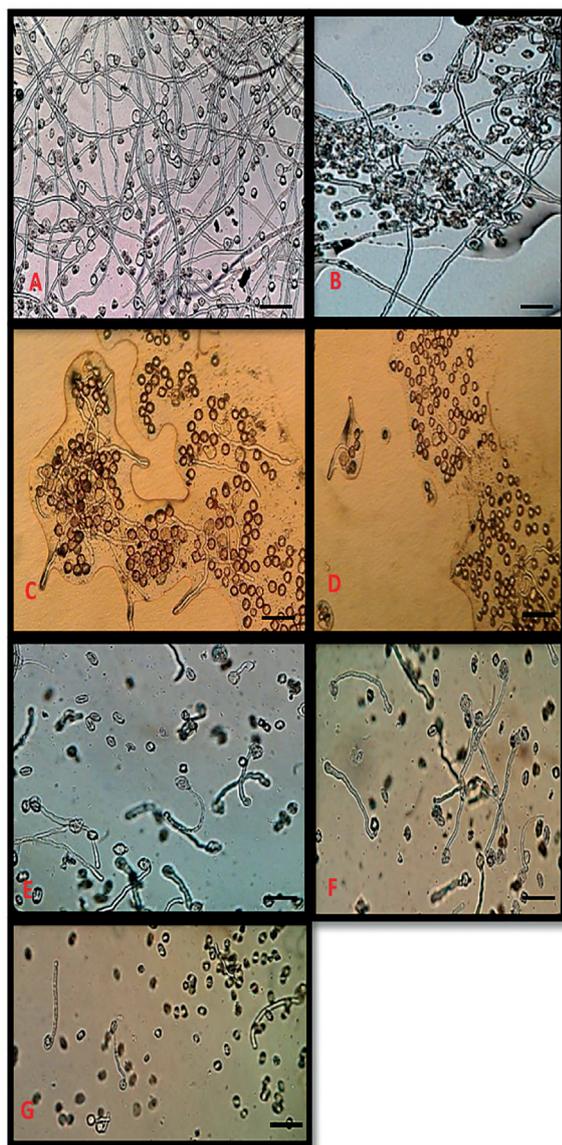
Las concentraciones en todos los medios de cultivo se mantuvieron en niveles aceptables y permisibles para la germinación de los granos de polen y el desarrollo adecuado del tubo polínico. De todos los genotipos, el híbrido 'C-1' mostró la mayor germinación del estudio (43, 50 %) en el medio SCB, con longitudes del tubo polínico (no se muestran), que superaron en cuatro veces la longitud del eje polar de los granos de polen del resto de los genotipos (Figura 2).

CONCLUSIONES

Ninguno de los tres medios de cultivo que se desarrollaron permitieron la germinación uniforme de los genotipos de tabaco. El mayor porcentaje general de germinación media de los granos de polen se obtuvo en el medio de cultivo SCB (150 mg L^{-1} de H_3BO_3 , 400 mg L^{-1} de $CaCl_2$ y 15 % de sacarosa), solo para cinco de los genotipos. La germinación *in vitro* de los granos de polen es dependiente del vigor intrínseco del polen entre los genotipos de tabaco y de la composición química de los medios de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brewbaker JL, Kwack BH. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany*. 1963;50(9):859–65. doi:10.2307/2439772
2. Singh RJ. *Plant cytogenetics*. EUA: Boca Raton; 2003. 463 p.
3. Chen J-C, Fang S-C. The long pollen tube journey and *in vitro* pollen germination of *Phalaenopsis* orchids. *Plant Reproduction*. 2016;29(1–2):179–88. doi:10.1007/s00497-016-0280-z
4. Rodríguez-Enriquez MJ, Mehdi S, Dickinson HG, Grant-Downton RT. A novel method for efficient *in vitro* germination and tube growth of *Arabidopsis thaliana* pollen. *New Phytologist*. 2013;197(2):668–79. doi:10.1111/nph.12037
5. Coelho APD, Morais KP, Dail Laughinghouse IV H, Giacomini SJ, Tedesco SB. Viabilidad del grano de polen en accesiones de *Crotalaria juncea* L. (Fabaceae). *Agrociencia*. 2012;46(5):481–7.
6. Silva LF de O da, Zambon CR, Pio R, Oliveira AF de, Gonçalves ED, Silva LF de O da, *et al.* Establishment of growth medium and quantification of pollen grains of olive cultivars in Brazil's subtropical areas. *Bragantia*. 2016;75(1):26–32. doi:10.1590/1678-4499.213
7. França LV, Nascimento WM, Carmona R, Freitas RA. Viability of eggplant pollen. *Cropps breeding and applied biotechnology*. 2009;9(4):320–7. doi:10.12702/1984-7033.v09n04a06
8. Soumitra S, Mondal S. An investigation on *in vitro* pollen germination and tube development of *Jacquinia ruscifolia* Jacq. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences (IJARBS)*. 2016;3(9):71–7. doi:10.22192/ijarbs.2016.03.09.010
9. Vogler F, Schmalzl C, Enghart M, Bircheneder M, Sprunck S. Brassinosteroids promote *Arabidopsis* pollen germination and growth. *Plant Reproduction*. 2014;27(3):153–67. doi:10.1007/s00497-014-0247-x



A) híbrido 'C-1'; B) híbrido 'C-2'; C) cultivar 'Corojo-99'; D) cultivar 'Habana-2000'; E) cultivar 'Habana-92'; F) cultivar 'NC 1071'; G) línea 'Wz'. Obsérvese la mayor germinación y la mayor longitud de los tubos polínicos en el híbrido 'C-1' y la ausencia de anomalías morfológicas en todos los genotipos. Magnificación:10X. Las barras de escala representan $40\mu\text{m}$

Figura 2. Germinación *in vitro* del polen de los genotipos (n=7) de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en el medio de cultivo SaCaBor luego de 20 horas de incubación

10. Wu J, Qin X, Tao S, Jiang X, Liang Y-K, Zhang S. Long-chain base phosphates modulate pollen tube growth via channel-mediated influx of calcium. *The Plant Journal*. 2014;79(3):507–16. doi:10.1111/tpj.12576
11. Patel R, Mankad A. *In vitro* pollen germination- A review. *International Journal of Science and Research*. 2014;3(5):304–7.
12. Yu G-H, Zou J, Feng J, Peng X-B, Wu J-Y, Wu Y-L, *et al*. Exogenous γ -aminobutyric acid (GABA) affects pollen tube growth via modulating putative Ca^{2+} -permeable membrane channels and is coupled to negative regulation on glutamate decarboxylase. *Journal of Experimental Botany*. 2014;65(12):3235–48. doi:10.1093/jxb/eru171
13. Rottmann T, Zierer W, Subert C, Sauer N, Stadler R. STP10 encodes a high-affinity monosaccharide transporter and is induced under low-glucose conditions in pollen tubes of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. 2016;67(8):2387–99. doi:10.1093/jxb/erw048
14. Ischebeck T, Valledor L, Lyon D, Gingl S, Nagler M, Meijón M, *et al*. Comprehensive cell-specific protein analysis in early and late pollen development from diploid microsporocytes to pollen tube growth. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2014;13(1):295–310. doi:10.1074/mcp.M113.028100
15. Shivanna KR, Sawhney VK. Polyethylene glycol improves the *in vitro* growth of Brassica pollen tubes without loss in germination. *Journal of Experimental Botany*. 1995;46(11):1771–4. doi:10.1093/jxb/46.11.1771
16. Golan-Goldhirsh A, Schmidhalter U, Müller M, Oertli JJ. Germination of *Pistacia vera* L. pollen in liquid medium. *Sexual Plant Reproduction*. 1991;4(3):182–7. doi:10.1007/BF00190002
17. Read SM, Clarke AE, Bacic A. Stimulation of growth of cultured *Nicotiana tabacum* W 38 pollen tubes by poly(ethylene glycol) and Cu(II) salts. *Protoplasma*. 1993;177(1–2):1–14. doi:10.1007/BF01403393
18. Moura CRF, Machado C de A, Léo A da S. *In vitro* germination and viability of pollen grain of coconut accessions. *Revista Ciência Agronômica* [Internet]. 2015 [cited 2018 Feb 8];46(2). doi:10.5935/1806-6690.20150022

Recibido: 17 de marzo de 2017

Aceptado: 12 de octubre de 2017