



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Variabilidad metodológica en la determinación de la estabilidad del polen en estudios de Biología Reproductiva de plantas

Alumna: Elena Santiago Moriano

Junio, 2021



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales



Trabajo Fin de Grado

Variabilidad metodológica en la determinación de la estabilidad del polen en estudios de Biología Reproductiva de plantas

Alumno: Elena Santiago Moriano

Jaén, Junio, 2021

INDICE

RESUMEN.....	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 El polen	5
1.2 Polinización	8
1.3 Fecundación	9
1.4 Concepto de germinabilidad/viabilidad de polen y factores que influyen su viabilidad.	10
1.5 Métodos de estimación de la viabilidad polínica.....	11
1.5.1. <i>Métodos basados en la integridad de la membrana</i>	<i>12</i>
1.5.2. <i>Métodos basados en su actividad enzimática.....</i>	<i>13</i>
1.5.3. <i>Métodos basados en su germinación in vitro.....</i>	<i>14</i>
1.5.4. <i>Métodos basados en la germinación in situ</i>	<i>15</i>
1.6 Importancia del estudio de la viabilidad de polen para estudios de biología reproductiva de plantas.	17
1.7 Aplicaciones en Biología de la Conservación.	17
1.7.1. <i>Aplicación en agricultura y mejora de plantas cultivadas.....</i>	<i>18</i>
1.8 Antecedentes e hipótesis de trabajo	18
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
4. RESULTADOS	25
5. DISCUSIÓN	32
5.1. Especies objetivo de los estudios de viabilidad.....	32
5.2. Variabilidad intra-método	32
5.3. Variabilidad inter-método	34
5.4. Ventajas y desventajas entre métodos.....	35
6. CONCLUSIONES	37
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

RESUMEN

Un grano de polen es viable cuando este tiene suficiente capacidad de desarrollarse en el estigma de la flor y además entregar las células espermáticas en el saco embrionario después de la fecundación. Por tanto, los estudios sobre la viabilidad del polen son considerados una prioridad para entender la reproducción de la especies vegetales. Es por lo que se ha dedicado mucho tiempo y esfuerzo en estudiar las técnicas para identificar, contar, analizar, marcar y seguir el polen. El objetivo principal de esta revisión bibliográfica es investigar sobre la variabilidad metodológica de la estabilidad polínica en estudios relacionados con la Biología Reproductiva de Plantas. Existen varias metodologías según la característica del polen que se evalúe, en el caso de la integridad de las membranas, la técnica más utilizada es la reacción de la fluorocromatina (FCR). Para analizar la actividad enzimática del polen es utilizado la prueba del tetrazolio (TTC) y para la germinación se lleva a cabo la prueba de germinación *in vitro*. En los resultados se observan las diferencias que hay dentro de una misma metodología según el autor o autores que consultemos. Por consiguiente, podemos determinar varias ventajas e inconvenientes de cada método para la viabilidad de polen.

Palabras clave: polen, viabilidad, metodología, FCR, TTC, germinación *in vitro*.

ABSTRACT

A grain of pollen is viable when it has enough capacity to develop in the stigma of a flower and besides, it delivers the sperm cells into the embryonic sac after the fecundation. Therefore, some studies about the viability of pollen are considered a priority to understand the reproduction of the vegetal species. This is why much time and effort have been put to study the techniques to identify, count, analyze, mark and follow the pollen. The main goal of this bibliographical revision is for researching the methodological variability of the stability of pollen in studies related to the Reproductive Biology of Plants. Various methodologies exist according to the characteristic of pollen which is evaluated, in the case of the integrity of the membranes, the most common technique is fluorochromatic reaction method (FCR). The tetrazolium test is used in order to analyze the enzyme activity of pollen and for the germination, an in vitro seed germination is performed. In the results, differences in an only methodology are observed according to the author or authors that have been consulted. Therefore, we can determine many advantages and disadvantages of each method for the viability of pollen.

Key words: pollen, viability, methodology, FCR, TTC, in vitro seed germination

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El polen

El término botánico de polen proviene del latín “pollinis” que significa “polvo muy fino” (Saénz de Rivas, 1978).

El polen es el gametofito masculino de las plantas con semillas, su principal función es portar las células fecundantes o gametos masculinos para que se lleve a cabo la fecundación. Tras la fecundación, se produce un embrión y posteriormente la formación de una semilla.

La formación del grano de polen se da en los sacos polínicos de los estambres de las células madre del polen, por meiosis y termina su desarrollo cuando llega al estigma o primordio seminal. La duración media es de 6 semanas previas a la floración, de tal forma se produce el desarrollo desde la célula madre del polen hasta polen maduro y cuando se lleve a cabo la antesis, el polen ya maduro en general se liberará en pocos días. Por ejemplo, en el caso del olivo suele realizarse durante unos 5 días aproximadamente (Barranco *et al.* 2008).

La estructura que podemos encontrar en las cubiertas de los granos de polen desde el punto de vista morfológico y estructural es muy compleja, debido a la variedad de caracteres que hacen posible que podamos identificar el grano como son la ornamentación de la pared o cubierta polínica y su sistema de aperturas entre las más relevantes, además de otros muchos caracteres complementarios como pueden ser la simetría, la forma, el tamaño, la polaridad, etc. Las siguientes imágenes de la 1.1 a la 1.3 resumen las características generales que permiten diferenciar los granos de polen.

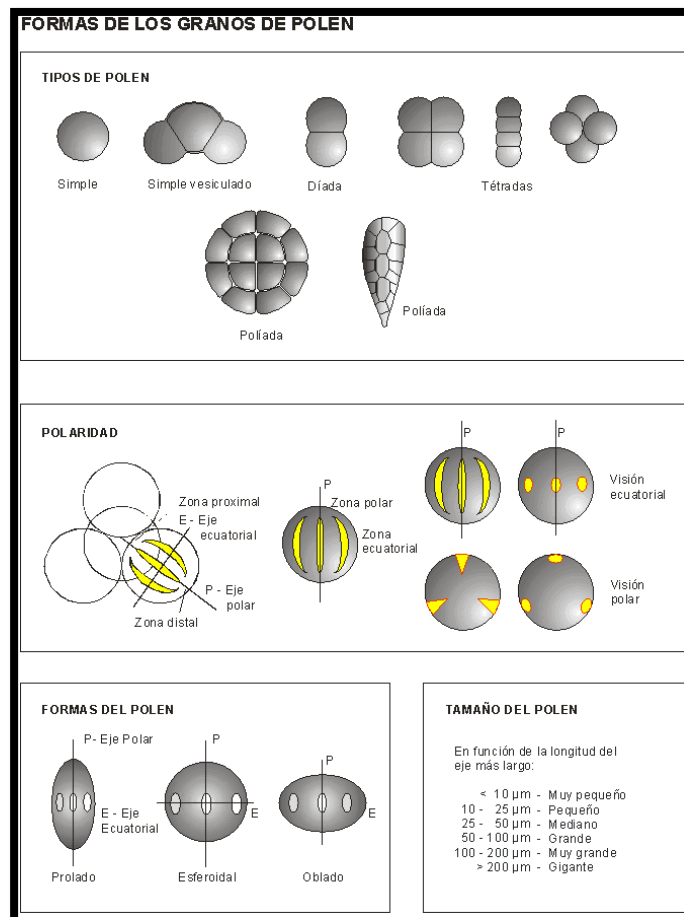


Imagen 1.1 Formas de los granos de polen. Tomado de Valero y Cahia, 2002.

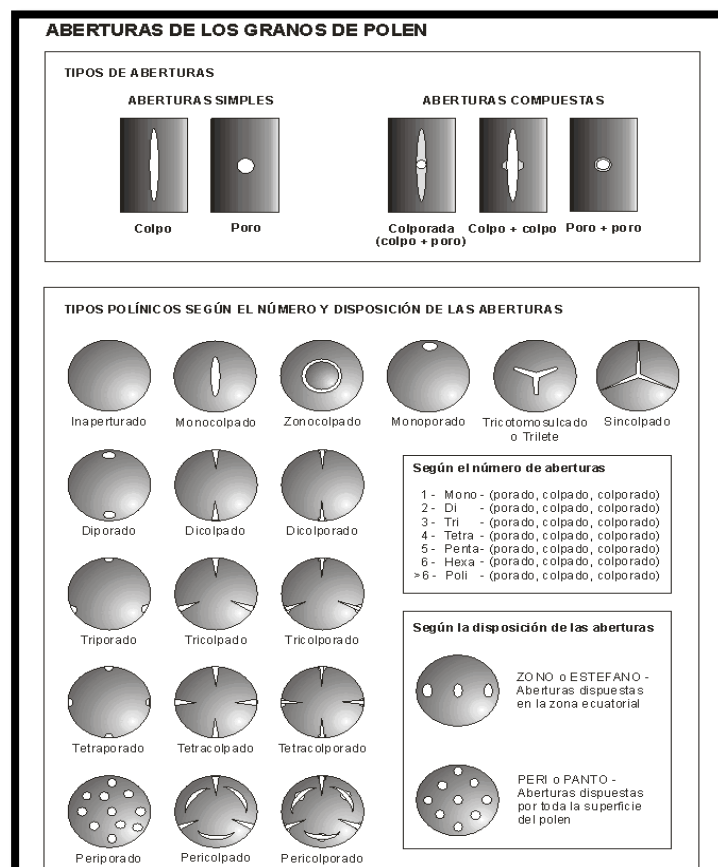


Imagen 1. 2 Aberturas de los granos de polen. Tomado de Valero y Cahia, 2002.

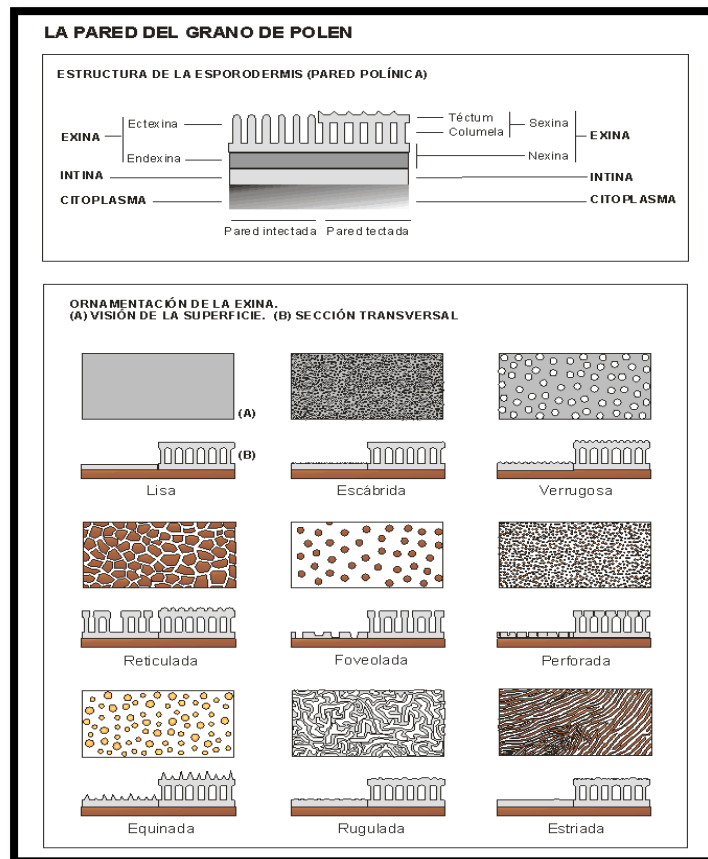


Imagen 1.3 La pared del grano de polen. Tomado de Valero y Cahia, 2002.

Las características mostradas en las imágenes anteriores son iguales para cada planta y así es posible identificar a que taxón procede el polen que tenemos en cada caso.

La resistencia del polen es muy elevada ya que tiene que hacer frente a condiciones ambientales adversas durante el proceso de polinización que ocasionarían daños como la desecación o por el contrario el colapso, lo cual puede provocar alteración en los componentes celulares y como consecuencia tener un polen inviable. Por consiguiente, una de las adaptaciones más importantes que tienen los pólenes es una cubierta externa llamada exina que hace que sea muy resistente a ácidos y bases y además no se ve afectada por los cambios de temperatura consiguiendo por lo tanto un proceso de polinización con éxito (Valero y Cahia, 2002).

1.2 Polinización

La polinización es uno de los procesos más importantes en el ciclo biológico de una planta y donde el polen debe ponerse a prueba para llevar con éxito la fecundación del óvulo femenino de la flor. El proceso de polinización consiste en el trayecto que hace el grano de polen desde la antera hasta los órganos receptores femeninos (estigma) pudiendo ser esta de la misma planta o de otra distinta.

Existen varios tipos de polinización, cuando el polen pasa del estambre al estigma de una misma flor, hablamos de autopolinización o autogamia; en el caso de la polinización cruzada o alogamia es cuando el polen de los estambres de una flor pasa a otra flor de la misma planta, que se denomina geitonogamia o si es una planta distinta, pero de la misma especie es xenogamia.

Ambos tipos de polinización tienen sus ventajas e inconvenientes. En el caso de la autopolinización, es la más sencilla y segura (asegura la polinización), pero la descendencia resultante de la fecundación será idéntica al progenitor y eso conlleva poder sufrir una pérdida progresiva de la variabilidad genética dentro de la población. La polinización cruzada tiene una descendencia mucho más variada, las semillas que suelen producir son de una mayor calidad y también serían mejores para afrontar cambios en el medio.

Las propias plantas han ido evolucionando y han desarrollado a lo largo del tiempo diferentes mecanismos para favorecer y llevar a cabo la polinización cruzada para que el polen llegara a otros individuos y evitar la autopolinización (Riatiga y Miguel, 2013).

En la polinización cruzada el polen no puede alcanzar de forma activa el órgano femenino de la flor, necesita de un vector que lo transporte hasta él. En este proceso, pueden intervenir como vectores de transporte de polen el aire o los animales. Cuando el polen viaja a través del aire la polinización se denomina anemófila y zoófila cuando el transporte de polen lo realizan los animales, siendo frecuente en los climas templados que éste se realice por insectos en cuyo caso se denomina entomófila.

Para ambos tipos hay diferentes estrategias evolutivas que han tenido que desarrollar las plantas para asegurar la fecundación. En el caso de la polinización

anemófila al tratarse de un vector polinizante muy impreciso, se produce un aumento considerado de la producción polínica para así tener mayor probabilidad de fecundación (Padilla y Valenzuela, 2008).

En referencia a la polinización entomófila las flores tienen que ser un atrayente para los insectos gracias al aroma y néctar que estas emanan de sus flores. Asimismo, es el polen un excelente atrayente para muchos polinizadores, importante para la reproducción sexual y trasiego de genes los cuales hay que saber cuáles son los mecanismos para llevar cabo la polinización. Un ejemplo de insectos interesantes son las abejas puesto que son importantes para favorecer la polinización de frutales y se tienen en cuenta a la hora de la realización de nuevos cultivos (Flórez, 2009).

1.3 Fecundación

Tras la polinización, con la llegada del polen en el estigma de la flor el grano de polen comienza con la germinación en la cual se pueden diferenciar cinco fases:

1. Fase de hidratación: el grano de polen rompe su membrana externa debido al aumento de agua en su interior.
2. Fase de formación del tubo polínico: comienza la elongación de la membrana interna, controlada por el núcleo vegetativo, que sale hacia fuera por una de las fisuras prediseñadas de la cubierta polínica.
3. Fase de elongación: continúa el alargamiento de la membrana interna a través del estilo. Además, comienza a descender los dos núcleos del grano de polen. Por último, en esta fase el núcleo germinativo da lugar a los anterozoides por división del núcleo en dos.
4. Fase de fusión del tubo polínico con el ovario: una vez se ponen en contacto la membrana del tubo polínico con la membrana del óvulo se produce una unión permitiendo que los anterozoides puedan introducirse en el interior del ovario.
5. Fecundación: es el proceso que sucede cuando se fusiona uno de los anterozoides y una oosfera, dando lugar a la semilla. El otro

anterozoide se unirá al núcleo secundario y determina que el ovario se transforme en fruto (Flórez, 2009).

A modo de resumen se puede decir que un grano de polen permanece viable tras la polinización cuando tiene suficiente capacidad para germinar en el estigma y además transferir las células espermáticas en el saco embrionario para producir la fecundación del ovulo (Shivanna et al. 1991).

1.4 Concepto de germinabilidad/viabilidad de polen y factores que influyen su viabilidad.

Podemos explicar el término calidad de polen como aquel utilizado para referirnos tanto a viabilidad como germinabilidad, pero debemos aclarar cada uno de ellos (Suárez et al. 2010).

La viabilidad es un término definido por Lincoln et al. (1982) como la capacidad de vivir, germinar, crecer y desarrollarse que tiene un grano de polen. Por otro lado, la germinabilidad es definida por Dafni y Firmage (2000) como la disposición que tiene un grano de polen de producir el tubo polínico en condiciones adecuadas. Además, otro de los conceptos que hay que aclarar es aquel que se refiere a la capacidad que tiene el grano de polen a medida que pasa el tiempo que se denomina longevidad polínica (Stanley y Linskens, 1974).

Por consiguiente, cuando nos referimos a calidad del polen es la capacidad de funcionamiento de los granos de polen y se incluye la viabilidad y capacidad de germinación (Suárez et al. 2010). Otros factores pueden influir para que el polen no llegue a germinar porque las condiciones ambientales no sean adecuadas para ello, aunque el polen sea viable, pero también se puede dar el caso de que haya algún tipo de incompatibilidad polen-pistilo y no se llegue a producir la fertilización del óvulo.

Los factores que influyen en la viabilidad del polen se encuentran resumidos en la **Figura 1.1** Podemos distinguir factores internos, los cuales engloba el metabolismo del polen o la variabilidad genética interespecífica; los factores externos o medioambientales abarcan desde aspectos morfológicos del polen y la flor, forma de exposición, protección de las anteras hasta aspectos ambientales como puede ser la temperatura, humedad, etc.

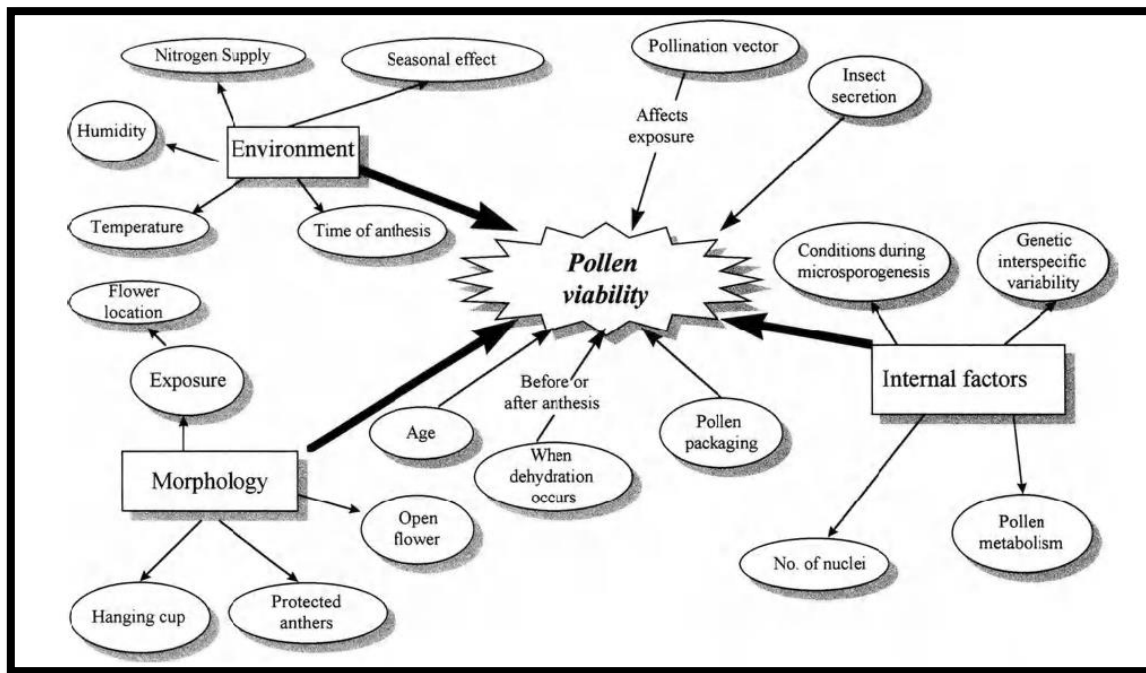


Figura 1.1 Factores que afectan a la viabilidad del polen. Esquema tomado de pollen and pollination Dafni y Firmage, 2000.

Dafni y Firmage (2000) explican que hay una gran cantidad de hipótesis e ideas que se recogen en revisiones bibliográficas donde los investigadores se han ocupado de las implicaciones ecológicas y evolutivas de la longevidad del polen analizando los diferentes métodos de viabilidad polínica y las ventajas y desventajas de cada uno.

1.5 Métodos de estimación de la viabilidad polínica

Nos encontramos que existen varios enfoques para evaluar la viabilidad del polen. Podemos clasificarlas según las características que analicemos, por ello en este caso vamos a separarlos en pruebas *in vitro* e *in vivo*.

Cuando se llevan a cabo pruebas *in vitro* son aquellas que se realizan a nivel del laboratorio y hay varias como son la tinción del citoplasma de los granos polínicos, comprobar la actividad enzimática y la germinación en medios artificiales (Astudillo., 2006). Se trata de pruebas más o menos sencillas y rápidas, obteniendo resultados cuantitativos en poco tiempo.

1. Integridad de membranas: estas pruebas consisten en determinar la correcta formación de la membrana plasmática como indicativo de la viabilidad del polen. Para ello utiliza la afinidad de las células por determinados colorantes lo cual puede llevar a dar resultados sobreestimados de su fertilidad (Imery y Cárdenas, 2006).
2. Evaluación de actividad enzimática: se trata de una pruebas citológicas cuyo objetivo es mostrar una indicación colorimétrica de determinada actividad metabólica de los granos de polen después de su rehidratación y de esta manera hacer una estimación de la viabilidad del polen (Araméndiz-Tatis et al., 2013).
3. Germinación *in vitro*: en esta prueba se induce la formación del tubo polínico en un medio artificial. De esta forma se observa el estado de las membranas y núcleos.

Sin embargo, evaluar con una mayor exactitud la fertilidad masculina se realizan pruebas del tipo *in vivo*, ya que se valora parámetros como el número de semillas o la dimensión del tubo polínico para que pueda llevarse a cabo la polinización. Uno de los inconvenientes encontrados en estas pruebas es que hay que esperar a la formación de la semilla, no se puede realizar una estimación rápida (Garduño, et al., 2011). Respecto a la falta de semillas hay que aclarar que no siempre debemos de relacionarlo con una falta de viabilidad del polen ya que puede depender del tipo de especie vegetal que nos encontremos, del establecimiento de las relaciones entre la fertilidad y el ensayo (Hanna y Towill, 1995), así como de procesos de aborto ovárico tras la fecundación (Rovira y Aletá, 1997).

Como ya he comentado anteriormente hay varios métodos de estimación según los caracteres considerados del polen como indicadores de tal capacidad, por ello se describe en qué consisten algunos de ellos.

1.5.1. Métodos basados en la integridad de la membrana

Reacción de la fluorocromatina; FCR

Esta prueba es una de las más ampliamente utilizada en el estudio de la viabilidad del polen y se basa en dos principios, la integridad de la membrana y la presencia de una esterasa activa en la célula.

Método establecido por Heslop-Harrison (1970) en el cual el diacetato de fluoresceína, un éster apolar, se pone en contacto con la molécula de polen y traspasa su membrana hidrofóbica de la célula viva. El éster sufre hidrólisis dejando así a la fluoresceína libre. Si la membrana está intacta el fluorocromo se excita con luz azul bajo un microscopio de fluorescencia y emitirá fluorescencia de color verde lo cual es indicativo de que son granos de polen viables. Por el contrario, si la célula tiene la membrana dañada o está muerta, no mostrará fluorescencia y los pólenes permanecen opacos, serán pólenes no viables (**Imagen 1.4**).

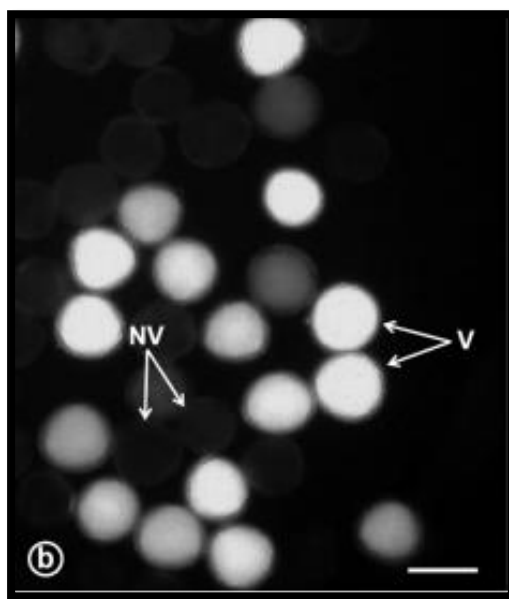


Imagen 1.4 Granos de polen con reacción fluorocromática del diacetato de fluoresceína observada con microscopía de fluorescencia. Los granos de polen viables (V) muestran fluorescencia verde intensa, mientras que los no viables (NV) solo presentan una ligera autofluorescencia. (Tomado de Suarez et al. 2010).

En general la integridad del plasmalema del polen es de gran importancia y está relacionado con la viabilidad de este, por lo tanto, es de gran utilidad el uso de este método (Heslop-Harrison et al., 1984).

1.5.2. Métodos basados en su actividad enzimática

Test de tetrazolium clorido; TTC

Prueba basada en considerar la actividad reductora (respiración) como indicadora de su viabilidad. Los granos de polen frescos se incuban por un corto

periodo de tiempo en una solución de sacarosa con Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC).

Cuando se produce la reducción de tetrazolium sobre la cubierta del polen por acción del CO₂ procedente de la respiración celular se forma trifenil que es lo que provoca que el grano de polen vivo tenga una coloración roja, por el contrario, si el grano de polen no adquiere esa tonalidad o aparece incoloros se trata de un polen no viable. En la siguiente **Imagen 1.5** se muestran señaladas con flechas negras granos de polen no viables y con flechas rojas algunos de los granos de polen viables. Es de gran utilidad esta prueba ya que proporciona un índice rápido y fiable de la viabilidad del polen (Viéitez, 1952).

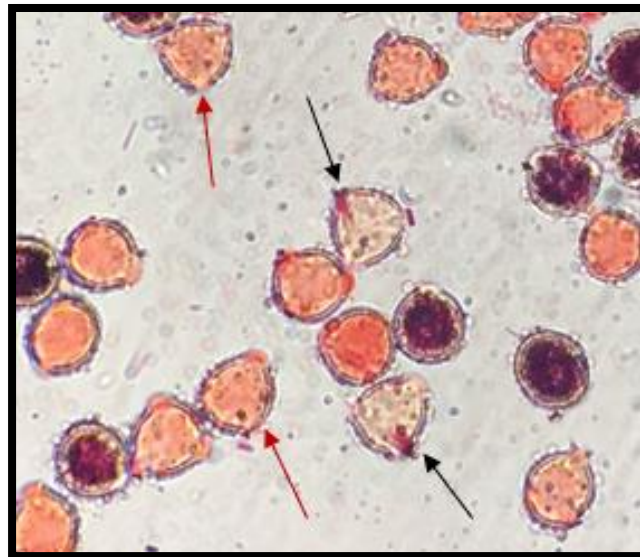


Imagen 1.5 Granos de polen los cuales han sido sometidos a la prueba de tetrazolium clorido (TTC).

1.5.3. Métodos basados en su germinación in vitro

Test de germinación *in vitro* del polen

Este tipo de prueba se lleva a cabo por incubación del polen en un medio artificial similar a que encontramos en el mucílago del estigma, que permite la germinación del polen y la formación del tubo polínico. El medio de cultivo se compone básicamente por sacarosa, donde, suele ser necesario para la elongación y formación del tubo polínico otros compuestos adicionales. Se pueden encontrar cambios e incluso diferentes medios según el protocolo que busquemos (**Imagen**

1.6). Para que la germinación se lleve a cabo de manera uniforme en el medio se aconseja un promedio de 200 granos de polen por placa. Estas pruebas de germinación en medios artificiales son muy utilizadas puesto que requiere mucho menos tiempo que si lo estudiamos *in vivo* y se suele utilizar para polen que está almacenado (Astudillo, 2006; Moura et al. 2015).



Imagen 1.6 Germinación de granos de polen de *Olea europaea L.*

1.5.4. Métodos basados en la germinación in situ

Las pruebas de germinación in situ o in vivo consiste en el desarrollo del polen en el estigma de las flores emasculadas para así determinar el número de tubos polínicos en el estilo y así poder sacar una aproximación real del polen que germinaría.

Para este tipo de prueba nos encontramos con varios métodos pudiéndolos separar entre los de fluorescencia y los de tinción. En el caso de los de fluorescencia consiste en la fijación de los estilos en formalina-acético-alcohol al 80% y después una tinción que se observarán con luz ultravioleta, de tal manera la callosa se presenta en fluorescencia de color amarillo verdoso (**Imagen 1.7**) que se diferenciará de la azulada-grisácea del tejido estilar (Martin, 1959).

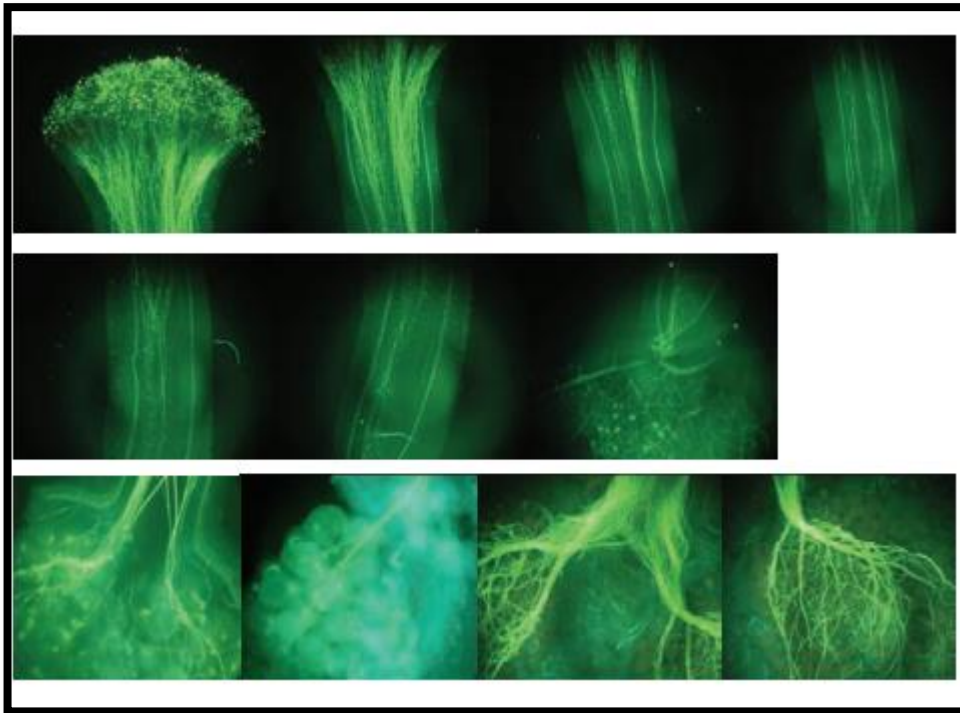


Imagen 1.7 Diferentes vistas del crecimiento del tubo polínico en el pistilo y ovario una vez coloreados con colorante fluorescente azul de anilina que reacciona con callosa. Tomado de Orrillo y Bonierbale, 2009.

En el caso de la prueba que utilizan algún tipo de tinte para observar y diferenciar mejor las diferentes partes de la germinación, encontramos varios métodos. Uno de ellos es el de Alexander (1987) en el cual se tiñe el polen y el tubo de azul oscuro a rojo azulado y de verde claro- azul verdoso claro los tejidos estilares pudiendo de tal forma ver los tubos polínicos hasta su entrada en el micropilo.

En general estos métodos requieren de mucho tiempo y por lo tanto no son prácticos para llevar a cabo un análisis de muchas muestras. Asimismo, la formación de semillas no solo depende de la fertilización, sino además del desarrollo del ovario después de la polinización, la receptividad del pistilo y las reacciones de incompatibilidad que pudieran aparecer (Abdul-Baki,1992).

1.6 Importancia del estudio de la viabilidad de polen para estudios de biología reproductiva de plantas.

Además de los estudios que encontramos sobre biología reproductiva de plantas es importante conocer cómo es su sistema reproductivo, su biología floral, su ecología de la polinización o su fenología. Estos estudios analizan la evolución de los procesos reproductivos y aquellos temas relacionados de manera directa o indirectamente con el éxito reproductivo de las plantas (Nuñez y Rojas, 2008).

Según Mansilla *et al.* (2010) en el caso de la biología floral es importante su conocimiento para la biología reproductiva de las plantas con reproducción sexual puesto que estudia las relaciones entre las flores y su ambiente. También comprende el desarrollo de la polinización y la fecundación, donde se estudia cual es la función de los órganos florales mediante el análisis de la morfología floral y el comportamiento de los agentes polinizadores.

Asimismo, es importante la viabilidad del polen para los estudios de biología reproductiva ya que controla la recombinación, en cada generación, mediante una regulación operativa de la fertilización. Abarca los modos de reproducción sexual y apomixis y, además, las estructuras y respuestas ecofisiológicas que llevan a cabo la autofecundación (Norrman y Quarin, 1991).

1.7 Aplicaciones en Biología de la Conservación.

El objetivo principal de la Biología de la Conservación es conocer y determinar los factores para conseguir el mayor nivel de diversidad biológica posible. Dentro de estos factores se recoge desde las moléculas ribonucleicas hasta los ecosistemas más complejos (Jiménez, 2008).

La Biología de la Conservación es una disciplina con un carácter multidisciplinar entre la genética, la biología reproductiva, la ecología, la biogeografía y la agronomía puesto que recoge procesos de elevada complejidad que necesitan enfocarse desde una perspectiva mucho más global y exhaustiva. Un ejemplo de ello es el estudio de dispersión de genes tanto de polen como de semillas para así poder controlar los efectos reales de la fragmentación de los hábitats (Nora *et al.*, 2011).

Es por lo que la viabilidad del polen ofrece información sobre el potencial polinizador de las especies vegetales, su efectividad para fertilizar los óvulos y por extensión en la producción de semillas. De este modo, el estudio de la viabilidad polínica permite evaluar aspectos clave de la biología reproductiva de flora amenazada que ayuden a establecer estrategias para su conservación

1.7.1. Aplicación en agricultura y mejora de plantas cultivadas

En el ámbito de la agricultura y la mejora genética de plantas también es importante conocer y estudiar el polen desde el punto de vista de su estabilidad y fertilidad.

Asimismo, desde el punto de vista agronómico es interesante conocer el éxito de la reproducción, puesto que se prevé que en el futuro habrá que producir más y mejor comida de calidad en las pocas superficies cultivables que hay. Es por ellos muy importante conocer los procesos y genes implícitos en la reproducción de las plantas para poder asegurar alimentos sostenibles y asequibles. Sin duda un gran reto que deben afrontar biólogos y agricultores para conseguir variedades agrícolas de alto rendimiento sin decaer la calidad de los productos (Alché,2008).

No podemos olvidar la utilidad del conocimiento de la estabilidad polínica para la mejora de cultivos y selección de variedades. Estudiando, por ejemplo, en la planta los mecanismos reguladores de la reprogramación celular o embriogénesis inducida por estrés, un proceso crucial para plantas forestales y agrícolas ya que serán plantas seleccionadas y de calidad.

1.8 Antecedentes e hipótesis de trabajo

Para poder hablar sobre las diferentes metodologías aplicables al polen para estudiar su viabilidad, es necesario investigar qué es lo que ya se conoce sobre este tema y como han ido evolucionando las investigaciones.

Los primeros estudios realizados al respecto se remontan al mediados del siglo pasado cuando King (1960) realizó una prueba que consiste en la oxidación de

bencidina por peroxidasa en condiciones de peróxido de hidrógeno. De esta forma el grano de polen con ayuda de la emisión de oxígeno que es liberado del peróxido de hidrógeno por la catalasa sirva como indicador de la viabilidad de polen. En el trabajo mencionado utilizaba polen de batata y caña de azúcar entre otros, obteniendo diferentes resultados.

Ya en 1984 Heslop-Harrison et al., explicaban los métodos que había disponibles para evaluar la calidad del polen *in vitro* como son las pruebas de tinción de células vegetativas, las pruebas de germinabilidad, el procedimiento fluorocromático (FCR) y las pruebas de actividad enzimática. Todas ellas son *in vitro* y realiza una comparación de los métodos en diferentes estadios del polen.

Otro de los experimentos realizados relacionados con el estudio de la estabilidad del polen se desarrollaron para evaluar el efecto en el almacenamiento de polen, en este caso de olivo el cual se almacenó a -20°C durante un año y después se usó una germinación en medio de agar sólido. Se comprobó que con la adicción de tetraciclina al medio se mejoraba la germinación y también se probó el diacetato de fluoresceína como le influía a la viabilidad polínica (Pinney y Polito, 1989).

El estudio de los diferentes métodos sigue avanzando y en 1992 Dafni publica diversos trabajos muy completos que abordan numerosos métodos y procedimientos involucrados en la ecología de la polinización, especialmente en condiciones de campo, donde la biología del polen tiene un estudio preferente. Trata, por tanto, sobre la morfología del polen, su viabilidad y estabilidad, fenología floral funcional, sistemas de reproducción en plantas, etc. Además, proporciona abundantes materiales y métodos para el trabajo experimental e incluso en algunos casos diagramas de aparatos.

Como hemos visto anteriormente en los distintos métodos para el estudio de la viabilidad y estabilidad polínica, todos parten de unas bases teóricas-funcionales comunes. Los protocolos y metodologías experimentales, aunque en general son similares, con frecuencia pueden variar en uno o varios de los procedimientos como por ejemplo las condiciones previas a las que los investigadores someten al polen o a la planta de la que se obtiene, los tiempos y condiciones de incubación, concentraciones y/o adicción de reactivos complementarios, etc.

Teniendo en cuenta todos los antecedentes, en este trabajo se va a exponer los resultados de una búsqueda bibliográfica sobre diferentes metodologías que existen para estudiar la viabilidad polínica, realizar una comparativa entre ellas y analizar la variabilidad entre protocolos experimentales dentro de cada método.

2. OBJETIVOS

Los objetivos planteados en este trabajo fueron:

- Realizar una revisión bibliográfica sobre la variabilidad metodológica de la estabilidad polínica en estudios relacionados con la biología reproductiva de plantas de los últimos años.
- Comparar los diferentes métodos de estimación de la viabilidad del polen.
- Determinar la variabilidad en los protocolos metodológicos dentro de un mismo método de estimación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Tipo de estudio

En el presente Trabajo Fin de Grado pretendo reunir información acerca de las diferentes metodologías sobre la estabilidad polínica. Para llevar a cabo tal recopilación, la búsqueda partió de palabras clave en cada motor de búsqueda para seleccionar publicaciones relacionadas. Posteriormente serían analizadas nuevas publicaciones encontradas citadas en las publicaciones iniciales y de esta forma ir completando información. Esta recopilación de información y elaboración de este trabajo han sido entre los meses de enero, febrero, marzo y abril de 2021.

3.2. Instrumentos

Los motores de búsqueda y bases de datos consultadas fueron:

- Google Scholar.
- Pubmed
- Scopus
- Web of Science (WOS)
- Scielo
- Centro Superior De Investigaciones Científicas (CSIC)
- SpringerLink

Para la elección e incorporación de artículos, capítulos de libro, utilicé ciertos criterios como palabras clave, autores, referencias en otros trabajos y acceso al trabajo completo. Incluyo artículos en varios idiomas, aparte del inglés y castellano.

El protocolo analizado bibliográficamente para evaluar la integridad de membranas en los granos de polen ha sido la reacción de fluorocromatina (FCR) que como he comentado anteriormente es la metodología más utilizada. Se analizan las siguientes variables del protocolo que figuran en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1 Parámetros evaluados en el método FCR

MÉTODO FCR
Concentración FDA
Concentración sacarosa
Componentes adicionales
Tiempo de incubación
Temperatura de incubación

En el caso de la técnica que evalúa la actividad enzimática del polen el protocolo analizado es la prueba de tetrazolio (TTC), en el cual se analizan las variables mostradas en la **Tabla 3.2**.

Tabla 3.2 Parámetros evaluados en el método TTC

MÉTODO TTC
Concentración TTC
Concentración sacarosa
Componentes adicionales
Tiempo de incubación
Temperatura de incubación

Asimismo, en la técnica de germinación, el protocolo seleccionado es el de germinación *in vitro* donde se llevará a cabo la evaluación de los parámetros mostrados en la **Tabla 3.3**.

Tabla 3.3 Parámetros evaluados en la germinación *in vitro*

GERMINACIÓN <i>IN VITRO</i>
Concentración sacarosa
Concentración Ácido Bórico
Concentración Nitrato de calcio
Componentes adicionales
Tiempo de incubación
Temperatura de incubación

La evaluación, por publicación y protocolo de experimentación, de cada variable metodológica ha sido recogida en una hoja de cálculo para facilitar su análisis e interpretación.

4. RESULTADOS

A partir de la revisión bibliografía realizada se han dividido las diferentes publicaciones en función de los tipos de tratamientos más utilizados para determinar viabilidad polínica.

4.1. Métodos basados en la integridad de la membrana

Como he comentado anteriormente la prueba más utilizada es la reacción de la fluorocromatina (FCR) para el estudio de la viabilidad de polen en cuanto a la integridad de su membrana.

El protocolo de este método fue descrito por primera vez por Heslop-Harrison en 1970, en el cual explican cómo se lleva a cabo. Se disuelven 2mg/ml de diacetato de fluoresceína (FDA) en acetona y se añade sacarosa que, tras probar con varias concentraciones, fue de 0,5M ya que era la que mayor éxito les proporcionó. A continuación, se pone en un portaobjetos unos granos de polen y unas gotas de la solución preparada. Por último, se observará al microscopio de fluorescencia y se podrá observar los granos de polen de dos tipos, aquellos que tenga su membrana intacta se podrán ver de color verde y los que por el contrario sufran algún daño no presentarán ninguna fluorescencia.

Tabla 4.1 Resultados de metodología FCR

MÉTODO FCR	
[FDA] (%-Molar)	2
[Sacarosa] (%-Molar)	10-15%
Componentes adicionales (%-Molar)	NO
Tiempo de incubación (min)	7
Temperatura de incubación (°C)	25

La **Tabla 4.1** muestra las variables metodológicas analizadas para los métodos basados en la integridad de membrana mediada por Fluorocromatina (FCR), después de la revisión y análisis de 23 artículos. El promedio de la

concentración de FDA utilizado en los protocolos de experimentación en los trabajos revisados se encuentra en torno a 2.

Respecto a la concentración de sacarosa es un compuesto muy utilizado en esta metodología, en el protocolo de Heslop-Harrison et al. (1984) añaden 0.5M (15% en solución) y en la mayoría de los artículos revisados nos encontramos con el uso de esta. Por tanto, la concentración más utilizada oscila entre 10-15%.

En la mayoría de los protocolos de experimentación no existe adicción de nuevos compuestos para facilitar la incubación o el proceso de análisis. Excepcionalmente puede adicionarse nitrato de calcio como sustancia nutritiva para favorecer el metabolismo.

Las condiciones ambientales de experimentación suelen ser bastante homogéneas entre los protocolos analizados. Respecto a tiempo de incubación como se pueden observar en la **Tabla 4.1** podemos ver que el tiempo es muy reducido, mostrando un promedio en torno a los 7 minutos. En el siguiente **Gráfico 4.1** se muestra el tiempo de incubación de aquellos trabajos que lo indicaban:

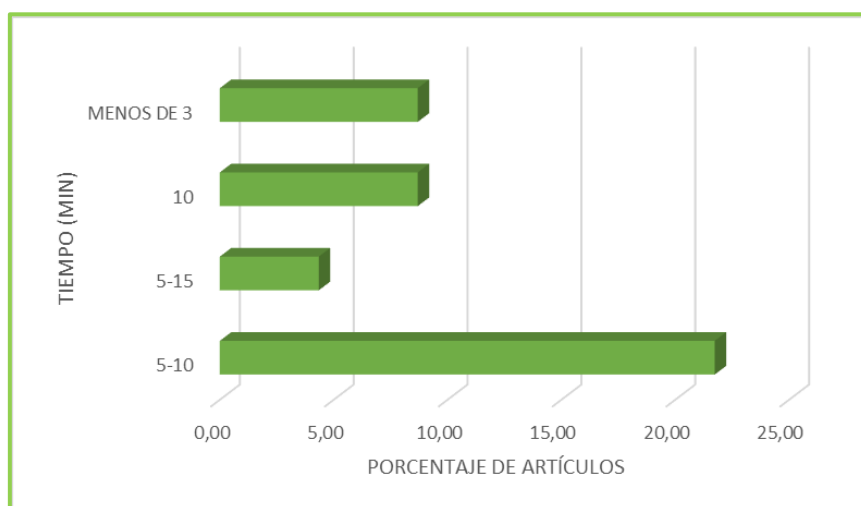


Gráfico 4.1. Tiempo de incubación en el método FCR.

La temperatura de incubación es otro parámetro muy homogéneo y ningún protocolo de experimentación recurre a modificar las condiciones de temperatura ambiente.

4.2. Métodos basados en su actividad enzimática

En este tipo de metodología la más usada es test de tetrazolium clorido (TTC). Fue Vieitez (1952) el primero en señalar que el tetrazolium en soluciones que sean neutras tomaran el color rojo puesto que el trifenil formazán se encontrará reducido y podrá darse en los sistemas enzimáticos de las células vivas.

Posteriormente, Cook y Stanley (1960) utilizan 2,3,5-trifeniltetrazolio al 0,5 % junto con agua desionizada. A continuación, ponen en un portaobjetos de 2 a 3 gotas de la solución mencionada, rocían suficiente polen encima de las gotas y cubren con cubreobjetos con cuidado de no dejar cámaras de aire. Se llevan a la estufa a 55°C y se mantienen allí durante 90 minutos en oscuridad. Por último, transcurrido el tiempo estimado, se observan al microscopio con objetivo x100 y se observa el polen con tinción roja (polen viable) o sin tinción (polen no viable).

En la siguiente **Tabla 4.2**, se muestran los datos tras una revisión de 19 trabajos donde utilizan esta metodología para comprobar la viabilidad del polen.

Tabla 4.2 Resultados de metodología TTC

MÉTODO TTC	
[TTC] %-Molar	0,5-1
[Sacarosa] (%-Molar)	36,4
Otro compuesto	NO
Tiempo de incubación (horas)	24
Temperatura de incubación (°C)	25

La concentración de sacarosa es la variable más determinante para optimizar la reacción y donde se ha encontrado mayor variabilidad entre los protocolos metodológicos analizados. Como se muestra en la **Tabla 4.2**, en general, suelen ser concentraciones elevadas las utilizadas como solución nutritiva para estimular la respiración, encontrándose en un promedio de 0.5-1%. Según la bibliografía que se revisó utilizan varias concentraciones de sacarosa a la vez, en otros no lo especifica o incluso explican que la solución de sacarosa debe de ser la adecuada para evitar

la explosión de los granos de polen (Shivanna y Rangaswamy, 2012). Es por tanto que nos encontramos con una media en cuanto a concentración de sacarosa un poco elevada (36.4%). En el siguiente **Gráfico 4.2** se recogen los datos de aquellos artículos en los cuales señalaban la concentración de sacarosa utilizada.

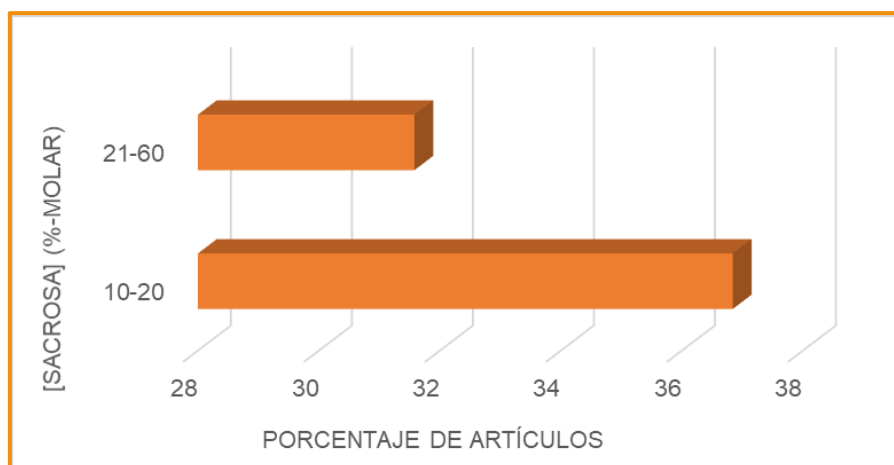


Gráfico 4.2 Concentraciones utilizadas de sacarosa en el método TTC

No hay utilización de otros compuestos complementarios para la mejora de la reacción. En cuanto al tiempo y la temperatura de incubación son los parámetros menos estandarizados en los protocolos de experimentación para pruebas TTC.

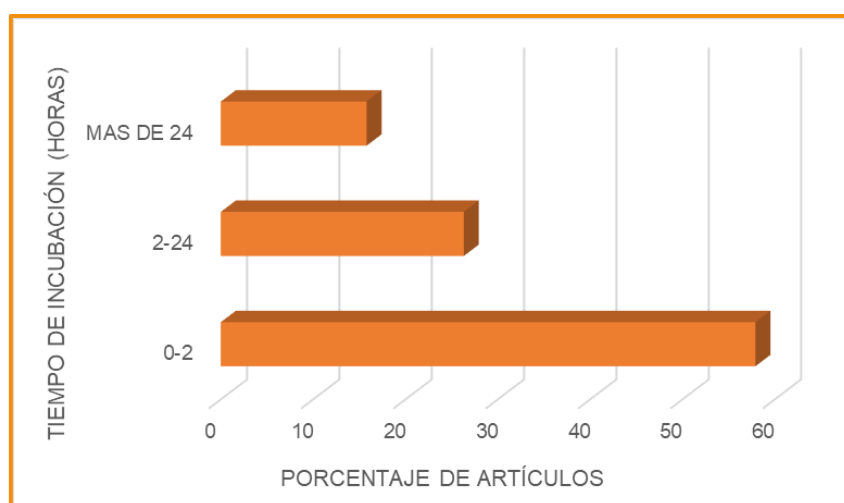


Gráfico 4.3 Tiempos de incubación utilizados en el método TTC

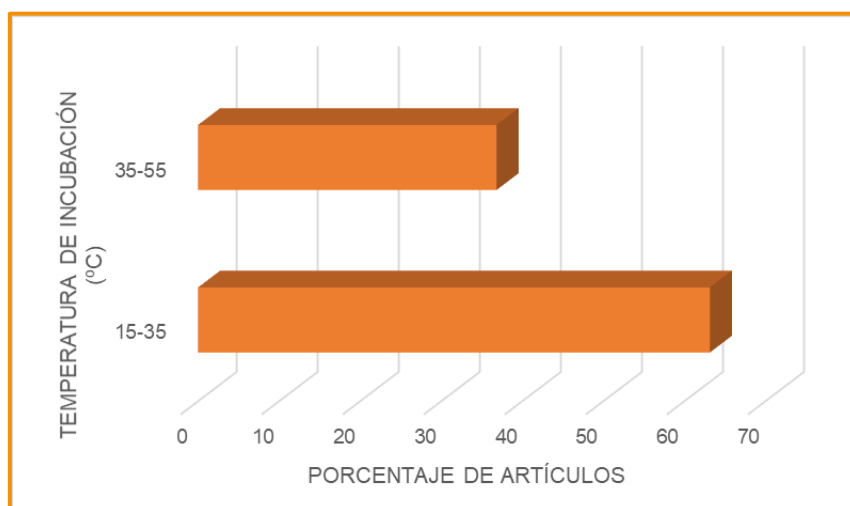


Gráfico 4.4 Temperatura de incubación utilizados en el método TTC

En los **Gráficos 4.3** y **Gráficos 4.4** recogen los datos de los trabajos analizados que especifican el tiempo y la temperatura de incubación utilizada, como se puede observar, en ambos casos hemos encontrado una gran variabilidad en el tratamiento de incubación de muestras. En el caso del tiempo de incubación, la duración del tratamiento oscila entre los 15 min y 72 horas siendo la más frecuente una duración de 24 horas. Con la temperatura ocurre algo similar, donde suele estar estandarizada a temperatura ambiente, aunque puede oscilar hasta los 50°C.

4.3. Métodos basados en la germinación in vitro

La germinación del polen puede darse solamente en agua o en soluciones acuosas de sacarosa sin ningún aditivo. En algunos tratamientos, dependiendo de la especie, sí que necesitan un medio especial para llevar a cabo su germinación.

Cuando se aumenta mucho la solución de sacarosa puede también servir para analizar las relaciones osmóticas de estos granos de polen y también para poder encontrar la concentración óptima de sacarosa en cada especie examinada. Las soluciones de sacarosa observadas oscilan desde el 0% hasta el 30% (**Gráfico 4.5**) acompañadas también de otros compuestos como pueden ser el ácido bórico (H_3BO_3) y el nitrato de calcio [$Ca(NO_3)_2$] (Dafni, 1992).

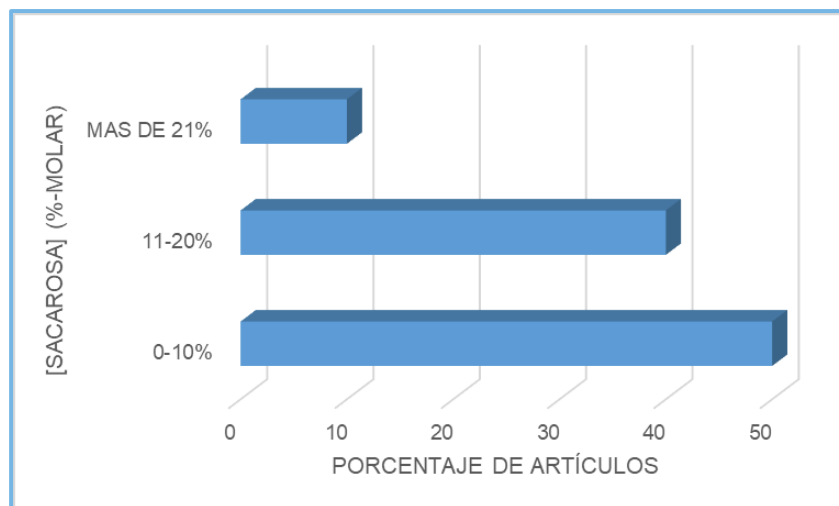


Gráfico 4.5 Concentraciones de sacarosa utilizadas en la germinación in vitro.

Howlett (1936) realizó pruebas de germinación de polen en las cuales utilizó 1% de agar y una solución de sacarosa de entre un 10-20% de concentración. Las placas las observó tanto antes como después de llevar a cabo la tinción con diferentes reactivos como el acetocarmín o la safranina.

Más adelante, Abdalla y Verkerk (1967) explicaron la germinación de polen fresco de tomate en un medio con una concentración de sacarosa al 5% y además añadieron 100ppm de ácido bórico con una temperatura óptima de germinación de 27°C.

En la siguiente **Tabla 4.3** se exponen los resultados obtenidos de un total de 20 trabajos donde utilizan este tipo de tratamiento para determinar la viabilidad polínica.

GERMINACIÓN IN VITRO	
[Sacarosa] (%-Molar)	14
Ác. Bórico (%-Molar)	0,01
Nitrato de Ca (%-Molar)	0,03-0,05
Componentes adicionales (%-Molar)	Sulfato de Mg 0,02
	Nitrato de K 0,01
	Cloruro de Ca 0,031
	Cloruro de K 0,011
Tiempo de incubación (horas)	6
Temperatura de incubación (°C)	25

Tabla 4.3 Resultados metodología germinación in vitro

Mediante los datos conseguidos en la recopilación podemos decir que la concentración de sacarosa media es de 14%, aunque hay bibliografía donde no utilizan ningún tipo de concentración de sacarosa en su medio de cultivo (Carniel et al. 2020) y otros donde, por el contrario, utilizan hasta un 30% de solución de sacarosa (Garduño et al. 2011).

El ácido bórico es un compuesto muy utilizado para la germinación *in vitro*, pero en cantidades muy pequeñas (0,01%) sin embargo, en el caso del nitrato de calcio, aunque también es muy importante para el medio, su concentración es mayor (0,03-0,05%). Brewbaker y Kwack (1963) justifican que el uso de calcio en los medios de cultivo adquieren un papel rector en el crecimiento de los tubos polínicos tanto *in vitro* como *in situ*.

Existe variabilidad en la utilización de compuestos complementarios a la solución principal. Es el caso de Zhang et al. (2020) no utiliza para el medio nitrato de calcio, sin embargo, utiliza otros compuestos como son el cloruro de calcio, cloruro de potasio y el sulfato de magnesio, sin olvidar el ácido bórico (**Tabla 4.3**).

Las condiciones de incubación son variables en los distintos desarrollos experimentales analizados. En todos los casos observados el tiempo de incubación excede de los 15 minutos, siendo los tratamientos más frecuentes con una duración entre 5-6 horas. Algunos trabajos llevan la duración de la incubación hasta las 48 horas (Li et al. 2020).

En la mayoría de los protocolos la temperatura de incubación se encuentra estandarizada en 25°C. De forma puntual algunos trabajos han estimado la germinación del polen con temperatura sensiblemente superiores (Luo et al. 2020).

5. DISCUSIÓN

5.1. Especies objetivo de los estudios de viabilidad

Uno de los aspectos analizados fue si el estudio se llevaba a cabo con especies cultivadas o especies silvestres para poder así diferenciar los estudios relacionados con Biología de Conservación de Plantas frente a los estudios de agronomía.

Por lo tanto, una vez analizada toda la bibliografía nos encontramos con que fundamentalmente los trabajos de viabilidad de polen se realizan en el campo de aplicación de la agronomía y por tanto son utilizadas especies cultivadas relacionadas con investigaciones de mejora. Es más, la mayoría de los trabajos de investigación publicados hasta la fecha son más relacionados a la mejora genética, mejora de variedades cultivadas y aplicados a la agricultura. También hay que señalar que ahora es cuando se está dando paso a los estudios para la Biología de Conservación de Plantas sobre todo para el estudio de flora autóctona o amenazada.

6.2. Variabilidad intra-método

A lo largo de la búsqueda bibliográfica se ha podido corroborar la variabilidad en cada protocolo de experimentación dentro de los métodos analizados para la determinación de la viabilidad polínica.

En el caso de la metodología FCR nos encontramos con una concentración de FDA en torno a 2mg/ml de manera general, sin embargo, hay excepciones como en Muniraja *et al.* (2019) donde utilizan una concentración de 2,5 mg/ml de FDA y además no utilizan sacarosa. Este último también es un aspecto a señalar, puesto que es un compuesto utilizado en la mayoría de la bibliografía revisada.

En el protocolo original de Heslop-Harrison (1970) no consta ningún tipo de concentración de sacarosa y algunos artículos tampoco la utilizan o lo hacen en cantidades despreciables.

Respecto al tiempo de incubación de muestras este es tan reducido que no supone un parámetro de control necesario en la metodología. Entre la bibliografía

analizada son numerosos los protocolos que no realizan mención acerca del tiempo necesario de incubación de las muestras.

En cuanto a la temperatura de incubación comentamos que era un parámetro muy homogéneo puesto que en la mayoría de los trabajos no especificaban que requieran de estufa para que se llevara a cabo la reacción del FDA.

En la metodología revisada sobre TTC nos encontramos con unas concentraciones de tetrazolio entre el 0,5% y el 1%. Algunas de las excepciones que hemos encontrado han sido en Araméndiz *et al.* (2013) ya que focalizaron en analizar diferentes concentraciones de tetrazolio sobre unos 250 granos de polen y concluyeron que la concentración con mejores resultados de tinción correspondía con concentraciones de 0,25%.

Referente a la concentración de sacarosa hay que mencionar que es habitual realizar ensayos previos con cada especie para determinar previamente la concentración más idónea para la reacción (Duro *et al.* 2013).

Como se mencionó anteriormente no encontramos utilización de otros compuestos complementarios para la mejora de la reacción en la metodología sobre TTC. Sin embargo, en la bibliografía revisada hay dos artículos que llevaron a cabo un método variable a lo estandarizado en el cual utilizan un tampón para mantener un pH concreto en la solución de TTC junto con la sacarosa (Rajora y Zsuffa, 1986; Saini y Aspinall, 1982).

Sobre el tiempo de incubación los valores oscilaban entre los 15 minutos (Tian *et al.* 2004) hasta las 72 horas (Gross y Caddy, 2006), siendo lo más común 24 horas. La temperatura de incubación es un parámetro poco relevante para la optimización del proceso ya que muchos de los trabajos no la especifican y optan por la temperatura ambiente.

El último protocolo revisado fue la Germinación *in vitro*. El uso de componentes adicionales y reactivos utilizados es lo más variable, además de la concentración utilizada de cada uno de ellos. En referencia al tiempo de incubación también nos encontramos con gran variabilidad ya que los tiempos iban desde 15 minutos (Kim *et al.*, 2020) hasta bibliografía donde mantenían el polen hasta un

máximo de 20 días puesto que querían comparar la germinación tanto *in vitro* como *in vivo* (González et al. 2002).

5.3. Variabilidad inter-método

Criterios comunes a los diferentes métodos de estimación de viabilidad del polen lo encontramos en tres variables del protocolo: Concentración de sacarosa, tiempo de incubación y temperatura de incubación del polen. Una comparación entre estas variables comunes se puede sintetizar en el **Gráfico 5.1**.

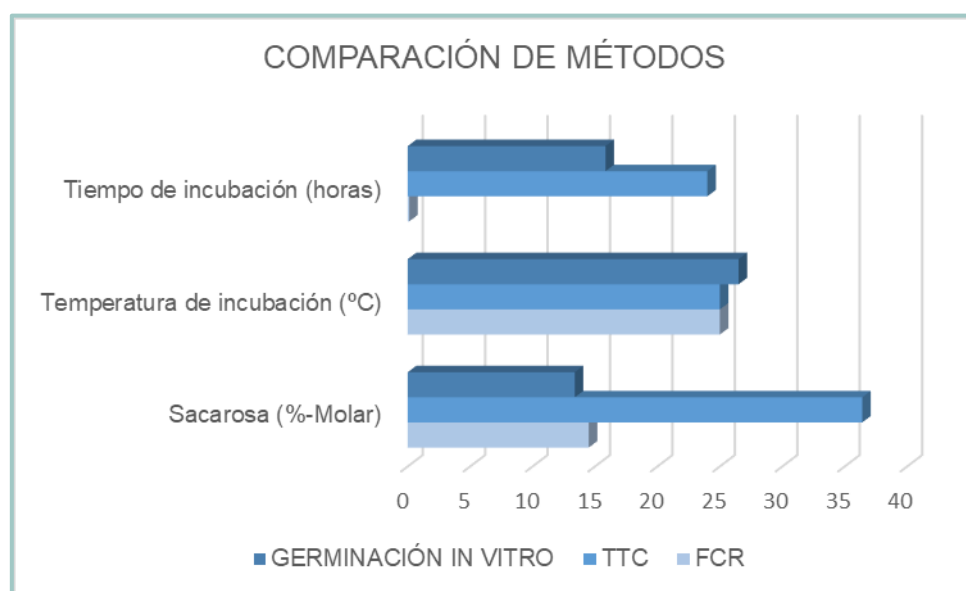


Gráfico5.1 Comparación de métodos FCR, TTC y Germinación *in vitro*.

Como hemos visto anteriormente, en general, las tres metodologías requieren de sacarosa, aunque la determinación de integridad de membrana mediante FCR es la que prescinde de este compuesto en sus protocolos hay diferencias en la concentración, ya que FCR y germinación *in vitro* utilizan en torno a un 15% de solución de sacarosa, que en TTC aumenta, en más de un 20% de diferencia respecto a las anteriores. Como vimos en los resultados de TTC encontrábamos trabajos que llegaban a utilizar una solución de sacarosa al 60% (Sulusoglu y Cavusoglu, 2014). La utilización de mayores concentraciones de sacarosa en disolución para los tratamientos con TTC debe estar condicionada en la necesidad

de estimular una mayor tasa metabólica en el polen para favorecer su reacción con la sal de tetrazolio.

El tiempo de incubación es importante para el desarrollo de los métodos *in vitro* y TTC, así lo demuestra la variabilidad entre ambos tratamientos. Los métodos TTC requieren de mayor duración en la incubación, posiblemente por el tiempo necesario para obtener una reacción visible en el polen. Por otra parte, tiempos de incubación demasiado largos favorecerían la proliferación de hongos en un medio azucarado por tanto suelen ajustarse hacia el mínimo tiempo posible.

Otro punto en común es la temperatura de incubación. Cada protocolo requiere de un tiempo estimado, pero como se observa en el **Gráfico 5.1** suele estar bien estandarizada entre métodos de experimentación.

5.4. Ventajas y desventajas entre métodos

Dafni, (1992) muestra algunas de las ventajas y desventajas de diferentes métodos de viabilidad del polen donde se encuentran los tres.

La reacción de fluorocromatina tiene como ventaja que si se usa polen maduro llega a mostrar una elevada correlación con la germinabilidad potencial. Pero si se trata de un polen inmaduro puede que obtengamos resultados falsos e incluso si se usa polen de plantas estériles puede que obtengamos resultados positivos. Asimismo, es el único método que requiere de un microscopio de fluorescencia lo cual puede también ser un inconveniente ya que no todos los laboratorios están dotados de este material.

En cuanto al TTC vemos que es muy eficaz para mucha cantidad de muestras ya que es un método bastante rápido de obtener resultados. La parte no tan positiva de este método es que no todo el polen es igual de sensible a la sal de tetrazolio entonces según la especie que estemos analizando puede variarnos muchos factores. Además, cuando se trata de polen parcialmente desecado puede dar falsos positivos, alterando de esta manera los resultados esperados (Dafni, 1992).

Sobre la germinación *in vitro* es una prueba fácil de realizar puesto pueden controlarse y evaluar previamente las concentraciones más adecuadas para el

medio de cultivo y sobre todo es una prueba real de viabilidad del polen. Sin embargo, puede que el porcentaje de germinación no sea el correspondiente con la capacidad de fertilidad del polen ya que los resultados que obtenemos tienen mucho que ver con el medio utilizado. Además, no hay que olvidar que la prueba se centra en el polen, pero no sobre la parte femenina, para que se lleve a cabo la germinación *in vivo* correctamente deberíamos de tener cierto control también sobre la parte femenina.

Una vez analizado todos los aspectos positivos y negativos encontrados en esta revisión bibliográfica vemos que la germinación *in vitro* para evaluar la viabilidad del polen es la metodología más acertada, como se ha comentado anteriormente, es la prueba donde podemos observar de manera más real la germinación del grano de polen. Aunque es el tratamiento óptimo y objetivo, existen mayor profusión de trabajos donde se realizan los anteriores métodos por sencillez y rapidez.

En los otros métodos comprobamos por un lado la integridad de la membrana (FCR) y en otro la actividad enzimática (TTC) pero eso no quiere decir que ese polen sea capaz de llevar a cabo una polinización con éxito. Simplemente comprobamos que ese polen no está dañada su membrana plasmática y que tiene actividad enzimática en cada caso. Por el contrario, han demostrado que poseen una importante correlación con la viabilidad polínica real y por tanto son muy utilizados por su sencillez y rapidez en la obtención de resultados. Para concluir decir que también influye mucho qué tipo de condiciones de extracción y conservación del polen objeto de estudio se llevó a cabo puesto que también pueden influir en la exactitud de los métodos (cita con año). Por ejemplo, si es un polen esta desecado, congelado o inmaduro afecta al resultado de un análisis. En todo caso también podremos revalorar que metodología utilizar o incluso según la especie (Shivanna y Rangaswamy, 2012).

6. CONCLUSIONES

- La mayor parte de los estudios analizados son con especies cultivadas, por lo que están relacionados con aspectos de la agronomía.
- Existe variabilidad en cada protocolo de experimentación dentro de los tres métodos analizados para la determinación de la viabilidad polínica.
- La concentración de sacarosa, el tiempo y la temperatura de incubación son las tres variables comunes que encontramos en las metodologías analizadas.
- La sacarosa es un compuesto crucial en las metodologías estudiadas puesto que aumenta la tasa metabólica del polen.
- El tiempo de incubación es fundamental para el desarrollo de los métodos TTC y germinación *in vitro*.
- La temperatura de incubación está bastante estandarizada entre los métodos de experimentación.
- La germinación *in vitro* es el método con el cual obtendremos los resultados más reales.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, A. A., & VERKERK, K. (1968). Growth, flowering and fruit-set of the tomato at high temperature. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 16(1), 71-76.

ABDUL-BAKI, A. A. (1992). Determination of Pollen Viability in Tomatoes. Journal of the american society for horticultural science. *Journal of the American Society for Horticultural Science*.

ALCHÉ, M. JD. Estación Experimental del Zaidín. *Biología reproductiva de plantas*. CSIC. <https://www.eez.csic.es/es/biologia-reproductiva-de-plantas>.

ALEXANDER, M.P (1987). A method for staining pollen tubes in pistil. *Stain Technol.* Mar;62(2):107-12.

ARAMÉNDIZ TATIS, H., CARDONA AYALA, C., JARMA OROZCO, A., (2013). Eficiencia de dos métodos para evaluar la viabilidad del polen de berenjena (*Solanum melongena* L. cv. *Lila criolla*). Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica.

ASTUDILLO, M. J.L (2006). Evaluación de métodos de conservación de polen sometidos a distintos tiempos de almacenaje en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Tesis Doctoral, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso).

BARRANCO, D., FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R., RALLO, L. (EDS.) (2008). El cultivo del olivo (8ª Ed.). Junta de Andalucía y Ediciones Mundi-Prensa.

BREWBAKER, J. L., & KWACK, B. H. (1963). The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American journal of botany*, 50(9), 859-865.

CARNIEL, F. C., FORTUNA, L., NEPI, M., CAI, G., DEL CASINO, C., ADAMI, G., & TRETACH, M. (2020). Beyond graphene oxide acidity: Novel insights into graphene related materials effects on the sexual reproduction of seed plants. *Journal of hazardous materials*, 393, 122380.

COOK, S. A., & STANLEY, R. G. (1960). Tetrazolium chloride as an indicator of pine pollen germinability. *Silvae Genetica* 9, Heft 5 (Sept.-Okt. 1960): p. 121-148.

DAFNI, A. & FIRMAGE, D. (2000). Pollen viability and longevity: Practical, ecological and evolutionary implications. *Plant. System. Evol.*, 222: 113-132.

DAFNI, A. (1992). Pollination ecology: a practical approach. *Oxford University Press*.

DURO, A., PICCIONE, V., & ZAMPINO, D. (2013). Air quality biomonitoring through pollen viability of *Fabaceae*. *Environmental monitoring and assessment*, 185(5), 3803-3817.

FLÓREZ SERRANO, J. (2009). Agricultura ecológica: manual y guía.

GARDUÑO-TAMAYO, N. A., NÚÑEZ-COLÍN, C. A., PECINA-QUINTERO, V., MONTERO-TAVERA, V., MONTES-GARCÍA, N., GONZÁLEZ-CHAVIRA, M. M., & ANAYA-LÓPEZ, J. L. (2011). Desarrollo de un método eficiente para la germinación in vitro de polen de sorgo. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 14(3), 901-906.

GONZÁLEZ, M. E., ESTÉVEZ, A., CASTILLO, J., SALOMÓN, J., MORÉ, O., & HERNÁNDEZ, M. M. (2002). La calidad del polen: requisito indispensable del mejoramiento tradicional de la papa en Cuba. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 13(1), 75-94.

GROSS, C. L., & CADDY, H. A. (2006). Are differences in breeding mechanisms and fertility among populations contributing to rarity in *Grevillea rhizomatosa* (*Proteaceae*)?. *American Journal of Botany*, 93(12), 1791-1799.

HANNA W. W., TOWILL L. E. (1995). Long-term pollen storage. *Plant Breed. Rev.* 13: 179-207.

HESLOP-HARRISON, J., & HESLOP-HARRISON, Y. (1970). Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain technology*, 45(3), 115-120.

HESLOP-HARRISON, J., HESLOP-HARRISON, Y. & SHIVANNA, K.R. (1984). The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theoret. Appl. Genetics* 67, 367–375.

HESSE, M., & PACINI, E. (2000). Pollen and Pollination. *In Pollen and Pollination*.

HOWLETT, F. S. (1936). The effect of carbohydrate and of nitrogen deficiency upon microsporogenesis and the development of the male gametophyte in the tomato, *Lycopersicum esculentum* Mill. *Annals of botany*, 50(200), 767-803.

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.

JIMÉNEZ-ALFARO, B. (2008). Biología de la conservación de plantas vasculares en la Cordillera Cantábrica. Prioridades y casos de estudio (Doctoral dissertation, Universidad de Oviedo).

KEARNS, C. A., & INOUE, D. W. (1993). Techniques for pollination biologists. *University press of Colorado*.

KIM, Y.-J. ET AL. (2020). Physiological Importance of Pectin Modifying Genes During Rice Pollen Development. *International journal of molecular sciences*. *International Journal of Molecular Sciences*.

KING, J. R. (1960). The peroxidase reaction as an indicator of pollen viability. *Stain technology*, 35, 225-27.

LI, W. ET AL. (2020). Cytological and Proteomic Analysis of *Ginkgo biloba* Pollen Intine. *Horticultural plant journal*. *Horticultural Plant Journal*.

LUO, S., ZHANG, K., ZHONG, W.-P., CHEN, P., FAN, X.-M., & YUAN, D.-Y. (2020). Optimization of in vitro pollen germination and pollen viability tests for *Castanea mollissima* and *Castanea henryi*. *Scientia Horticulturae*, 271, 109481.

MANSILLA, R., LÓPEZ, C., FLORES, M., & ESPEJO, R. (2010). Estudios de la biología reproductiva en cinco accesiones de *Smallanthus sonchifolius*. *Ecología aplicada*, 9(2), 167-175.

MARTIN, F. W. (1959). Staining and observing pollen tubes in the style by the mean of fluorescence. *Stain Technology* 34:125-128. *Ecología aplicada*, 9(2), 167-175.

MOURA, C. R. F., MACHADO, C. A. AND LEDO, A. S. (2015). In vitro germination and viability of pollen grains of coconut accessions. *Revista Ciência Agronômica*, 46, 421-427.

- MOYA MARTÍNEZ, M. (2014). Comparación de dos métodos de estimación de viabilidad del polen de *Curcubita pepo*, L.
- MUNIRAJA, M., VIJAYALAKSHMI, G., NAIK, M. L., TERRY, R., & KHAN, P. S. S. V. (2019). Ultrastructural observations of anthers, staminodes, and pollen grains of Mango (*Mangifera indica* L. var. *Beneshan*; *Anacardiaceae*). *Palynology*, 1–13.
- NORA, S., ALBALADEJO, R. G., MARTÍNEZ, S. G., ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J., & APARICIO, A. (2011). Movimiento de genes (polen y semillas) en poblaciones fragmentadas de plantas. *Revista Ecosistemas*, 20(2-3).
- NORRMANN, G. A. & QUARIN, C. L. (1991). Biología reproductiva de especies sudamericanas de andropogon (*gramineae*). *Bol. Soc. Argent. Bot*, 27(1-2), 85-90.
- NÚÑEZ-AVELLANEDA, L. A., & ROJAS-ROBLES, R. (2008). Reproductive biology and pollination ecology of the milpesos palm *Oenocarpus bataua* in the Colombian Andes. *Caldasia*, 30(1), 101-125.
- PADILLA, F. A., & VALENZUELA, L. R. (2008). Estudio de la Producción Polínica del olivo (*Olea europaea* L.). *Iniciación a la Investigación*, (3).
- PINNEY, K., & POLITO, V. S. (1989). Olive pollen storage and in vitro germination. *In International Symposium on Olive Growing* 286 (pp. 207-210).
- RAJORA, O. P., & ZSUFFA, L. (1986). Pollen viability of some *Populus* species as indicated by in vitro pollen germination and tetrazolium chloride staining. *Canadian Journal of Botany*, 64(6), 1086–1088.
- RIATIGA, F., & MIGUEL, A. (2013). Evaluación del efecto de la polinización manual en la fecundación de flores y cuaje de frutos en el cultivo de maracuyá (*Passiflora edulis*) en la vereda Espinal municipio los Santos en el departamento de Santander.
- ROVIRA, M.; ALETA, N. (1997). Pistilate flower abscission in walnut cultivars. *Acta Horticulturae*, 442:231-234.
- SAENZ DE RIVAS, C (1978). Polen y esporas. H. Polen y esporas *Blume Ediciones*, Madrid.

SAINI, H. S., & ASPINALL, D. (1982). Abnormal sporogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by short periods of high temperature. *Annals of Botany*, 49(6), 835-846.

SHIVANNA K.R, LINSKENS HF & CRESTI M (1991). Pollen viability and pollen vigor. *Theor Appl Genet*. 81(1) 38-42.

SHIVANNA, K. R., & RANGASWAMY, N. S. (2012). Pollen biology: a laboratory manual. *Springer Science & Business Media*.

STANLEY, R.G., & LINSKENS, H.F. (1974). Pollen: Biology, Biochemistry and Management. *Springer*, Berlin, Alemania.

SUÁREZ RIZZO, C., REJÓN GARCÍA, J., ALCHE RAMÍREZ, J., CASTRO LÓPEZ, A., & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. (2010). Evaluación de diferentes métodos para estimar la calidad del polen en distintos cultivares de olivo (*Olea Europaea* L.). *Polen*, 20, 60–72.

SULUSOGLU, M., & CAVUSOGLU, A. (2014). In vitro pollen viability and pollen germination in cherry laurel (*Prunus laurocerasus* L.). *The Scientific World Journal*.

TIAN, J., LIU, K., & HU, G. (2004). Pollination ecology and pollination system of *Impatiens reptans* (*Balsaminaceae*) endemic to China. *Annals of botany*, 93(2), 167-175.

VALERO, S., & CAHIA, G. (2002). Polinosis. Polen y alergias.

VÉITEZ CORTIZO, E. (1952). El uso del cloruro 2, 3, 5-trifeniltetrazolium para determinar la vitalidad del polen. In *Anales del edafología y fisiología vegetal* (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, ed.). Madrid: *Digital. CSIC*, pp.1033-1004.

ZHANG, Q. ET AL. (2020). Interaction Between AtCML9 and AtMLO10 Regulates Pollen Tube Development and Seed Setting. *Frontiers in plant science. Frontiers in Plant Science*.