



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Biología de la reproducción en plantas: Análisis de viabilidad del polen de especies amenazadas

FRANCISCO JAVIER LARA LÓPEZ

JUNIO 2016 (JAÉN)



UNIVERSIDAD DE JAÉN



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Grado en Ciencias Ambientales

Trabajo Fin de Grado

Biología de la Reproducción en Plantas: Análisis de viabilidad del polen de especies amenazadas

FRANCISCO JAVIER LARA LÓPEZ

JUNIO 2016 (JAÉN)

ÍNDICE

Páginas

1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	5
3. OBJETIVOS	11
4. JUSTIFICACIÓN	11
5. MATERIAL Y METODOLOGÍA	12
5.1 Estimación del número de granos de polen por flor:	12
5.2 Test de tretrazolium:.....	13
5.3Test de fluoresceína:.....	14
6. RESULTADOS	15
7. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	29
8. CONCLUSIONES.....	31
9. BIBLIOGRAFÍA	32

1. RESUMEN

Los estudios sobre la viabilidad del polen son considerados una prioridad para entender la reproducción de las especies vegetales. Además, son indispensables en la implementación exitosa de programas de conservación y asegurar una abundante producción de semillas.

En nuestro estudio vamos a estudiar las distintas posibilidades para la estimación de la viabilidad del polen, de algunas de las especies de vegetales endémicas, amenazadas de la zona. Las técnicas utilizadas para la viabilidad son: la estimación del número de granos de polen por flor, el test de tretrazolium, consiste en una tinción que es relativamente sencilla, con la cual, se ha obtenido una buena correlación entre el polen que es viable del polen que no lo es y el test de fluoresceína.

Los resultados que hemos obtenido nos indican que los dos últimos métodos utilizados son más efectivos para la determinación de la calidad del polen.

PALABRAS CLAVE

Calidad del polen, test de tretrazolium, test de fluoresceína, viabilidad.

ABSTRACT

The studies on the viability of the pollen are considered to be a priority to understand the reproduction of the vegetable species. In addition, they are they are unavoidable in the successful implementation of programs of conservation and to assure an abundant production of seeds.

In our survey we are going to study the different possibilities for the estimation of the viability of the pollen, of some of plant species of the area. The technologies used for the viability are: the estimation of the number of grains of pollen for flower, the test of tretrazolium, consisting on a relatively simple staining, with which, a good correlation between the viable pollen and non-viable pollen has been obtained. Furthermore, a test with fluorescein has been carried out.

The obtained results indicate that the last two methods are more effective for the determination of the quality of the pollen.

KEY WORDS

Quality of the pollen, test of tretrazolium, test of fluorescing, viability.

2. INTRODUCCIÓN

La calidad del polen es un parámetro fundamental para los estudios relacionados con la biología de la polinización. Además, las plantas silvestres pueden ser usadas en términos de perfeccionamiento genético convencional, resulta deseable conocer su compatibilidad en cruzamientos con plantas cultivadas, en cuanto a la posibilidad de hibrida y características de fertilidad de la descendencia, para ello es necesario conocer la fertilidad de las especies silvestres (Stelly et al., 1990) mencionado en el estudio de “Viabilidad de polen en una línea de girasol cultivado, en el girasol silvestre (*Helianthus annuus* L. ssp. *texanus* Heiser) y en su descendencia híbrida).

Con este estudio pretendemos determinar la tasa de productividad polínica que poseen diferentes especies autóctonas y amenazadas de la provincia de Jaén así como conocer su fertilidad inicial basada en la viabilidad de su polen.

Las especies a tratar para la viabilidad del polen son: *Moricandia moricandioides* subsp. *giennensis* (Fig.1) y *Moricandia moricandioides* subsp. *moricandioides* (Fig.2) las cuales se recogieron de forma silvestre, mientras que *Erysimum popovii* (Fig.3), *Digitalis obscura* subsp. *obscura* (Fig.4), *Salvia lavandulifolia* (Fig.5), *Santolina elegans* (Fig.6) y *Digitalis mariana* subsp. *mariana* (Fig.7) se obtuvieron las muestras del Jardín de Flora Autóctona de la Universidad de Jaén.

Las descripciones de las especies citadas anteriormente se ha hecho atendiendo a (Blanca & col., 2011.). Además para determinar su abundancia se utilizan las categorías, basadas en la propuesta de Willmanns & Rasbach (1973), Observations on the Pteridophyta of Sao Miguel, Açores, Brit. Fern Gaz. 10: 315–329.

Finalmente para saber su grado de vulnerabilidad se utilizan las categorías de la UICN (2001), Categorías y criterios de la Lista Roja de la UICN: Versión 3.1, UICN, Gland, Suiza y Cambridge.

➤ *Moricandia moricandioides* subsp. *giennensis*. (Valdés Berm)



Fig.1 *Moricandia moricandioides* subsp. *giennensis*

Especie de la familia *Brassicaceae*. Planta anual. Tallos de hasta 65 cm, erectos, ramosos y leñosos en la base. Hojas basales no claramente arrosetadas, obovadas, obtusas en el ápice, con base más o menos acorazonada, de 10-20 flores, con eje no flexuoso. Pétalos 21-29 mm y lilas. Florece de Marzo a Junio y suele crecer en suelos margosos en zonas de Cazorla, Mágina, Granada, Vélez–Baza y Ronda. Suele aparecer de forma ocasional pero nunca llega a ser abundante, por esa razón se encuentra en estado de preocupación menor.

➤ *Moricandia moricandioides* subsp. *moriciandioides* (Boiss.) Heywood.



Fig.2 *Moricandia moricandioides* subsp. *moriciandioides*

De la familia *Brassicaceae*. Planta anual con hojas basales de hasta 100 x 50 mm, de obovadas a oblanceoladas. Racimos con 20-40 flores. Pedicelos en la antesis. Sépalos violáceos. Pétalos púrpura-violados. Nectarios laterales semilunares. Silicuas de 80-105 mm, subcilíndricas, con 35-55 semillas uniseriadas por cavidad. Semillas de (1,2-) 1,5-2 mm, elipsoideas, aladas, de pardo-oscuros a negruzcas. Florece de Marzo a Junio. Presente en gran parte del territorio español, suele ser muy común y con lo cual, su estado de preocupación es menor.

➤ *Erysimum popovii*. (Rothm).



Fig.3 *Erysimum popovii*

Esta especie se encuentra dentro de la familia *Brassicaceae*. Planta perenne, policárpica. Tallos floríferos, erectos o ascendentes, generalmente fasciculados en puntos de una cepa ramificada. Pétalos de color entre rosa purpúreo y morado. Estigma subcapitado-bilobulado. Frutos erectos, blanquecinos por el indumento. Florece de mayo a julio. Debido a que la podemos encontrar de forma ocasional, dicha especie se encuentra casi amenazada en nuestro territorio.

➤ *Digitalis obscura subsp. obscura* L.



Fig.4 *Digitalis obscura subsp. obscura*

La *Digitalis obscura subsp. obscura* es de la Familia *Veronicaceae*. Hierbas perennes o bienales. Flores con pedicelo de curvado-erecto. Cáliz con sépalos de sublinguales, ovado-elípticos o elíptico-lanceolados. Florece de abril a junio. Solemos encontrar esta especie en Cazorla, Mágina, Granada, Trevenque–Almijara, Vélez–Baza, Nevada–Filabres, Alpujarras, Ronda por lo cual, es bastante frecuente y su grado de vulnerabilidad es mínimo.

➤ *Santolina elegans* (Boiss)



Fig.5 *Santolina elegans*

De la familia *Asteraceae*. Planta cespitosa, de blanco-tomentosa a serícea. Flores flosculosas, con tubo saquiforme que oculta parte del ovario. Aquenio sin vilano, anguloso, marrón-grisáceo. Florece de abril a junio. Es una especie muy rara, (con

pocas poblaciones que incluyen pocos individuos) y vulnerable. Podemos encontrarla en sierras como la de Cazorla (Sierra de la Cabrilla, Sierra del Pozo, Jaén), Trevenque–Almijara (Sierra Nevada calcárea, Granada), alcanzando Sierra de la Taibilla (Albacete) y Sierra de Moratalla (Murcia).

➤ *Digitalis mariana* subsp. *mariana* (Boiss.) Rivas Goday



Fig.6 *Digitalis mariana* subsp. *mariana*.

Dicha especie se encuentra dentro de la familia *Asteraceae*. Es una hierba perenne, a menudo cespitosa, tomentosa o lanosa, con indumento blanquecino o grisáceo formado por pelos tectores y glandulíferos. Cepa leñosa, ramificada, con rosetas de hojas. Flores con pedicelode 6-15 mm, recto o sinuoso, tan largo o más largo que la bráctea. Florece de abril a junio. Endemica de Sierra Morena, suele ser rara (especie con varias localidades, pero escasa, o especie con pocas localidades pero abundante).

- *Salvia lavandulifolia*. Rivas Goday & Rivas–Mart.

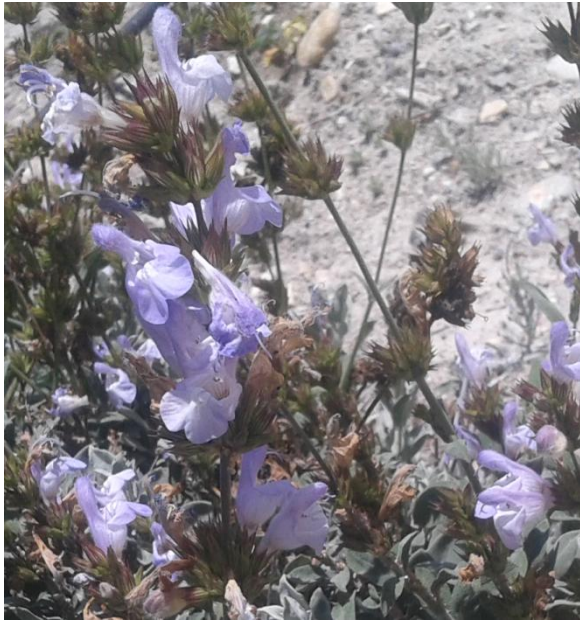


Fig.7 *Salvia lavandulifolia*

Esta especie se encuentra dentro de la familia *Lamiaceae* . Es un subarbusto 17-100 cm. Tallos ramificados, con pelos tectores de densidad variable, a veces con pelos glandulares. Hojas simples. Flores con pedicelos de 1-10 mm, no comprimidos, más o menos erecto-patentes. Cáliz , regular o subregular, tubular o campanulado, verde o más o menos teñido de color púrpura violeta. Florece de mayo a junio. La familia *Lamiaceae* es abundante en la península ibérica oriental, con lo que su estado de vulnerabilidad es casi nulo.

HIPOTESIS DEL TRABAJO

Con este estudio nos interesaba conocer la viabilidad y productividad del polen, existente en distintas especies vegetales amenazadas de la provincia de Jaén.

Para ello se utilizaron distintos métodos para conocer la calidad del polen: productividad de polen por flor, test de tretrazolium y test de fluoresceína.

3. OBJETIVOS

- Estudio de la biología de la reproducción en plantas mediante el análisis de viabilidad del polen de especies amenazadas.
- Obtención de la productividad de polen por flor.
- Determinación la viabilidad del polen de distintas especies autóctonas amenazadas de la provincia de Jaén.
- Cuantificar la pérdida de viabilidad a los largo del tiempo.

4. JUSTIFICACIÓN

La realización de este estudio es debido, al poco conocimiento existente de las especies vegetales que hemos seleccionado y a la falta de su conocimiento de su biología reproductiva que puede afectar a la abundancia de dichas especies en estado silvestre.

También, dichos estudios de viabilidad son utilizados para la conservación y recuperación de las especies autóctonas, tal y como se cita en el estudio realizado por E.Rodríguez García, Sánchez-Gómez & J. F. Jiménez Martínez “(Directrices de gestión y conservación de *Helianthemum guerrae* en el marco de la microreserva botánica “arenal es del rincón de los donceles (calasparra)”

5. MATERIAL Y METODOLOGÍA

Modelo experimental y diseño del estudio:

Se estudia la viabilidad del polen de las especies *Moricandia moricandioides subsp. giennensis* (Fig.1) y *Moricandia moricandioides subsp. moricandioides* (Fig.2) *Erysimum popovii* (Fig.3), *Digitalis obscura subsp. obscura* (Fig.4), *Salvia lavandulifolia* (Fig.5), *Santolina elegans* (Fig.6) y *Digitalis mariana subsp. mariana* mediante las técnicas de test de tretrazolium, test de fluoresceína, y el recuento de granos de polen por flor.

5.1 Productividad de granos de polen por flor:

Se estima mediante la producción de polen por antera. Se recogen tres flores al azar, cada una de un individuo diferente dentro de la población escogida, además, con cada flor se realizaron dos replicas.

Para la elaboración se colocan las anteras de la flor de cada individuo en un tubo Eppendorf, el cual, contiene 300µl de solución de agua destilada con etanol (70%) y azul de metileno (0.5%). Se maceran y agitan las anteras para la homogenización de la muestra.

Finalmente se toman alícuotas de 15 µl de la muestra con una pipeta y se coloca sobre un porta objetos, el cual cubrimos, llevamos al microscopio y procedemos al conteo, el cual, se extrapolara posteriormente por la cantidad total de solución realizada inicialmente para obtener la cantidad total de polen por flor y por antera.

En futuros estudios sería interesante conocer el grado de xenogamia de las distintas especies, ya que la xenogamia permite la variabilidad genética dentro de la especie y la formación de nuevos genotipos (y fenotipos) capaces de adaptarse a nuevos hábitats.

5.2 Test de tretrazolium:

Este método se basa en la reducción de una sal incolora a una sustancia coloreada en presencia de una enzima llamada deshidrogenasa (Cook y Stanley 1960) citado en “Estudio del flujo polínico atmosférico y fenología floral del olivo en la provincia de Jaén: aplicación para la creación de modelos de predicción de fruto.” que refleja tanto la actividad enzimática, como la capacidad respiratoria del grano de polen. Se utiliza para diferenciar tejidos metabólicamente activos de aquellos que han perdido la actividad como consecuencia de una degradación o desnaturalización de las enzimas.

Para no producir error en las muestras, estas se sellaban totalmente para que no entrara el aire del exterior, también no se tomaban como representativo el polen dentro o fuera de las burbujas de aire que hubieran entrado durante la preparación de la muestra, ya que este hubiera reaccionado tiñéndolo y sería incorrecto.

Debido a lo anteriormente comentado, el polen que no se encuentre en los lugares señalados serán los que tomaremos como representativos de la muestra.

Si la enzima esta activa se produce la sal de tretrazolio y precipita sobre la cubierta de los granos de polen tiñéndolos de color pardo-rojizo.

Para la elaboración de la muestra primero depositamos los granos de polen de una flor sobre un porta objetos, después le echamos la solución preparada de tretrazolium, la cual, se realiza mediante una solución de sacarosa al 5% y al 10% a la que se le añade 0,5% de 2,3,5- trifenil tretrazolium clorido.

Finalmente se cubre la muestra dejándola en oscuridad durante 24 horas y se procede al conteo de los granos de polen viables frente a los no viables.

Este test se realiza mediante dos replicas con dos flores de diferentes individuos de una población, además, se realizará este método durante los días sucesivos (un día después, a los tres días y a los 7 días) para ver cuanta viabilidad pierde. Estas pruebas se realizaran con flores recogidas dentro de individuos de la misma

población que fueron recogidas el mismo día en el que se realizó el primer test (día 0).

5.3 Test de fluoresceína:

La viabilidad del polen se determina tratando las células con diacetato de fluoresceína según el método de Widholm (1972).

El test de fluoresceína se fundamenta en la integridad de la membrana plasmática, la cual, permite el paso del diacetato, pero impide la salida del mismo. Si la membrana está intacta el diacetato se concentra en el interior aportando luminosidad a los granos del polen. Por lo contrario si la membrana plasmática se encuentra dañada la solución de diacetato no es retenido, con lo que se produce una entrada y salida al mismo tiempo de este, impidiendo que el polen se ilumine.

La preparación de la solución se realiza mediante la suma de dos soluciones: una solución de 10ml de agua destilada, a la cual, se le añade el 10% de sacarosa y otra solución de 10ml de acetona con 20mg de diacetato de fluoresceína.

Una vez realizada la solución, se echa el polen de la flor en un porta objetos y se mezcla con unas dos o tres gotas de esta solución, finalmente se cubre y se deja reposar en oscuridad unos 3 minutos para que la fluoresceína haga efecto y entre dentro de la célula y se lleva a un microscopio de fluorescencia donde se procede al conteo del polen viable frente al que no lo es.

Además, para tomar como referencia la luminiscencia en la cual el polen es viable, se tomo como referencia la luminiscencia natural que presentaba el polen. Todo ello se realizó el mismo día en el que se recogieron las distintas especies.

6. RESULTADOS

En este apartado vamos a tratar lo obtenido de los tratamientos utilizados para el estudio de la viabilidad del polen.

En este apartado se mostrará los resultados obtenidos de los tratamientos utilizados para el estudio de la viabilidad del polen en (*Moricandia moricandioides subsp. giennensis* y *Moricandia moricandioides subsp. moricandioides*, *Erysimum popovii*, *Digitalis obscura subsp. obscura*, *Salvia lavandulifolia*, *Santolina elegans* y *Digitalis mariana subsp. mariana*).

- *Moricandia moricandioides subsp. giennensis*: especie recogida en las cercanías de Mancha Real (Jaén) a primeras horas de la mañana (09:00) para poder asegurar un óptimo estado de las flores y permita un mayor rendimiento del polen.
- *Moricandia moricandioides subsp. moricandioides*: al igual que la especie anterior, esta fue recogida el mismo día y básicamente con el mismo procedimiento, ya que pretendemos que la muestra esté en condiciones optimas.

Para concluir, destacar que ambas especies (*Moricandia moricandioides subsp. Giennensis* y *Moricandia moricandioides subsp. moricandioides*) fueron comparadas para ver si existían diferencias significativas tanto en la producción como en la viabilidad del polen.(Tabla 1,2,3)(Diagrama1)(Ilustración 1)

Productividad de granos de polen por flor:

	Cantidad de polen en alícuota	Cantidad de polen total en la flor	Cantidad de polen por antera
<i>subsp. Giennensis</i>	1148	22960	5740
<i>subsp. moriciandoides</i>	1590	31800	7950

Tabla 1. Granos de polen total por flor y por antera de *Moricandia moriciandoides subsp. giennensis* y *Moricandia moriciandoides subsp. moriciandoides*.

En la tabla 1, se muestra la productividad de polen por flor y por antera para las especies *Moricandia moriciandoides subsp. giennensis* y *Moricandia moriciandoides subsp. moriciandoides* las cuales nos interesa comparar ya que pertenecen a la misma familia y genero.

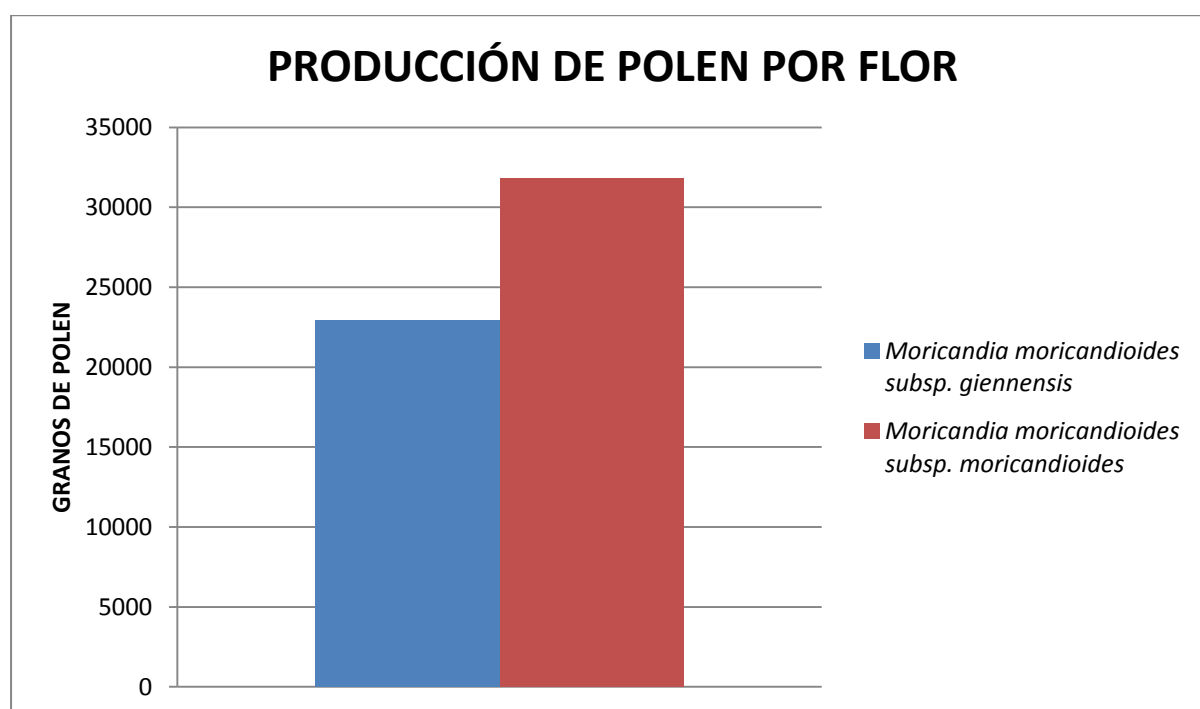


Diagrama 1 Comparación de la cantidad de polen por flor en *Moricandia moriciandoides subsp. giennensis* y *Moricandia moriciandoides subsp. moriciandoides*.

En este diagrama 1, se compara la producción de polen por flor de las distintas subespecies de *Moricandia moriciandoides* (*Moricandia moriciandoides subsp. giennensis* y *Moricandia moriciandoides subsp. moriciandoides*).

Se puede observar a simple vista que *Moricandia moricandioides subsp. moricandioides* tiene en sus flores una mayor productividad de granos de polen. Una mayor productividad de polen favorece a la propagación de la especie, con lo que debido a esto, se puede suponer que la abundancia de *Moricandia moricandioides subsp. moricandioides* sea mayor en el ecosistema.

Resultados del test de tretrazolium: la muestra debe contener al menos 300 granos de polen para que esta sea representativa.

	<i>Moricandia moricandioides subsp. giennensis</i>		<i>Moricandia moricandioides subsp. moricandioides</i>	
	Viabilidad al 5%	Viabilidad al 10%	Viabilidad al 5%	Viabilidad al 10%
Día 0	97,44%	96,81%	94,36%	97,19%
Día 1	94,94%	95,53%	95,88%	96,63%
Día 3	56,53%	59,90%	47,44%	62,71%
Día 7	4,46%	11,14%	3,34%	13,57%

Tabla 2. Viabilidad del polen a distintas concentraciones de sacarosa en *Moricandia moricandioides subsp. giennensis* y *Moricandia moricandioides subsp. moricandioides* a lo largo del periodo de estudio.

En la tabla 2, se observa la pérdida de viabilidad a lo largo de los siete días para ambas subespecies de *Moricandia moricandioides* con distintas concentraciones de sacarosa. También, se aprecia que la pérdida de viabilidad ocurre más rápidamente a concentraciones de sacarosa menores.

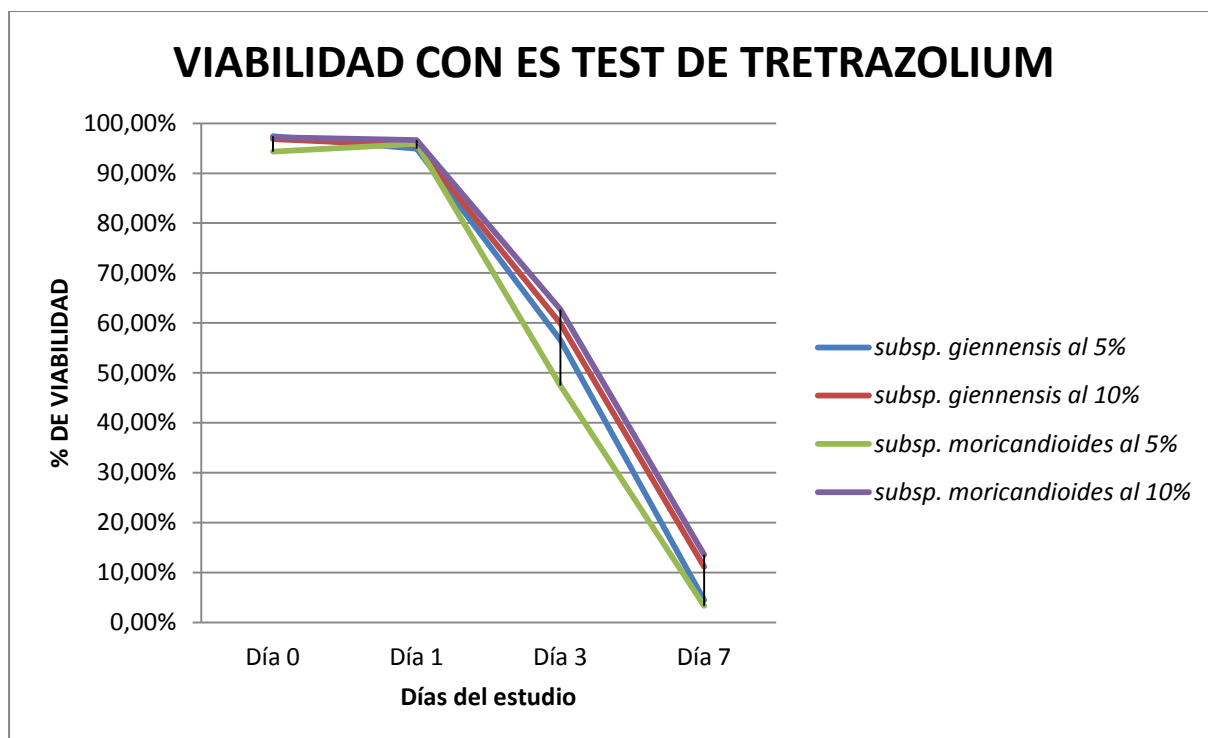


Ilustración 1. Comparación de la viabilidad del polen para concentraciones al 10% y 5% de sacarosa de las especies *Moricandia moricandioides subsp. moricandioides* y *Moricandia moricandioides subsp. giennensis*.

En esta ilustración durante las primeras 24 horas la viabilidad del polen en ambas especies ronda el 100%, sin embargo a partir del segundo día se produce un descenso muy rápido de la viabilidad llegando al tercer día al 50% de polen fértil, a partir de este punto en los días próximos se va a seguir reduciendo hasta llegar a un punto donde es totalmente inviable.

Además, a comparar las distintas subespecies de *Moricandia moricandioides* podemos observar como en el séptimo día a concentraciones al 10% de sacarosa las especies mantienen la viabilidad de polen por encima del umbral del 10% el cual nos indica que este todavía no se considera totalmente inviable, a diferencia de concentraciones con sacarosa al 5% en las cuales, su polen es inviable en ambas subespecies.

También se demuestra como *Moricandia moricandioides subsp. moricandioides* presentan una concentración mayor de polen frente a la especie *Moricandia moricandioides subsp. giennensis*, aunque la diferencia no es demasiada puede ser una causante de la abundancia de las mismas en los ecosistemas.

Resultados del test de fluorescencia: consideramos que la muestra es representativa cuando contiene como mínimo 300 granos de polen.

	<i>Moricandia moricandioides subsp. giennensis</i>	<i>Moricandia moricandioides subsp. moricandioides</i>
	Viabilidad total	Viabilidad total
Campo 1	100,00%	98,99%
Campo 2	97,69%	100,00%
Campo 3	99,20%	99,12%

Tabla 3. Viabilidad de *Moricandia moricandioides subsp. giennensis* y *Moricandia moricandioides subsp. moricandioides* con el test de fluoresceína.

La viabilidad obtenida nos indica que a través del test de fluoresceína muestran que ambas especies tienen el mismo comportamiento, además de presentar una viabilidad similar.

- *Digitalis obscura subsp. obscura*: esta especie fue recogida en el Jardín de Flora Autóctona de la Universidad de Jaén, durante las primeras horas de la mañana cuando la productividad de polen se encontraba en su mejor momento.
- *Digitalis purpurea subsp. mariana*: extraída también del Jardín de Flora Autóctona de la Universidad de Jaén y presentaba una menor cantidad de flores que *Digitalis obscura subsp. obscura*.

Ambas especies fueron tratadas de la misma forma para todos los test de viabilidad realizados, además de la producción de polen para cada una de ellas.(Tabla 4,5,6)(Diagrama 2) (Ilustración 2).

Productividad de granos de polen por flor:

	Cantidad de polen en alícuota	Cantidad de polen total en la flor	Cantidad de polen por antera
<i>subsp. obscura</i>	1493	29860	7465
<i>subsp. mariana</i>	1711,5	34230	8557,5

Tabla 4. Granos de polen total por flor y por antera de *Digitalis obscura subsp. obscura* y *Digitalis mariana subsp. mariana*.

En esta tabla 4, se compara la capacidad productiva de polen de de *Digitalis obscura subsp. obscura* y *Digitalis mariana subsp. mariana*. Se observa como *Digitalis mariana subsp. mariana* presenta una pequeña cantidad superior de polen.

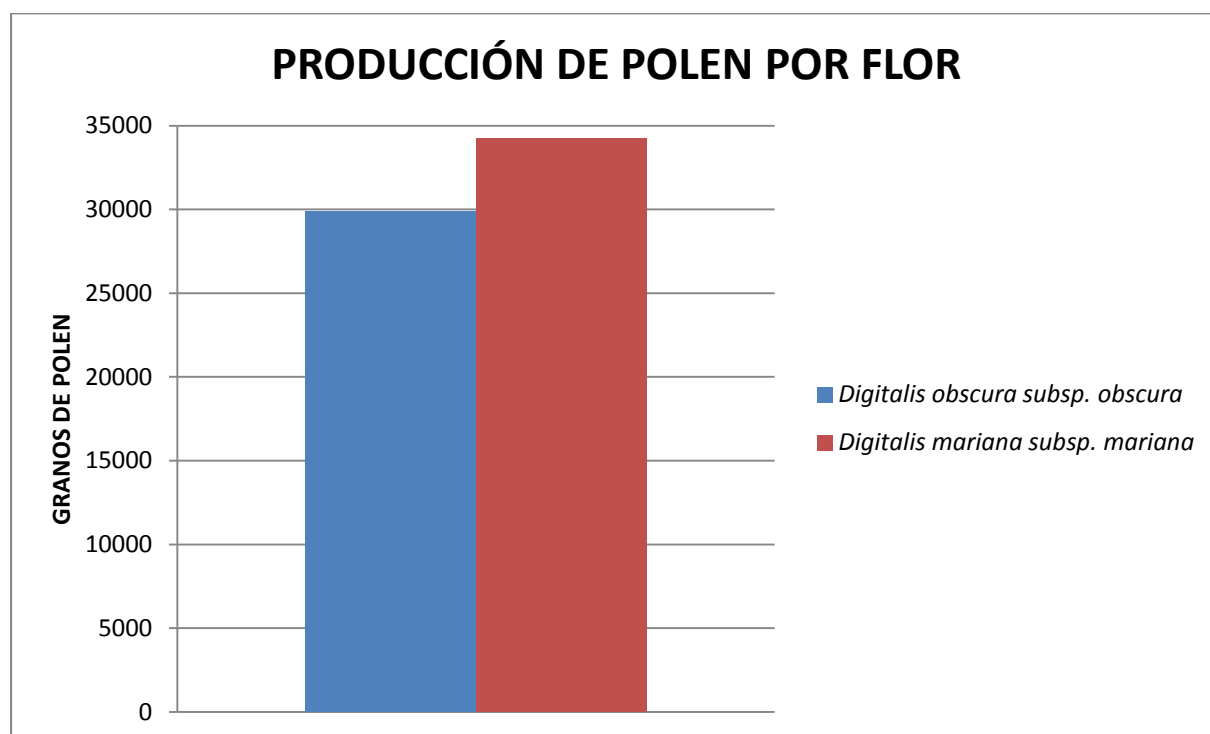


Diagrama 2 Comparación de la cantidad de polen por flor en *Digitalis obscura subsp. obscura* y *Digitalis mariana subsp. mariana*.

En este diagrama comparamos ambas especies del mismo género para conocer cuál de ellas tiene una mayor productividad de polen. Se puede observar que la especie *Digitalis mariana subsp. mariana* presenta mayor cantidad de polen por flor, pero esto no nos indica que sea más o menos viable.

Resultados del test de tretrazolium: la muestra debe contener al menos 300 granos de polen para que esta sea representativa.

	<i>Digitalis obscura subsp. obscura</i>		<i>Digitalis mariana subsp. mariana</i>	
	Viabilidad al 5%	Viabilidad al 10%	Viabilidad al 5%	Viabilidad al 10%
Día 0	95,20%	95,65%	96,83%	97,27%
Día 1	95,32%	94,50%	96,13%	95,08%
Día 3	60,49%	61,75%	50,15%	57,68%
Día 7	3,00%	2,36%	3,21%	2,09%

Tabla 5. Viabilidad del polen a distintas concentraciones de sacarosa en *Digitalis obscura subsp. obscura* y *Digitalis mariana subsp. mariana* a lo largo del periodo de estudio.

La tabla 5, nos muestra como la viabilidad de polen a lo largo del tiempo y a distintas concentraciones de sacarosa es muy similar entre *Digitalis obscura subsp. obscura* y *Digitalis mariana subsp. mariana*.

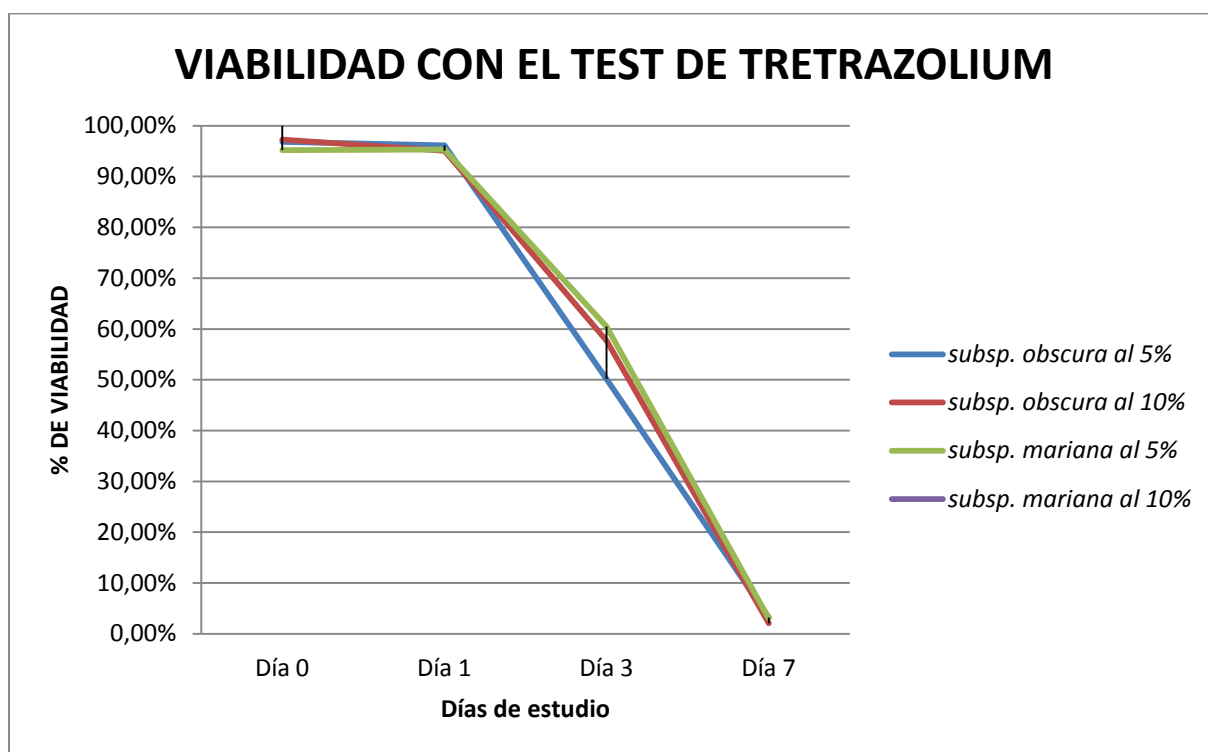


Ilustración 2. Comparación de la viabilidad del polen para concentraciones al 10% y 5% de sacarosa de las especies *Digitalis obscura subsp. obscura* y *Digitalis mariana subsp. mariana*.

La ilustración 2, se representa mediante una grafica el comportamiento de la viabilidad de polen a distintas concentraciones de sacarosa para las especies *Digitalis obscura subsp. obscura* y *Digitalis mariana subsp. mariana*. Como se puede apreciar a concentraciones de sacarosa del 10% la viabilidad del polen es similar para *Digitalis mariana subsp. mariana* y *Digitalis obscura subsp. obscura*.

En comparación con a concentraciones del 5% la especie *Digitalis mariana subsp. mariana* ve reducida su porcentaje de polen viable frente a *Digitalis obscura subsp. obscura*. Esta puede ser una de las razones por la cual *Digitalis mariana subsp. mariana* se encuentra en menos lugares en la provincia de Jaén y por lo tanto su estado de vulnerabilidad sea mayor, a causa de la competencia intraespecifica con *Digitalis obscura subsp. obscura*.

Resultados del test de fluorescencia: consideramos que la muestra es representativa cuando contiene como mínimo 300 granos de polen.

	<i>Digitalis obscura subsp. obscura</i>	<i>Digitalis mariana subsp. mariana</i>
	Viabilidad total	Viabilidad total
Campo 1	99,03%	99,28%
Campo 2	100,00%	100,00%
Campo 3	99,15%	98,52%

Tabla 6. Viabilidad de *Digitalis obscura subsp. obscura* y *Digitalis mariana subsp. mariana* con el test de fluoresceína.

La representación de los resultados obtenidos del test de fluoresceína (tabla 6) son muy parecidos para ambas especies, lo que nos indica que la realización de este método para las especies *Digitalis obscura subsp. obscura* y *Digitalis mariana subsp. mariana* no existe diferencia alguna en su viabilidad.

- *Erysimum popovii*: esta especie se encuentra en zonas concretas de Andalucía oriental y en escaso número, con lo cual es interesante ver su fertilidad para la conservación de dicha especie. (Tabla 7,8,9)(Ilustración 3).

Productividad de granos de polen por flor:

	Cantidad de polen en alícuota	Cantidad de polen total en la flor	Cantidad de polen por antera
<i>Erysimum popovii</i>	859,5	17190	4297,5

Tabla 7. Granos de polen total por flor y por antera de *Erysimum popovii*.

En la tabla 7, se muestra la productividad de polen obtenido en cada flor de *Erysimum popovii*.

Resultados del test de tretrazolium: la muestra debe contener al menos 300 granos de polen para que esta sea representativa.

<i>Erysimum popovii</i>		
	Viabilidad al 5%	Viabilidad al 10%
Día 0	97,43%	98,78%
Día 1	96,63%	97,97%
Día 3	53,01%	59,94%
Día 7	2,01%	0,96%

Tabla 8. Viabilidad del polen a distintas concentraciones de sacarosa en *Erysimum popovii* con el test de tretrazolium.

Los resultados obtenidos de la perdida de viabilidad a lo largo del tiempo para *Erysimum popovii* son similares para diferentes concentraciones de sacarosa, con lo cual, podemos confirmar que la sacarosa no influye en la calidad del polen de dicha especie.

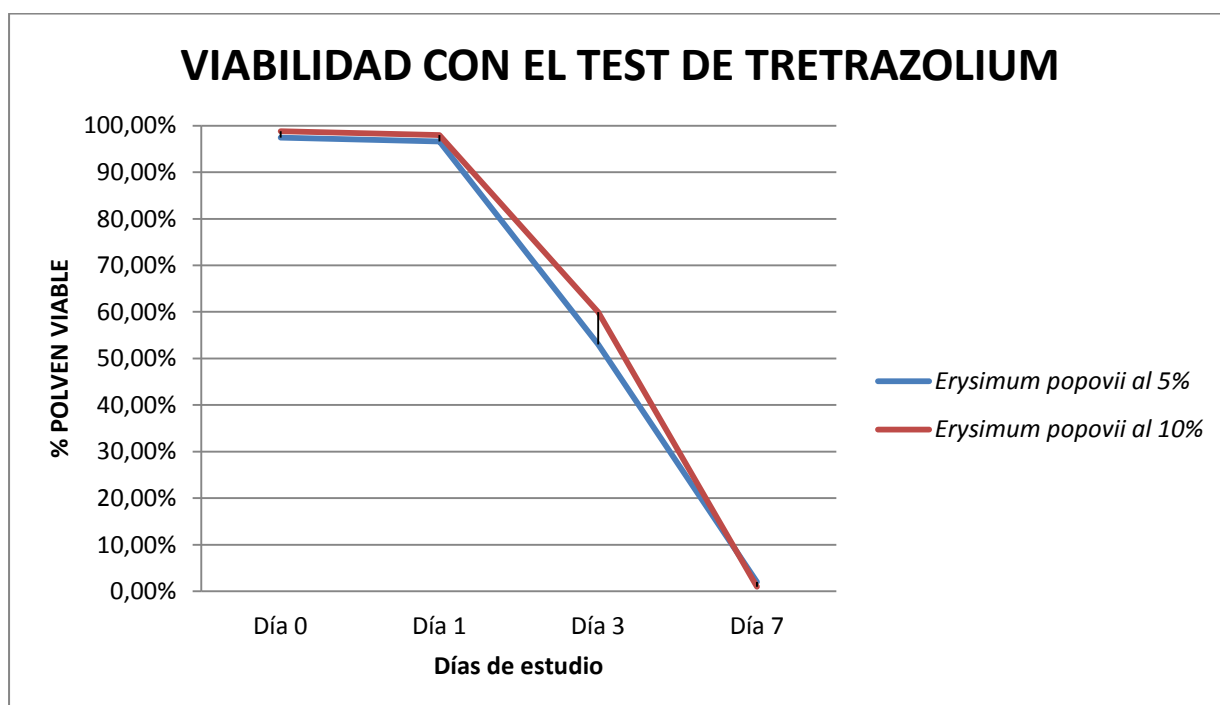


Ilustración 3. Viabilidad del polen según la concentración de sacarosa de *Erysimum popovii*.

En la siguiente ilustración 3, nos encontramos como en *Erysimum popovii* la viabilidad de polen es prácticamente el 100% durante las primeras 24 horas y va decreciendo más lentamente a lo largo de los días posteriores en comparación con otras especies anteriormente mencionadas.

Además, las concentraciones de sacarosa no afectan en gran medida a la viabilidad del polen al séptimo día, pero durante los días anteriores a concentraciones de 5% de sacarosa los niveles de polen fértil son más bajos que los que nos encontramos con una concentración de sacarosa a 10%.

Resultados del test de fluorescencia: consideramos que la muestra es representativa cuando contiene como mínimo 300 granos de polen.

	%Polen Viable
Campo 1	99,27%
Campo 2	100,00%
Campo 3	100,00%

Tabla 9. Viabilidad de *Erysimum popovii* con el test de fluoresceína.

- *Salvia lavandulifolia*: dicha especie está presente en gran parte de la Península Ibérica sobre todo en la parte Oriental de esta, también se encuentra en la parte Oriental de Andalucía. Fue recogida en el Jardín de Flora Autóctona de la Universidad de Jaén, en las primeras horas de la mañana. (Tabla 10,11,12)(Ilustración 4)

Productividad de granos de polen por flor:

	Cantidad de polen en alícuota	Cantidad de polen total en la flor	Cantidad de polen por antera
<i>Salvia lavandulifolia</i>	1235	24700	6175

Tabla 10. Granos de polen total por flor y por antera de *Salvia lavandulifolia*.

La productividad de polen obtenida de *Salvia lavandulifolia* tiene unos valores similares a otras especies mencionadas, con lo que su fertilidad puede ser también elevada.

Resultados del test de tretrazolium: la muestra debe contener al menos 300 granos de polen para que esta sea representativa.

<i>Salvia lavandulifolia</i>		
	Viabilidad al 5%	Viabilidad al 10%
Día 0	95,08%	96,05%
Día 1	92,86%	95,32%
Día 3	62,07%	65,85%
Día 7	0,57%	0,81%

Tabla 11. Viabilidad del polen a distintas concentraciones de sacarosa en *Salvia lavandulifolia* con el test de tretrazolium.

En la tabla 11, se muestra los resultados obtenidos de la realización del test de tretrazolium para la especie *Salvia lavandulifolia* en la cual, durante las primeras 48 horas la viabilidad de este polen se encuentra en buenas condiciones y en gran cantidad. Sin embargo, a partir del tercer día la viabilidad cae rápidamente a ser prácticamente nula.

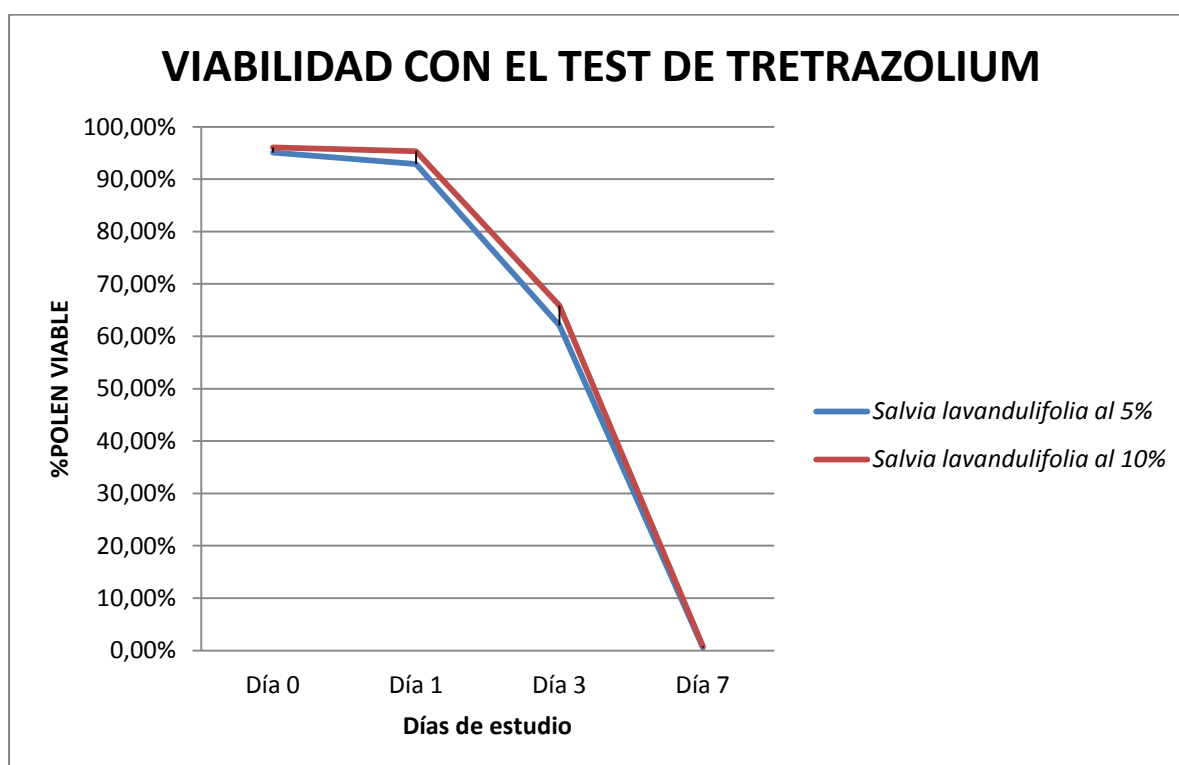


Ilustración 4. Viabilidad del polen según la concentración de sacarosa de *Salvia lavandulifolia*.

En la ilustración anterior podemos observar como la viabilidad del polen en la especie *Salvia lavandulifolia* es similar para ambas concentraciones de sacarosa, con lo cual la concentración de sacarosa no supone un impedimento para la fertilidad del polen. También, durante los primeros días se produce poco descenso

de la perdida de viabilidad de polen, pero a partir del tercer día al septimo la viabilidad cae rapidamente hasta llegar al 0%.

Resultados del test de fluorescencia: consideramos que la muestra es representativa cuando contiene como mínimo 300 granos de polen.

	Viabilidad del polen
Campo 1	99,56%
Campo 2	100,00%
Campo 3	100,00%

Tabla 12. Viabilidad de *Salvia lavandulifolia* con el test de fluoresceína.

En la tabla anterior consideramos que para el test de fluoresceína la viabilidad del polen para la especie *Salvia lavandulifolia* es prácticamente el 100%.

- *Santolina elegans*: pequeña mata herbácea recogida en pequeña cantidad en el Jardín de Flora Autóctona de la Universidad de Jaén, ya que es una especie rara endémica de la provincia de Jaén. (Tabla 13,14,15) (Ilustración 5).

Productividad de granos de polen por flor:

	Cantidad de polen en 15 alícuota	Cantidad de polen total en la flor	Cantidad de polen por antera
<i>Santolina elegans</i>	480	9600	2400

Tabla 13. Granos de polen total por flor y por antera de *Santolina elegans*.

La productividad del polen de *Santolina elegans* representada en la tabla 13, es inferior a la productividad de las distintas especies mencionadas a lo largo del estudio, esto puede ser debido a que se trate de una flor compuesta.

Resultados del test de tretrazolium: la muestra debe contener al menos 300 granos de polen para que esta sea representativa.

	Viabilidad al 5%	Viabilidad al 10%
Día 0	97,47%	94,24%
Día 1	95,81%	95,01%
Día 3	41,45%	53,53%
Día 7	1,26%	0,00%

Tabla 14. Viabilidad del polen a distintas concentraciones de sacarosa en *Santolina elegans* con el test de tretrazolium.

La viabilidad perdida a lo largo de los días para *Santolina elegans* es muy parecidas para las concentraciones de 5% y 10% de sacarosa donde a partir de las 24 horas posteriores la viabilidad del pole decae rápidamente.

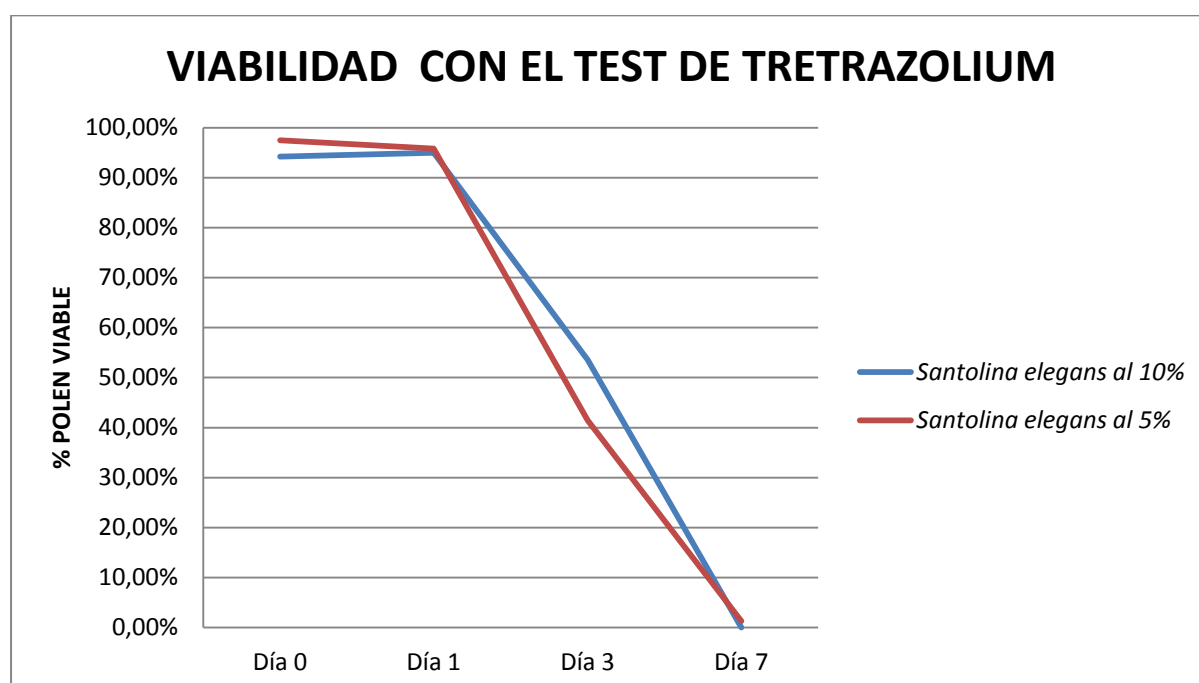


Ilustración 5. Viabilidad del polen según la concentración de sacarosa de *Santolina elegans*.

Podemos observar en la ilustración 5, como en la especie *Santolina elegans* durante el primer día la viabilidad se mantiene elevada para ambas concentraciones de sacarosa, pero al disminuir la concentración de sacarosa, la concentración de polen viable también lo hace hasta reducirse a 0% al séptimo día. Se puede apreciar un fuerte descenso de la fertilidad del polen para una concentración de 5% de sacarosa, que nos indica que esta especie a estas concentraciones ve reducida su viabilidad.

Resultados del test de fluorescencia: consideramos que la muestra es representativa cuando contiene como mínimo 300 granos de polen.

	Granos de polen Viable
Campo 1	99,07%
Campo 2	100,00%
Campo 3	100,00%

Tabla 15. Viabilidad de *Santolina elegans* con el test de fluoresceína.

7. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos tras la productividad de polen por flor, han demostrado una elevada la tasa de producción de polen para las distintas especies de nuestro estudio. Podemos considerar que nuestras especies pueden tener un alto grado de xenogamia debido a su alta productividad de polen.

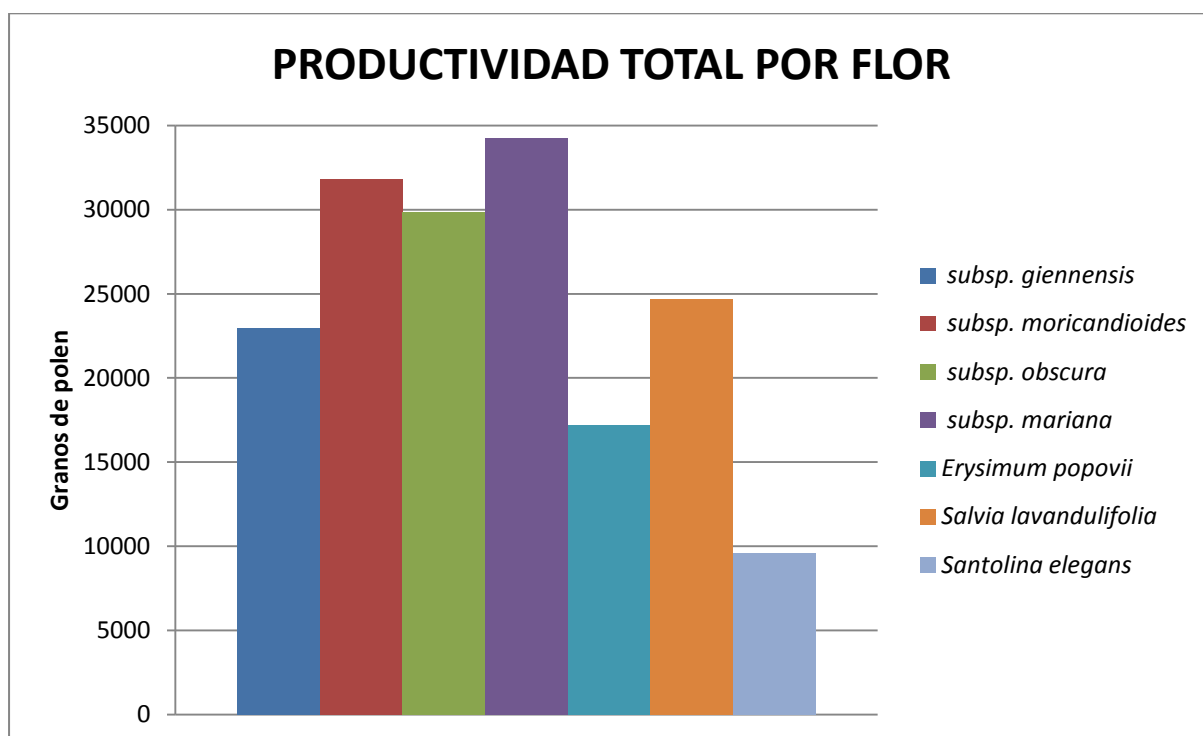


Diagrama 3. Comparación de la productividad de polen en las distintas especies que se han estudiado.

En este diagrama 3, podemos observar la productividad de polen para las distintas especies en las que hemos realizado el estudio. La cantidad de polen influye en que una especie u otra se propaguen más rápidamente por el espacio y con este aumento su abundancia, pero hay que tener en cuenta que la cantidad de polen no quiere decir que todos ellos sean viables.

Hay que destacar la baja productividad de polen obtenida de *Santolina elegans*, esto puede deberse a la dificultad de extracción del polen, debido al reducido tamaño de su flor. A diferencia de la especie que mas productividad ha tenido *Digitalis mariana subsp. mariana*.

De los métodos utilizados (test de tretrazolium, test de fluoresceína), el que mejor resultados nos ha dado y el de mayor fiabilidad, ha sido el método del test de tretrazolium, ya que con este método podemos saber exactamente los granos de

polen que se han teñido a causa de la respiración de estos. También, la pérdida de viabilidad durante el tiempo de los resultados que tenemos han sido acordes a otros estudios similares realizados sobre especies silvestres para su cultivo como *Helianthus annuus subsp. Texanus heiser* o *Nothofagus nervosa* nombrados en el estudio de “Viabilidad del polen en una línea de girasol cultivado, en el girasol silvestre (*Helianthus annuus subsp. Texanus heiser*) y en su descendencia híbrida”, en la que la pérdida de viabilidad de polen mediante el test de tretrazolium iba decreciendo a medida que pasaban los días.

	DÍA 0		DÍA 7	
	5%sacarosa	10%sacarosa	5%sacarosa	10%sacarosa
<i>Moricandia moricandioides subsp. giennensis</i>	97,44%	96,81%	4,46%	11,14%
<i>Moricandia moricandioides subsp. moricandioides</i>	94,36%	97,19%	3,34%	13,57%
<i>Digitalis obscura subsp. obscura</i>	95,20%	95,65%	3,00%	2,36%
<i>Digitalis purpurea subsp. mariana</i>	96,83%	97,27%	3,21%	2,09%
<i>Erysimum popovii</i>	97,43%	98,78%	2,01%	0,96%
<i>Salvia lavandulifolia</i>	95,08%	96,05%	0,57%	0,81%
<i>Santolina elegans</i>	97,47%	94,24%	1,26%	0,00%

Tabla 16. Comparación de la viabilidad al primer y último día de las distintas especies estudiadas.

En la tabla 16, se realiza una comparación de los resultados obtenidos en el primer y último día de la realización del test de tretrazolium el cual nos permite ver la pérdida de viabilidad que se ha producido. Podemos observar como en todas las especies tratadas, en el primer día tienen una alta calidad del polen. Sin embargo en el séptimo día a diferencia del primero la viabilidad es casi nula para todas ellas, excepto para *Moricandia moricandioides subsp. giennensis* y *Moricandia moricandioides subsp. moricandioides* llegando ser superior al 10% del total para una concentración de sacarosa al 10%.

Además, los resultados del test de tretrazolio son semejantes a otros estudios realizados para otros tipos de especies como *Beta vulgaris* citada en el estudio de J.M Lasa, 1975.

Finalmente, con el test de fluoresceína se tuvieron una serie de problemas debido al mal estado de la fuscina lo cual dificultaba la tinción de los pólenes, además con este método puede haber errores debido a que la solución de fluoresceína pudo haber entrado en pólenes los cuales no estaban viables.

8. CONCLUSIONES

Con este estudio tratamos obtener información acerca de la biología reproductiva de algunas especies autóctonas y amenazadas de la provincia de Jaén. Centrándonos en la determinación de la productividad y viabilidad del polen como indicador de la eficiencia reproductora. Los métodos para la realización de dicho estudio son: el test de tretrazolium, el test de fluorescencia y productividad de granos de polen por flor.

Por ello, vamos a tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- 1.- La productividad de polen que se ha obtenido ha sido elevada para la mayoría de las especies. La especie con menos productividad ha sido *Santolina elegans* (9600 granos por flor) a diferencia con la especie que más tiene *Digitalis mariana subsp. mariana* (34230 granos por flor).
- 2.- Tras la realización de todos los métodos el que mejor ha respondido para el estudio de la viabilidad ha sido el test de tretrazolium. Debido a, que ha sido el más efectivo y con el que mejores resultados se ha obtenido, el cual, nos ha permitido saber con exactitud la viabilidad del polen con casi un error nulo.
- 3.- Se ha demostrado con lo referente a la pérdida de viabilidad a lo largo del tiempo que la mayoría de las especies han perdido casi la totalidad de su viabilidad al séptimo día, excepto para *Moricandia moricandioides subsp. giennensis* y *Moricandia moricandioides subsp. moricandioides* para concentraciones de sacarosa al 10%.
- 4.- Se demuestra que los estudios de productividad y calidad de polen son importantes para conocer acerca del estatus reproductivo de las especies y ofrecer valiosa información para futuros programas de conservación de especies amenazadas.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Flora Vascular de Andalucía Oriental, de Blanca & col. 2011 (la segunda versión).
- Aguilera Padilla, F. (2011). Estudio del flujo polínico atmosférico y fenología floral del olivo en la provincia de Jaén: aplicación para la creación de modelos de predicción de fruto. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén.
- Blanca, G., Cabezudo, B., Cueto, M., Morales Torres, C. & C. Salazar -eds.- (2011). Claves de la Flora Vascular de Andalucía Oriental. Servicios de Publicaciones de las Universidades de Granada, Almería, Jaén y Málaga. Granada.
- Mendoza, R., M. Humberto, C. Espinos y J.A Villareal (2011).
- Viabilidad del polen en una línea de girasol cultivado, en el girasol silvestre (*Helianthus annuus* L.subsp. *texanus* Heiser) y en su descendencia híbrida. Acta Botánica Mexicana 76: 47-57 (2006).
- UICN (2001), Categorías y criterios de la Lista Roja de la UICN: Versión 3.1, UICN, Gland, Suiza y Cambridge.
- Willmanns & Rasbach (1973), Observations on the Pteridophyta of Sao Miguel, Açores, Brit. Fern Gaz. 10: 315–329.
- E. Rodríguez-García, P. Sánchez-Gómez & J. F. Jiménez Martínez. Estudio de la “(Directrices de gestión y conservación de *Helianthemum guerrae* en el marco de la microreserva botánica “arenal es del rincón de los donceles (calasparra)”
- J.M. Lasa, 1975. –Tretrazolium bromide and sugar beet pollen viability (*Beta vulgaris*) An Aula Dei 13 (1/2): 111-121.