

TP de laboratorio: Especificación de gametas y fertilización en plantas

Introducción

En plantas, las gametas no se diferencian directamente luego de la división meiótica de una célula madre. Después de la meiosis se suceden una serie de divisiones mitóticas y especificaciones celulares que determinan la formación de una estructura haploide llamada gametofito donde se desarrollan las gametas. El gametofito masculino es el grano de polen mientras que el gametofito femenino se llama saco embrionario.

El ciclo de vida de las plantas alterna entre un gametofito haploide y un esporofito diploide que corresponde al cuerpo vegetativo de la planta y es la generación más prominente. Los gametofitos, por el contrario, se encuentran reducidos a un escaso número de células rodeadas por tejido esporofítico. El gametofito masculino (el grano de polen) se desarrolla dentro de las anteras y el gametofito femenino (megagametofito o saco embrionario) se desarrolla dentro del óvulo. La fertilización de la célula huevo dentro del saco embrionario por una de las células espermáticas liberadas por un tubo polínico resulta en un cigoto diploide, estableciendo de esta forma la siguiente generación esporofítica. En Arabidopsis, el gametofito femenino es una estructura altamente polarizada formada por 7 células, que a su vez comprenden 4 tipos celulares: una célula huevo y dos sinérgidas localizadas en el extremo micropilar, una célula central y tres antípodas de función no determinada localizadas hacia la chalaza. Durante el desarrollo del óvulo, una célula de la hipodermis de la nucela es especificada como la célula arqueosporial. Esta célula se expande y se diferencia en la célula madre de la megaespora (MMC). La MMC sufre luego meiosis generando cuatro esporas, de las cuales tres sufren muerte celular, quedando sólo la célula proximal como la megaespora funcional en cada óvulo. Esta célula se divide luego 3 veces sucesivamente por mitosis, generando 8 núcleos. El subsiguiente proceso de celularización resulta en la formación de sólo 7 células, producto de la migración nuclear y posterior fusión de los dos núcleos polares presentes en la célula central.

Objetivos del TP:

Observar el desarrollo del gametofito femenino de Arabidopsis thaliana

Determinar la especificación de las gametas (ovocélula y célula central) en plantas transgénicas conteniendo marcadores celulares específicos

Observar la fusión de gametas luego de una polinización manual utilizando plantas transgénicas en las que las gametas femeninas expresan un marcador fluorescente rojo y las células espermáticas un marcador fluorescente verde.

Desarrollo

1- Desarrollo gametofito femenino de A. thaliana

Utilizando un microscopio de disección y jeringas de tuberculina, aislar óvulos de diferentes estadios a partir de pistilos de flores de tamaños variables (ver Fig. 1). Colocar sobre el preparado una gota de solución de clareado Hoyers y dejar reposar 30 min. Observar mediante microscopía DIC. Identificar estadios FG1-FG7 y tipos celulares de acuerdo a Fig. 2.

2- Especificación de gametas femeninas

Utilizando un microscopio de disección y jeringas de tuberculina, aislar óvulos correspondientes a un estadio de saco embrionario FG6-FG7 en pistilos previamente colocados en solución de tinción de GUS. Colocar sobre

el preparado una gota de solución de clareado Hoyers y dejar reposar 30 min. Observar mediante microscopía DIC. Identificar células teñidas correspondientes a los tipos celulares específicos.

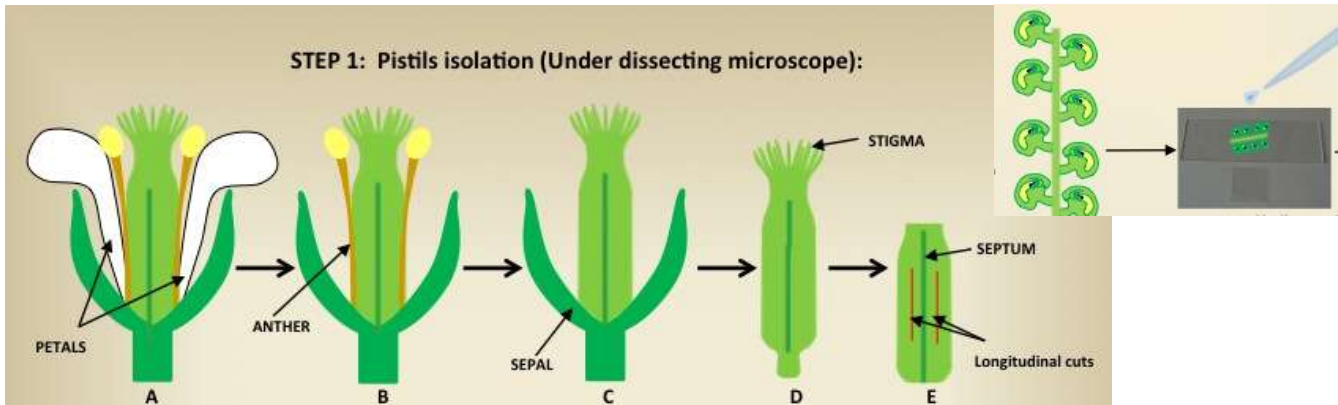


Fig. 1. Aislación de pistilos y preparación de óvulos.

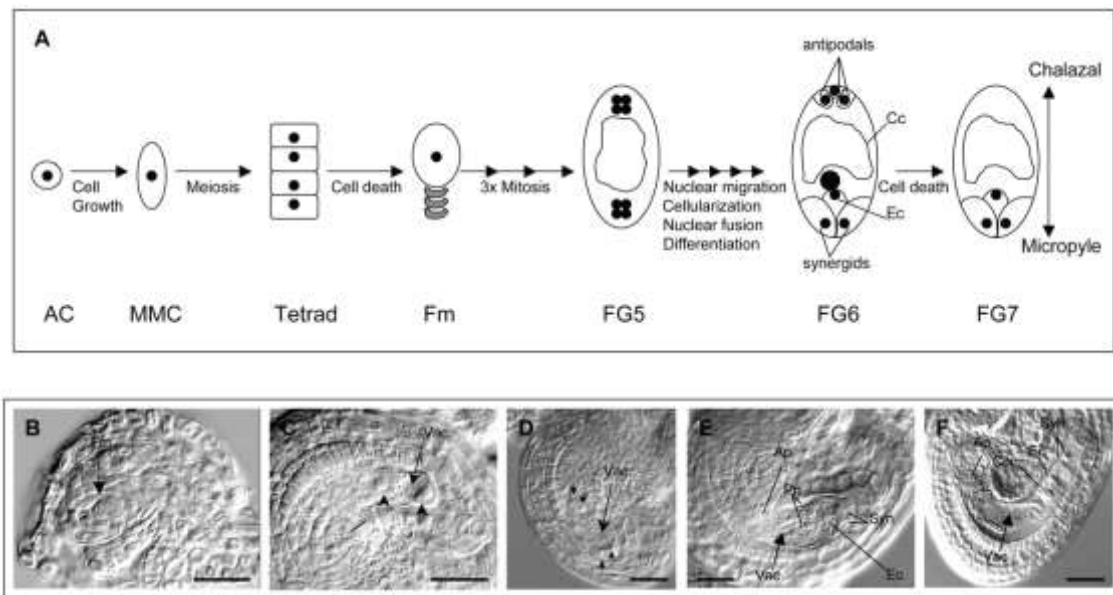


Fig. 2. Desarrollo del gametofito femenino en *A. thaliana*. (A) Esquema representativo de los eventos secuenciales del desarrollo del saco embrionario. (B) gametofito femenino mostrando la megaspora funcional. (C) gametofito femenino en el estadio de dos núcleos (D)) gametofito femenino en el estadio de cuatro núcleos (E)) gametofito femenino celularizado (estadio FG6) (F) gametofito femenino maduro. AC, célula arqueosporial; Ap, células antipodales; Cc, célula central, Ccn, núcleo de la célula central; Ec, célula huevo, Fm, megaspora funcional; MMC, célula madre de la megaspora; Pn, núcleos polares; Syn, sinérgidas; Vac, vacuola. Barra: 25 μ m.

3- Fertilización

3.1 Tinción de tubos polínicos

Nota: La primer parte de esta Actividad será la primera del día ya que lleva tiempo de incubación.

Con ayuda de una aguja de disección y bajo lupa realizar cortes longitudinales en pistilos que presenten polen en estigma. Colocar entre 5-10 pistilos por grupo en un tubo de 1.5 ml conteniendo NAOH 5N. Colocar en un baño a 65 °C e incubar por 10 min. Lavar con agua de la canilla con cuidado para no perder los pistilos y agregar 1 ml de solución de azul de anilina al 1%. Incubar 2 Hs. Al finalizar la incubación hacer un “spin down” y retirar la solución de azul de anilina con pipeta pasteur. Lavar cuidadosamente con agua de la canilla.

Colocar los pistilos en un portaobjetos y realizar un squash suave con el cubreobjetos. Observar en microscopio de fluorescencia con filtro DAPI. Distinguir el crecimiento de tubos polínicos desde el estigma a través del tejido de transmisión hasta el micrópilo de los óvulos. Distinguir la explosión de los tubos polínicos al liberar las células espermáticas.

3.2 Visualización de gametas y fertilización

Utilizando un microscopio de disección y jeringas de tuberculina, aislar óvulos correspondientes a pistilos de la línea pCDC-NS-RFP polinizados con polen proveniente de plantas plac52-GFP, que expresan GFP en los tubos polínicos. Observar en microscopía de fluorescencia.