



## DESARROLLO DE UN MÉTODO EFICIENTE PARA LA GERMINACIÓN *in vitro* DE POLEN DE SORGO

### [DEVELOPMENT OF AN EFFICIENT METHOD FOR *in vitro* GERMINATION OF SORGHUM POLLEN]

N. A. Garduño-Tamayo<sup>1</sup>, C. A. Núñez-Colín<sup>2</sup>, V. Pecina-Quintero<sup>2</sup>,  
V. Montero-Tavera<sup>2</sup>, N. Montes-García<sup>2</sup>, M. M. González-Chavira<sup>2</sup>,  
J. L. Anaya-López<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico de Celaya. Av. Tecnológico y A. García Cubas s/n. A.P. 57, C.P. 38010, Celaya, Guanajuato, México.

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Bajío. Km 6.5 Carretera Celaya-San Miguel de Allende, Apdo. Postal 112, C. P. 38110, Celaya, Guanajuato, México.

Email: anaya.jose@inifap.gob.mx

\* Corresponding author

#### SUMMARY

The *in vitro* germination of pollen in sorghum is useful on studies of viability, physiology, and genetic transformation of pollen. However, the reported media are low efficient. This research aims to develop an artificial medium and to determine the optimal conditions for pollen germination of sorghum. It was used a factorial arrangement of concentrations of sucrose, boric acid, and calcium nitrate; besides, it was evaluated the effect of pH, relative humidity, physical state of the media, and the floral developed stage on pollen collection. The optimal medium was done using 0.7 M of sucrose, 3.81 mM of calcium nitrate, 1.21 mM of boric acid, and 1% of agar with pH 6. The highest germination was obtained with pollen collected just after anthesis and relative humidity above to 70 %. The non germinated pollen grains was negatively correlated with relative humidity (-0.47,  $p>0.01$ ). With the conditions described in this paper was obtained up to 51% of *in vitro* pollen germination in 14 varieties of sorghum. Our findings indicate that for increasing *in vitro* germination is required an optimal formulation of the medium; besides, it is needed to control the relative humidity (above 70 %) and the stage of pollen collection (just after anthesis).

**Key words:** *Sorghum bicolor*; germination; pollen tube

#### RESUMEN

La germinación *in vitro* del polen de sorgo es útil en estudios de viabilidad, fisiología y transformación genética. Sin embargo, los medios reportados son poco eficientes. El objetivo del presente trabajo fue formular un medio artificial y determinar las condiciones óptimas para germinar el polen de sorgo *in vitro*. Para ello se usó un arreglo factorial de concentraciones de sacarosa, ácido bórico y nitrato de calcio; se evaluó el efecto del pH, la humedad relativa, el estado físico del medio y la etapa de desarrollo floral sobre la germinación. El medio óptimo se conformó por 0.7 M de sacarosa, 3.81 mM de nitrato de calcio, 1.21 mM de ácido bórico y 1% de agar con pH 6. La mayor germinación se obtuvo con polen colectado justo después de la antesis en una humedad relativa superior a 70%. Los granos de polen sin germinar y la humedad relativa se correlacionaron negativamente (-0.47,  $p>0.01$ ). Con las condiciones descritas en este trabajo se obtuvo hasta un 51% de germinación *in vitro* del polen de 14 materiales de sorgo. Estas evidencias sugieren que para incrementar la germinación *in vitro* se requiere una formulación óptima del medio, controlar la humedad relativa (superior a 70%) y seleccionar la etapa fenológica más adecuada para la colecta del polen (justo después de la antesis).

**Palabras clave:** *Sorghum bicolor*; germinación; tubo polínico

#### INTRODUCCIÓN

La función primordial del polen es descargar los gametos masculinos en el saco embrionario para la fecundación y posterior desarrollo de la semilla y fruto, por lo que se considera que un grano de polen es viable cuando tiene la capacidad de germinar en el

estigma y entregar las células espermáticas en el saco embrionario después de la polinización (Shivanna *et al.*, 1991). Entre los factores que afectan la viabilidad del polen destacan la edad, metabolismo, número y funcionalidad de los núcleos, la protección y exposición dentro de las anteras, la humedad relativa y temperatura al momento de la dispersión (Dafni y

Firmage, 2000). Evaluar estas características es importante para determinar parámetros fisiológicos como vigor del polen durante el almacenamiento, capacidad de germinación después de la exposición a determinadas condiciones, estudiar su interacción con el estigma y fertilidad, además de participar en el mejoramiento de cultivos, y determinar la dispersión y flujo de genes (Dafni y Firmage, 2000).

Existen distintos enfoques para evaluar la viabilidad del polen, entre los métodos *in vitro* más rápidos y precisos destacan la tinción con colorantes vitales y la germinación en medios artificiales. Los métodos de tinción detectan el citoplasma, integridad de la membrana plasmática o actividad enzimática (Rodríguez-Riano y Dafni, 2000; Dafni y Firmage, 2000), y aunque tienden a ser pruebas sencillas y rápidas, la mayoría de estos métodos se basan en la afinidad de las células por determinados colorantes, por lo que generalmente sobreestiman la viabilidad y escasamente determinan el poder germinativo real de los granos de polen o la capacidad de extensión de los tubos polínicos (Imery y Cárdenas, 2006; Obermeyer y Weisenseel, 1995; Burke *et al.*, 2007). La prueba más precisa hasta el momento es la germinación *in vivo*, en la que se evalúa la elongación del tubo polínico para llevar a cabo su función como polinizador y número de semillas producidas en relación con la viabilidad del polen. Sin embargo, su precisión y exactitud requieren esperar la formación de semilla, lo cual es un problema cuando se requiere una evaluación rápida; por otra parte las técnicas para estudiar los tubos polínicos en el estilo son complejas (Shivanna y Johri, 1989). Otro enfoque es la germinación *in vitro*, que implica inducir la formación del tubo polínico en un medio artificial, lo cual es un indicio de viabilidad ya que revela el estado de las membranas, núcleos y la tasa de conversión de las reservas; además esta técnica es rápida y se correlaciona con la germinación *in vivo* (Dafni y Firmage, 2000). Sin embargo, la germinación *in vitro* depende del genotipo, condiciones ambientales, madurez del polen, composición y pH del medio; por lo que es necesario determinar las condiciones óptimas para la germinación del polen de cada especie. En el caso del sorgo hay pocos medios reportados para la germinación del polen; Lansac *et al.* (1994) reportaron 70% de germinación, sin adición de suplementos, cuando el polen de sorgo es colectado a  $80 \pm 5\%$  de humedad relativa ambiental, sugiriendo que el desarrollo del tubo germinal del sorgo es autótrofo. Sin embargo, las evidencias de Tuinstra y Wedel (2000) difieren de estos resultados, ya que el medio optimizado indujo solamente 20.8% de germinación cuando se incubó a 20 °C. Este porcentaje es bajo, y más aún, el polen de los materiales de sorgo evaluados en un trabajo previo no germinó en esas condiciones, por lo que el objetivo del presente trabajo fue formular un medio de cultivo y determinar las condiciones

óptimas para la germinación *in vitro* del polen de sorgo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Características del sitio y materiales

El sorgo se cultivó en campo e invernadero durante los ciclos primavera-verano de 2009 y 2010 en Celaya, Guanajuato, México (20°34'N y 100°49'W; a 1650 metros sobre el nivel del mar). En invernadero se usaron bolsas de polietileno negro con 40 kg de suelo de textura franca arcillosa (29% arena, 35% limo, 36% arcilla) y densidad aparente de 1.31 g cm<sup>-3</sup>.

Se usaron las líneas experimentales de sorgo A16, A20, A71, B9, B22 y B73 (donadas por Dr. José Luis Maya de León, del Instituto Tecnológico Roque, México), y los cultivares 106B, 108B, SBB25, VarB, Fortuna, Perla, Sureño y S-23 del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (disponibles en el Campo experimental Río Bravo, Tamaulipas).

### Colecta del polen y etapa de maduración

En los experimentos de optimización del medio, el polen se colectó después de la antesis entre las 9:00 y 11:00 de la mañana en un tamiz con dos mallas de número 120 y 60 para separar las anteras e insectos. El polen se utilizó en los primeros diez minutos después de su colecta debido a que es altamente susceptible a la deshidratación. La colecta se realizó durante varios días dependiendo de la floración de cada material, aunque se procuró que el polen de cada variedad se colectara el mismo día o, cuando no había suficiente producción, en dos. Para evaluar el efecto de las condiciones ambientales al momento de la colecta en la germinación del polen se registró la humedad relativa (HR) y la temperatura con un colector de datos modelo HOB0<sup>®</sup> U12-012 (Onset Computer Corporation).

La etapa de maduración óptima se determinó evaluando el porcentaje de germinación del polen colectado en tres etapas florales: justo antes de la antesis (Figura 1A), justo después de la antesis (Figura 1B) y después de la antesis (Figura 1C) (Burke *et al.*, 2007). Se depositaron entre 20 y 30 anteras de cada una de las etapas de floración en medio líquido de germinación, se agitaron vigorosamente para liberar el polen, y se sembró una alícuota de 100 µL en medio sólido optimizado.



**Figura 1.** Etapas de desarrollo floral de *Sorghum bicolor* L. Moench evaluadas. A) Justo antes, B) justo después, y C) después de la antesis.

### Formulación de los medios de germinación

Para identificar la formulación óptima del medio de germinación se realizó una combinación factorial de sacarosa (0, 0.4, 0.7, 0.9, 1.1 M), ácido bórico (0, 1.62, 2.43, 3.23 mM) y nitrato de calcio (0, 2.12, 3.0, 3.81 mM) en medio sólido. Con el objetivo de optimizar la concentración de cada componente se realizó una segunda combinación factorial con rangos más reducidos de sacarosa (0.6, 0.7, 0.8, 0.9 M), ácido bórico (1.22, 1.62, 2.02, 2.43 mM) y nitrato de calcio (2.81, 3.0, 3.5, 3.81 mM). Como testigo se usaron los medios reportados por Lansac *et al.* (1994), y Tuinstra y Wedel (2000) para polen de sorgo (*Sorghum bicolor*), y por Burke (2007) para pasto Johnson (*S. halepense*). Las soluciones de sacarosa, ácido bórico y nitrato de calcio se prepararon con agua destilada al doble de su concentración, se esterilizaron por filtración con una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ , se les agregó un volumen de agar al 2% esterilizado en autoclave y se vertieron en cajas de Petri de 60 x 15 mm. Sólo el medio de Lansac *et al.* (1994) se evaluó en forma líquida.

### Determinación de la germinación *in vitro* del polen

Para evaluar la formación del tubo polínico se suspendieron 20 mg de polen en un mililitro de sacarosa al 30% y se sembró una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  en cada uno de los medios. Las cajas se incubaron en obscuridad durante 4 horas a 30 °C, y posteriormente se determinó el porcentaje de granos germinados, granos rotos, y con tubos polínicos mal estructurados (crecimiento no rectilíneo) entre 200 granos contados en un microscopio modelo BX61 (Olympus®) con luz blanca a una magnificación de 20X. Las imágenes se analizaron con el software Image-pro plus V4.5.0.29 (Media Cybernetic Inc.). Los granos de polen se

consideraron germinados cuando la longitud del tubo polínico fue igual o mayor al diámetro del grano.

Para determinar el estado físico y pH óptimo del medio se comparó el porcentaje de germinación del polen en el medio sólido optimizado en este trabajo con su contraparte líquida a pH de 5, 6 y 7 ajustado con ácido nítrico 0.1 N o hidróxido de sodio 0.1 N.

El medio y las condiciones de germinación seleccionadas se usaron para evaluar la germinación de 14 materiales de sorgo: A16, A20 A71, B9, B22, B73, Fortuna, Perla, SBB25, Sureño, S23, VarB, 106B y 108B.

### Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó un diseño de tres bloques completamente al azar con tres repeticiones, a excepción del primer análisis de varianza que se realizó con cuatro repeticiones. Los resultados se analizaron con pruebas no paramétricas debido a que no poseían normalidad ni homogeneidad de varianza. Se calcularon las medias con rangos Wilcoxon, y se determinaron las diferencias entre los tratamientos con la prueba de Kruskal-Wallis de comparaciones múltiples de rangos. La correlación entre los componentes del medio con la germinación, así como de la HR y la temperatura sobre esta misma variable se determinó en experimentos independientes usando la correlación no paramétrica de Spearman, por lo que no se determinó la correlación entre los componentes del medio y las condiciones ambientales.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Composición del medio de germinación

Con el primer diseño de tratamientos factorial se identificaron dos medios cuya composición permitió en promedio 11.2 y 8.5% ( $p \leq 0.05$ ) de germinación, con concentraciones que fluctuaron entre 0.7 y 0.9 M de sacarosa, 1.62 y 2.43  $\mu\text{M}$  de ácido bórico, 3.0 y 3.81  $\mu\text{M}$  de nitrato de calcio. Con el objetivo de incrementar estos porcentajes se realizó un segundo diseño factorial con el que se identificaron tres medios que permitieron la mayor germinación de acuerdo a los rangos Wilcoxon. De ellos, el más eficiente estuvo compuesto por 0.7 M sacarosa, 1.22  $\mu\text{M}$  ácido bórico, 3.81  $\mu\text{M}$  nitrato de calcio y 1% de agar. Este medio tuvo 32% menos granos rotos ( $p \leq 0.05$ ) y favoreció la formación de tubos polínicos mejor estructurados en 50% ( $p \leq 0.05$ ). Es importante destacar que en las condiciones del presente trabajo los medios usados como testigo no promovieron la germinación aún cuando estaban reportados específicamente para sorgo (Lansac *et al.*, 1994; Tuinstra y Wedel, 2000). Al igual que en reportes previos se encontró que la composición del medio es un factor importante. Sin embargo, a diferencia de lo reportado por Tuinstra y Wedel (2000) quienes encontraron una correlación significativa entre la concentración de sacarosa y nitrato de calcio con la germinación, en este trabajo no se encontró correlación entre estas variables (Tabla 1).

La composición del medio identificada en este trabajo tuvo concentraciones de sustrato relativamente más bajas en comparación con las sugeridas por Tuinstra y Wedel (2000) y Burke *et al.* (2007). Estas evidencias sugirieron que además de la composición del medio existían otros factores con impacto significativo en la germinación del polen, por lo que se evaluó el efecto del estado físico del medio (sólido o líquido), el pH, la humedad relativa y temperatura ambiental al momento de la colecta y la etapa de madurez del polen.

### Efecto del estado físico y el pH del medio

En relación con el efecto del pH y el estado físico del medio, la mejor combinación fue medio sólido a pH 6 donde hubo 23% ( $p \leq 0.05$ ) más germinación, debido probablemente al soporte que el agar proporcionó al grano de polen para elongar el tubo polínico (Taylor y Hepler, 1997). Es interesante destacar que no hubo diferencias significativas entre los pH 5 y 7, lo cual fue similar a lo encontrado por Burke *et al.* (2004) en polen de algodón donde el porcentaje de germinación fue similar en un rango de pH de 6 a 8.

Aunque en este trabajo no se controló la HR, si fue posible determinar una correlación negativa entre la germinación y la HR al momento de la colecta ( $-0.47$ ,  $p < 0.01$ ), ya que en baja HR se incremento el número

de granos no germinados ( $R = -0.470$ ,  $p \leq 0.001$ ). Las variaciones en la humedad se debieron a que la lluvia del día anterior y los días nublados favorecieron condiciones ambientales con HR alta y menor temperatura en comparación con los días soleados. La mayor germinación se obtuvo cuando el polen se colectó en un ambiente con una HR superior a 70% entre 23 y 24 °C.

En reportes previos se ha hecho hincapié en la importancia de las condiciones ambientales para preservar la viabilidad del polen. Shivanna *et al.* (1991) destacaron la importancia de la humedad relativa y la temperatura para conservar la viabilidad y el vigor del polen, mientras que Lansac *et al.* (1994) reportaron que el porcentaje de germinación *in vitro* del polen de sorgo se redujo de 91 a 53% después de 15 minutos de exposición a un ambiente con humedad relativa entre  $50 \pm 3\%$  y  $25 \pm 3\%$  °C, demostrando que la deshidratación del polen afectó irreversiblemente su viabilidad.

De manera general se ha aceptado que la dificultad para germinar el polen del género *Sorghum* se debe a su estado trinucleado ya que las especies binucleadas tienen un periodo de vida mayor debido a la resistencia de su pared, su bajo contenido de agua en el citoplasma y la reducida actividad metabólica, lo que les permite resistir mejor las condiciones de baja humedad relativa así como la elongación más rápida del tubo polínico; mientras que el polen trinucleado tiene un periodo de vida menor debido a que su pared es menos resistente, posee mayor humedad que se puede perder fácilmente por deshidratación y tiene una tasa de actividad metabólica dos o tres veces mayor que la del polen binucleado, lo cual dificulta su manejo y almacenamiento en comparación con otros géneros de cereales como el maíz (Hoekstra y Bruinsma, 1975; Leduc *et al.*, 1990; Muccifora *et al.*, 2003).

### Etapa de maduración del polen óptima para la colecta

Burke *et al.* (2007) encontraron que el porcentaje de germinación de *S. halepense* fue de 78.9% cuando se colectó justo antes de la antesis, reduciéndose a 14.5% después de ella. A diferencia de esos resultados, en este trabajo se obtuvo 36.5% ( $p \leq 0.05$ ) de germinación con polen colectado justo después de la antesis, debido probablemente a que antes el polen estaba inmaduro y no tenía la capacidad ni reservas energéticas suficientes para elongar el tubo polínico, mientras que el colectado bastante tiempo después de la antesis estaba deshidratado, por lo que en ambas condiciones una alta proporción no era viable (Dafni y Firmage, 2000).

Para obtener el polen antes de la antesis es necesario coleccionar anteras, lo cual es un proceso lento, por lo que durante este tiempo puede perderse la viabilidad y proporciona pequeñas cantidades de polen en comparación con la colecta en tamices de polen liberado después de la antesis. Es por ello que la mejor etapa para coleccionar el polen es justo después de la antesis usando un método como el descrito en este trabajo.

### Efecto del genotipo en la germinación *in vitro* del polen

Otro aspecto determinante en la germinación del polen fue el genotipo, ya que se observaron diferencias significativas entre los distintos materiales de sorgo cuya germinación promedio osciló entre 12.7 a 31.8% (Tabla 1) aún cuando fueron coleccionados bajo las mismas condiciones de humedad y temperatura. Es importante destacar que, debido a la diferencia en la floración y a la disponibilidad del polen en los distintos materiales, los datos presentados la Tabla 1 corresponde al promedio de germinación de polen coleccionado en diferentes días por lo que la HR osciló entre 55 y 70%. Aunque hasta la fecha no se ha reportado dependencia del genotipo en la germinación *in vitro* del polen de sorgo, es común encontrar reportes de diferencias en la germinación *in vitro* entre cultivares de una misma especie, como en chabacano (Asma, 2008) y entre diferentes especies (Dane *et al.*, 2004).

Es importante destacar que en las condiciones experimentales de este trabajo el medio reportado por Tuinstra y Wedel (2000) no promovió la germinación,

incluso cuando se emularon las condiciones y el medio reportados por ellos, lo cual pudo deberse a las diferencias entre los genotipos empleados en ambos estudios, y/o a que evaluaron la germinación de la mezcla del polen de al menos 10 genotipos, por lo que no observaron dependencia del genotipo y la baja germinación de un cultivar pudo encubrirse con uno de alta.

El medio reportado en este trabajo se comprobó con 14 genotipos de sorgo y se obtuvo hasta 51% de germinación *in vitro*, y aunque Burke *et al.*, (2007) reportaron 78% en medio líquido, es importante mencionar que ellos evaluaron una especie distinta (*S. halepense*) por lo que las diferencias en los porcentajes de germinación pueden atribuirse a las diferencias genéticas.

Por otro lado, el porcentaje de germinación *in vitro* (70%) reportado por Lansac *et al.* (1994), incluso sin adición de sustratos, puede ser una sobreestimación debida al criterio para cuantificar la germinación, ya que consideraron germinados a los granos con longitud del tubo polínico igual a la mitad del diámetro del polen. En este trabajo no se contabilizaron los granos con esas características ya que se buscó un método que favoreciera el desarrollo de los tubos polínicos. Por lo tanto, los criterios para definir la germinación del polen son de suma importancia ya que el éxito de la fecundación depende de la longitud del tubo polínico, que *in vivo* debe elongarse hasta alcanzar el óvulo, y aunque *in vitro* no se ha alcanzado esta magnitud, la longitud se regula por los componentes del medio y el metabolismo del polen.

**Tabla 1.** Germinación de polen de distintos materiales de sorgo en el medio optimizado.

Cultivar o línea	Granos germinados <sup>a</sup>	Germinación promedio (%)	Rangos de germinación (%)
B73	33.5 a	31.8	27 - 41
FORTUNA	27.8 ab	29.2	10 - 40
B9	27.0 ab	30.5	9 - 51
B22	26.2 ab	25.3	19 - 38
SBB25	24.5 ab	23.7	17 - 32
A71	24.3 abc	24.0	15 - 33
S23	24.3 abc	23.7	14 - 30
A20	19.3 abc	20.0	12 - 26
108B	19.3 bc	19.3	12 - 27
VARB	18.2 bc	19.2	8 - 34
106B	16.7 bc	19.2	6 - 39
SUREÑO	15.7 bc	16.3	16 - 17
PERLA	13.8 bc	15.7	8 - 24
A16	10.3 c	12.7	8 - 20

<sup>a</sup>Medias de rangos Wilcoxon de granos germinados. Diferencia mínima significativa ( $p \leq 0.05$ ). Medias con distinta letra en cada columna son estadísticamente diferentes.

Así, el medio y las condiciones ambientales definidas en este trabajo tienen la capacidad de permitir un buen porcentaje de germinación bajo las condiciones mencionadas, representando una alternativa útil y confiable para inferir la viabilidad del polen de sorgo.

### CONCLUSIONES

La formulación óptima para la germinación *in vitro* del polen de sorgo es 0.7 M de sacarosa, 3.81 mM de nitrato de calcio, 1.21 mM de ácido bórico y 1% de agar a pH 6. Las mejores condiciones para colectar el polen de sorgo son justo después de la antesis, en un ambiente con una humedad relativa superior a 70 % entre 23 y 25 °C. La capacidad del polen de sorgo para germinar *in vitro* en medios artificiales es dependiente del genotipo, la formulación del medio y las condiciones ambientales.

### AGRADECIMIENTOS

Al fondo Ciencias Básicas SEP-CONACYT por el apoyo otorgado (No. de convenio 82320). Al Dr. José Luis Maya de León por la donación de los materiales de sorgo.

### REFERENCIAS

- Asma, B.M. 2008. Determination of pollen viability, germination ratios and morphology of eight apricot genotypes. *African Journal of Biotechnology*. 7: 4269-4273.
- Burke, I.C., Wilcut, J.W., Allen, N.S. 2007. Viability and *in vitro* germination of johnsongrass (*Sorghum halepense*) pollen. *Weed technology*. 21:23-29.
- Burke, J.J., Veltan, J., Oliver, M.J. 2004. *In vitro* analysis of cotton pollen germination. *Agronomy Journal*. 96:359-368.
- Dafni, A., Firmage, D. 2000. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution*. 222:113-132.
- Dane, F., Olgun, G., Dalgiç, O. 2004. *In vitro* pollen germination o some plant species in basic culture medium. *Journal of Cell and Mollecular Biology*. 3:71-76.
- Hoekstra, F.A., Bruinsma, J. 1975. Respiration and viability of binucleate and trinucleate pollen. *Physiological Plant*. 34:221-225.
- Imery, J., Cárdenas, Y. 2006. Durability of the germinative capacity in *Aloe vera* (L.) Burm. f. and *A. saponaria* Haw. *Revista UDO Agrícola*. 6:67-75.
- Lansac, A.R., Sullivan, C.Y., Johnson, B.E., Lees, K.W. 1994. Viability and germination of the pollen sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Annals of Botany*. 74:27-33.
- Leduc, N., Monnier, M., Douglas, G.C. 1990. Germination of trinucleated pollen: formulation of a new medium for *Capsella bursa-pastoris*. *Sexual Plant Reproduction*. 3:228-235.
- Muccifora, S., Bellani, L.M., Gori, P. 2003. Ultrastructure, viability, and germination of the tricellular *Sambucus Nigra* L. pollen. *International Journal of Plant Sciences*. 6:855-860.
- Obermeyer, G., Weisenseel, M.H. 1995. Introduction of impermeable molecules into pollen grains by electroporation. *Protoplasma*. 187:132-137.
- Rodriguez-Riano, T., Dafni, A. 2000. A new procedure to asses pollen viability. *Sexual Plant Reproduction*. 12: 241-244.
- Shivanna, K., Linskens, H., Cresti, M. 1991. Pollen viability and pollen vigor. *Theoretical and Applied Genetics*. 81:38-42.
- Shivanna, K.R., Johri, B.M. 1989. The angiosperm pollen, structure and function. New Delhi: Wiley Eastern.
- Taylor, L.P., Hepler, P.K. 1997. Pollen germination and tube growth. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48:461-491.
- Tuinstra, M.R., Wedel, J. 2000. Estimation of pollen viability in grain sorghum. *Crop Science*. 40:968-970.

*Submitted April 01, 2011– Accepted May 27, 2011*  
*Revised received June 07, 2011*