



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Morfología, viabilidad y germinación de los granos de polen
de *Nymphaea gracilis* Zucc. (Nymphaeaceae)

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Licenciado en Biología

PRESENTA:

José David Velázquez Fierro

Directoras

Dra. Carmen Zepeda Gómez

Dra. María Elena Estrada Zúñiga

Contenido

Resumen	7
Introducción	8
Antecedentes	10
Biología floral de Nymphaeaceae	12
<i>Nymphaea gracilis</i>	16
Polen	17
Polinización	19
Justificación	24
Hipótesis.....	25
Objetivos	25
Metodología	26
Zona de estudio.....	26
Recolección del material biológico	26
Volumen de líquido estigmático	27
Morfología de los granos de polen	28
Viabilidad de los granos de polen por pruebas colorimétricas.....	29
Preparación de cultivos para pruebas de germinación y formación de tubos polínicos	29
Resultados	33
Resumen de resultados.....	33
Morfología de los granos de polen	34
Evaluación de la viabilidad de los granos de polen por pruebas colorimétricas.....	35
Volumen de líquido estigmático	37
Germinación de los granos de polen	37
Germinación de los granos de polen de los estambres internos.....	40
Germinación de los granos de polen de los estambres medios	44
Germinación de los granos de polen de los estambres externos	47
Formación y longitud de tubos polínicos	51
Tubos polínicos de estambres internos	52
Tubos polínicos de estambres medios.....	56
Tubos polínicos de estambres externos	59
Discusión	62
Morfología de los granos de polen y volumen de líquido estigmático	62
Estimación de la viabilidad con técnicas de tinción	64

Variación en la tasa de germinación a través del tiempo de experimentación	67
Germinación y elongación de los tubos polínicos entre los diferentes juegos de estambres	70
Germinación de los granos de polen y elongación de los tubos polínicos según el tiempo de observación	73
Composición del líquido estigmático y su relación con los procesos estudiados	76
Germinación de los granos de polen y relación con la concentración de sacarosa	78
Elongación de los tubos polínicos	81
Efecto de la iluminación durante la elongación de los tubos polínicos	83
Conclusiones.....	85
Perspectivas a futuro.....	86
Referencias	86

Índice de figuras

Figura 1. Grupo de <i>Nymphaea gracilis</i> en floración	14
Figura 2. Corte transversal de una flor de <i>Nymphaea gracilis</i>	27
Figura 3. Disco estigmático lleno con fluido, ubicado en el centro de la flor de <i>Nymphaea gracilis</i>	28
Figura 4. Granos de polen de los estambres medios de <i>Nymphaea gracilis</i>	35
Figura 5. Relación entre el tamaño del estigma y el líquido estigmático producido	37
Figura 6. Granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i> con diferentes grados de germinación	38
Figura 7. Porcentaje de germinación de los granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i> provenientes de los estambres internos.....	44
Figura 8. Porcentaje de germinación de los granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i> provenientes de los estambres medios	46
Figura 9. Porcentaje de germinación de los granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i> provenientes de los estambres externos	50
Figura 10. Longitud de los tubos polínicos de los granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i> provenientes de los estambres internos.....	55
Figura 11. Longitud de los tubos polínicos de los granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i> provenientes de los estambres medios	58
Figura 12. Longitud de los tubos polínicos de los granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i> provenientes de los estambres externos	62

Índice de tablas

Tabla 1. Porcentaje de viabilidad de los granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i>	36
Tabla 2. Porcentaje de germinación de los granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i> por el tipo de estambres	39
Tabla 3. Porcentaje de germinación de los granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i> a través del tiempo de experimentación	40
Tabla 4. Porcentaje de germinación de los granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i> provenientes de los estambres internos.....	41
Tabla 5. Porcentaje de germinación de los granos de polen provenientes de los estambres internos de <i>Nymphaea gracilis</i> según el tratamiento de iluminación y líquido estigmático.....	42
Tabla 6. Porcentaje de germinación de los granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i> provenientes de los estambres internos según la concentración de sacarosa.....	43
Tabla 7. Porcentaje de germinación de los granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i> provenientes de los estambres medios	45
Tabla 8. Porcentaje de germinación promedio de los granos de polen de los estambres medios de <i>Nymphaea gracilis</i> según el tratamiento de iluminación y líquido estigmático	45
Tabla 9. Porcentaje de germinación promedio de los granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i> provenientes de los estambres medios según la concentración de sacarosa.....	47
Tabla 10. Porcentaje de germinación promedio de los granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i> provenientes de los estambres externos	48
Tabla 11. Porcentaje de germinación promedio de los granos de polen provenientes de los estambres externos de <i>Nymphaea gracilis</i> según el tratamiento de iluminación y líquido estigmático.....	49
Tabla 12. Porcentaje de germinación promedio de los granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i> proveniente de los estambres externos según la concentración de sacarosa.....	50
Tabla 13. Longitud promedio de los tubos polínicos según el juego de estambres de <i>Nymphaea gracilis</i> de los cuales provienen los granos de polen	52
Tabla 14. Longitud promedio de los tubos polínicos de <i>Nymphaea gracilis</i> según el tiempo de experimentación	52
Tabla 15. Longitud promedio de los tubos polínicos de los granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i> provenientes de los estambres internos a través del tiempo de experimentación.....	53
Tabla 16. Longitud promedio de los tubos polínicos de los granos de polen provenientes de los estambres internos de <i>Nymphaea gracilis</i> según el tratamiento de iluminación y líquido estigmático	54
Tabla 17. Longitud promedio de los tubos polínicos de los granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i> provenientes de los estambres internos según la concentración de sacarosa	55
Tabla 18. Longitud promedio de los tubos polínicos de los granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i> provenientes de los estambres medios.....	56
Tabla 19. Longitud promedio de los tubos polínicos de los granos de polen provenientes de los estambres medios de <i>Nymphaea gracilis</i> según el tratamiento de iluminación y líquido estigmático.....	57
Tabla 20. Longitud promedio de los tubos polínicos de los granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i> de los estambres medios según la concentración de sacarosa	58
Tabla 21. Longitud promedio de los tubos polínicos de los granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i> provenientes de los estambres externos	59
Tabla 22. Longitud promedio de los tubos polínicos de los granos de polen provenientes de los estambres externos de <i>Nymphaea gracilis</i> según el tratamiento de iluminación y líquido estigmático.....	60
Tabla 23. Longitud promedio de los tubos polínicos de los granos de polen de <i>Nymphaea gracilis</i> provenientes de los estambres externos según la concentración de sacarosa	61

Resumen

La germinación de los granos de polen es uno de los requerimientos más importantes para asegurar la efectiva reproducción sexual en la mayor parte de las plantas con semilla. Las características genéticas y el número de granos de polen producido por una flor los convierte en una herramienta útil para los programas de reproducción y mejoramiento, sobre todo en plantas con poblaciones pequeñas, fragmentadas y con problemas de conservación. *Nymphaea gracilis* Zucc. es una planta de importancia cultural y endémica de México que pertenece a uno de los grupos más antiguos de plantas con flor, pese a esta importancia no existen muchos estudios más allá de la descripción de sus características morfológicas y su distribución. Actualmente esta planta se distribuye principalmente en cuerpos de agua pequeños, a veces temporales y se considera que sus poblaciones están fragmentadas y separadas por barreras principalmente geográficas, lo cual podría representar un riesgo sobre todo en los aspectos genéticos intrapoblacionales como se ha observado en algunos otros representantes del género. Con el objetivo de determinar las características morfológicas de los granos de polen de *N. gracilis*, el tiempo de vida en anaquel, las condiciones medioambientales que favorecen su germinación y el crecimiento de los tubos polínicos, se establecieron medios de cultivo con las siguientes concentraciones de sacarosa: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 01, 15, 20, 25, y 30 %; presencia o ausencia de luz y presencia o ausencia de líquido estigmático. Adicionalmente se analizó si la capacidad de germinación de los granos de polen y el crecimiento de los tubos polínicos varían entre los tres juegos de estambres que las flores poseen. En total se observaron 111,443 granos de polen provenientes de 90 flores, colectados durante el otoño de 2018, con estos se determinó que presentan una morfología heteropolar con una vista polar elipsoidal y una vista ecuatorial elíptica, son zonosulcados, con una superficie verrucada y psilada en la región cercana al sulco, con un tamaño promedio de 38.78 μm , características que se comparan con otras especies del género. Se encontró que los granos de polen presentaron una germinación y

crecimiento de tubos polínicos mayor justo después de la colecta, estos fenómenos fueron diferentes entre los juegos de estambres, siendo los estambres externos los que presentaron una mayor germinación y los medios los que presentaron un mayor crecimiento del tubo polínico. La mayor germinación de los granos de polen se observó cuando el medio contenía sacarosa al 3 %, mientras que el mayor crecimiento de los tubos se observó en cultivo con sacarosa al 2 %, ambos fenómenos se observaron mejor cuando los granos fueron cultivados en oscuridad y se inocularon con líquido estigmático. El análisis de los procesos de germinación y elongación de los tubos polínicos en especies endémicas y con rangos de distribución estrechados por el deterioro de su hábitat, permiten visualizar alternativas de reproducción asistida para la conservación y el mantenimiento de las poblaciones de plantas acuáticas como las de *N. gracilis*.

Introducción

Nymphaea gracilis Zucc. es una de las once especies del género que existen actualmente en México (Bonilla-Barbosa *et al.*, 2000). Si bien, México cuenta con aproximadamente una quinta parte de las especies de *Nymphaea* a nivel mundial, el conocimiento de las diferentes especies está usualmente limitado a su morfología y distribución (Bonilla-Barbosa *et al.*, 2000; Borsch *et al.*, 2007), de forma que los estudios sobre reproducción y composición genética han sido escasamente abordados en algunas especies. Dado que los Nymphaeales, el orden al que estas plantas pertenecen es considerado uno de los clados más antiguos de angiospermas se cree que estas pueden presentar características morfológicas, bioquímicas y reproductivas únicas que pueden ayudar a develar la dirección de la evolución en este grupo y su relación con el resto de las plantas con flor (Gandolfo *et al.*, 2004; Löhne *et al.*, 2008).

Varios autores señalan que la calidad de los hábitats en los que se distribuyen muchas de las especies de *Nymphaea* están en peligro de desaparecer o ser alterados de manera importante por actividades humanas (Novelo y Wiersema,

2000; Mendoza-Cariño *et al.*, 2014). Esta disminución del hábitat puede repercutir severamente en las poblaciones por ejemplo al separar las poblaciones en porciones pequeñas, aislándolas unas de otras lo que puede resultar en una dificultad o imposibilidad de que ocurran procesos de reproducción sexual y con ello de adquirir variabilidad genética.

Se ha propuesto que los granos de polen pueden usarse como una fuente de germoplasma en programas de mejoramiento genético, y en el caso de especies ornamentales, para la creación de híbridos. Debido a que las plantas usualmente generan cantidades enormes de granos de polen y pueden ser contenidos en grandes números en un volumen muy pequeño, los granos de polen resultan elementos de gran utilidad para programas de conservación de especies endémicas y con problemas de conservación; pero para que estos puedan ser implementados de manera eficaz es necesario saber ciertas características como su vida media y su viabilidad (Hoekstra, 1995; Volk, 2011). Para determinar la viabilidad de los granos de polen existen diversos métodos de estimación que pueden útiles dependiendo de la especie y del método usado (Stone *et al.*, 1995; Dafni y Firmage, 2000). Por otra parte, ya que los granos de polen pueden germinar en un periodo corto de tiempo y en soluciones de composición relativamente simples que usualmente contienen ácido bórico y sacarosa, estos pueden ser considerados como un buen sistema para el estudio rápido de temas como el crecimiento celular, comunicación celular, metabolismo celular, etc (Wang *et al.*, 2010; Gill, 2014). Por lo que el estudio de los granos de polen, su morfología, viabilidad y germinabilidad son primordiales para el diseño de programas de conservación y mejoramiento, así como el diseño de metodologías de nuevos estudios sobre la especie, que son necesarios sobre todo en especies endémicas y cuyas poblaciones están en peligro de desaparecer o entrar en un estado de endogamia. Uno de los ejemplos más notables de los usos y beneficios de la polinización asistida por humanos para enriquecer el germoplasma de una especie es el caso del cultivo de *Hevea* o caucho en Sri Lanka, dado que las poblaciones comerciales eran reproducidas principalmente por plantas clonales, la

variabilidad genética era muy escasa, la implementación de la polinización por mano produjo alrededor de 65,000 cruces entre 1939 y 1945, lo que llevó al desarrollo de cultivares mucho más productivos (Anushka *et al.*, 2016). Además, recientemente se ha observado que la polinización asistida puede ayudar a incrementar la producción de cultivos como el cacao y el mango, sobre todo en áreas donde los polinizadores son escasos (Ram *et al.*, 2020; Toledo-Hernández *et al.*, 2020). En cuestión de mejoramiento de poblaciones naturales de plantas endémicas Severns (2013) observó que el uso de polen para polinizar plantas de diferentes poblaciones de *Pyrrocoma racemosa* resultó en un aumento del 30 % en cuanto a la producción semillas viables, de manera similar Li *et al.* (2020) observaron que al polinizar flores de *Sinocalycanthus chinensis* con polen proveniente de otras dos poblaciones diferentes, las plantas producían mayor cantidad de semillas, mayor germinación y mayor crecimiento que aquellas en el grupo control.

Antecedentes

Los Nymphaeales junto con Amborelales y Austrobaileyales, son ordenes que forman el llamado grado ANA, los cuales son representantes existentes de los primeros linajes de angiospermas, dicho grado es considerado hermano del resto de los angiospermas o masangiospermas (Borsch *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2019).

El orden Nymphaeales es considerado usualmente como la segunda rama en el árbol evolutivo de los angiospermas (Eckardt, 2002; Löhne *et al.*, 2008; Borsch *et al.*, 2008). Está formado por dos familias, Cabombaceae y Nymphaeaceae, plantas herbáceas acuáticas que se encuentran en hábitats dulceacuícolas alrededor de todo el mundo, exceptuando las regiones polares, siendo *Brasenia* (Cabombaceae) y *Nymphaea* (Nymphaeaceae) los géneros más extendidos (Löhne *et al.*, 2008). El orden Nymphaeales ofrece una clave importante para el entendimiento de la morfología de angiospermas ancestrales y también se consideran importante en el contexto de su origen (Gandolfo *et al.*, 2004).

Todas las Nymphaeales comparten varias características morfológicas: tallos rizomatosos, flores solitarias, iniciación de órganos florales acrópetos, simetría floral radial, iniciación simultánea de los carpelos en espiral y la formación de un plexo vascular en la base de las flores. Las características florales varían mucho, desde flores pequeñas y simples en *Camboba* hasta las grandes y elaboradas flores en *Nymphaea* y *Victoria*. Respecto a la posición de las flores en el ápice, se presentan muchas variaciones: en *Victoria* y *Euryale* surge de una posición axilar no media a la hoja asociada, mientras que en *Nuphar* y *Nymphaea* cada flor reemplaza a una hoja en el espiral generatriz del tallo (Grob *et al.*, 2006).

La familia Nymphaeaceae está compuesta por seis géneros de plantas herbáceas dulceacuícolas con distribución cosmopolita, *Barclaya*, *Euryale*, *Nuphar*, *Nymphaea*, *Ondinea* y *Victoria*. Los miembros existentes se distribuyen en cuerpos de agua con poca o nula corriente y han sido ampliamente utilizados como plantas de ornato (Novelo y Bonilla-Barbosa, 1999; Gandolfo *et al.*, 2004; Borsch *et al.*, 2008) y existen registros de que algunos tejidos u órganos de algunas especies son utilizados con diferentes propósitos dentro de la medicina tradicional de diversos países; por ejemplo, *N. amazonum* es usada en Argentina para combatir el herpes, como emoliente, cicatrizante y antihemorroidal. *N. stellata* es usada en India como ingrediente en múltiples medicamentos tradicionales en India para tratar la diabetes, enfermedades sanguíneas, disentería y problemas cardíacos, entre otros. *N. lutea* es usada en Europa y África como sedativo (Barboza *et al.*, 2009; Raja *et al.*, 2010; Alrashedy y Molina, 2016). Derivado de que estas plantas están restringidas a hábitats acuáticos, presentan una diversidad ecológica y morfológica considerable en comparación a otros grupos tempranos de angiospermas. Esta diversidad incluye un ciclo de vida, morfología de los carpelos, sistemas de reproducción y biología de la polinización muy específico. Por ello, son un excelente sistema para estudiar características reproductivas de clados que evolucionaron tempranamente (Taylor *et al.*, 2015).

Los miembros de Nymphaeaceae son anuales o perennes, con tallos sumergidos y rizomas simpoidales, rastreros o tubérculos erectos, estos a veces estoloníferos; hojas largamente pecioladas, alternas, estipuladas, sumergidas, flotando sobre la superficie del agua o emergiendo ligeramente; peciolo glabros, pubescente o con espinas, laminas elípticas a orbiculares, a veces peltadas, ápice obtuso, redondeado a emarginado, borde entero, eroso a dentado, base cordada a sagitada, glabras, pubescentes o con espinas en el envés; flores solitarias, hermafroditas, haplomórficas a actinomórficas, vistosas (Novelo y Bonilla-Barbosa, 1999). Usualmente crecen entre macrófitos y helófitos sumergidos. Se desarrollan en cuerpos de agua dulce poco profundos, pueden cubrir grandes áreas, donde las plantas sumergidas desaparecen por acumulación de materia orgánica en el sedimento, eutroficación y acidificación (Klok y van der Velde, 2017).

Biología floral de Nymphaeaceae

Diversas características florales son adaptaciones para la polinización, en particular, los apéndices carpelares altamente especializados, presentes en el género *Nymphaea* se asocian con polinización por escarabajos (Borsch *et al.*, 2008). Sin embargo, el espectro de polinizadores dentro de la familia es amplio e incluye además de los escarabajos, abejas y moscas (Hirthe y Porembski, 2003). Los patrones de actividad de estos polinizadores se separan y los escarabajos polinizan a las plantas principalmente durante la noche, mientras que las abejas lo hacen en la mañana o a medio día (Hirthe y Porembski, 2003; Maia *et al.*, 2014; Fava y Gomes, 2017).

En el subgénero *Hydrocallis* las plantas son polinizadas exclusivamente por escarabajos del género *Cyclocephala* (Dynastinae: Cyclocephalini). En el subgénero *Nymphaea* se ha observado la actividad polinizadora de escarabajos rinoceronte (*Ruteloryctes morio*), *Apis mellifera adansonii*, *Halictus* (Apidae:

Halictidae), *Lassioglossum* (Apidae: Halictidae), *Melipona* (Apidae: Meliponinae) (Hirthe y Porembski, 2003; Thien *et al.*, 2009).

En la familia Nymphaeaceae, los carpelos están incrustados en un cuenco formado por la base de la flor. Dicha base también forma una protuberancia central en la flor, que es conspicua en *Victoria*, y, sobre todo, en *Odinea*. La posición del gineceo con relación al perianto y al androceo es mayoritariamente inferior en *Victoria* y *Euryale*, superior en *Nuphar*, e intermedio en *Nymphaea*, *Barclaya* y *Odinea* (Borsch *et al.*, 2008).

El género *Nymphaea* (figura 1) es considerado un grupo taxonómicamente difícil, ya que muchas especies tienen numerosas subespecies, razas cromosomáticas e híbridos naturales y artificiales. Esta situación se debe a altos niveles de polimorfismo interespecífico e intensa hibridación interespecífica (Volkova y Shipunov, 2007). Es el género con más especiación y con la distribución más amplia dentro del orden (Borsch *et al.*, 2007; Borsch *et al.*, 2014), contiene entre 45 y 50 especies, dentro de cinco subgéneros *Anecphyra* (7 a 10 especies), *Brachyceras* (14 a 16), *Hydrocallis* (14), *Lotos* (2 o 3) y *Nymphaea* (8).

El subgénero *Lotos* es paleotropical, *Anecphyra* solo existe en Australia y Nueva Guinea, *Brachyceras* presenta un rango pantropical, *Hydrocallis* está restringida al neotrópico, *Lotos* es paleotropical y *Nymphaea* se distribuye alrededor del hemisferio norte en zonas con climas templados (Borsch *et al.*, 2007).

Los organismos que comprenden el género *Nymphaea* son plantas perennes o, bajo condiciones desfavorables, anuales; con rizomas cilíndricos o tubérculos ovoides, obovoides, esféricos a cilíndricos, estolones presentes o ausentes; hojas flotando sobre la superficie del agua o a veces emergiendo superficialmente (Novelo y Bonilla-Barbosa, 1999).

Una característica distintiva del género *Nymphaea* es la presencia de un líquido acuoso en la superficie del estigma (Endress y Doyle, 2015). Este líquido no es considerado como néctar ya que los insectos no lo beben, una de sus funciones posibles es la de desprender el polen del cuerpo de los polinizadores (Thien *et al.*, 2009, Borsch *et al.*, 2008), esto sucede cuando los visitantes que llevan polen resbalan por los estambres y caen en la secreción estigmática (Hirthe y Porembski, 2003). Esta secreción contiene de 1 a 4 % de glucosa y fructosa en partes iguales y una combinación de aminoácidos libres (Capperino y Schneider, 1985; Thien *et al.*, 2009), Además contiene boro, calcio, potasio y magnesio, todos en concentraciones óptimas para la germinación del polen (Thien *et al.*, 2009) este líquido puede servir como sustituto del compitum, es decir, un área en el gineceo donde los tubos polínicos pueden crecer desde la superficie estigmática de un carpelo, al óvulo de otro (Endress y Doyle, 2015).



Figura 1. Grupo de *Nymphaea gracilis* en floración en un bordo de agua temporal en El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Estado de México.

La reproducción sexual en *Nymphaea* es principalmente protoginia (Fava y Gomes, 2017). Dentro del género las flores son hermafroditas, presentan actividad reproductiva femenina solamente durante el primer día de antesis (a veces durante el segundo). Durante esta actividad, las flores se abren parcialmente, presentan anteras inmaduras y abundante exudado estigmático líquido. En el segundo día, el líquido desaparece y las anteras se vuelven dehiscentes, la ausencia del líquido se ha relacionado con la pérdida de la receptividad estigmática. Después de la antesis, las flores se cierran y se sumergen en el agua para la maduración de las semillas (Orban y Bouharmont, 1995; Williams *et al.*, 2010).

Los retoños florales surgen del meristemo apical, en la superficie del sustrato, sin brácteas que los subtiendan, doce días antes de la antesis. En este momento los tépalos externos son verdes y los tépalos internos presentan una coloración blanca/crema. El número de pétalos aumenta entre espiral, el juego de estambres más externo inicia en una posición en la cual se intercala con los pétalos más cercanos. Los carpelos radialmente alargados, son iniciados simultáneamente en un espiral alrededor de la deprimida zona central. La superficie estigmática contiene pelos secretores que liberan el fluido estigmático. Un residuo vascularizado del meristemo apical permanece en el centro de la flor (Orban y Bouharmont, 1998; Schneider *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2009; Povilus *et al.*, 2015).

Los carpelos están caracterizados por una placentación parietal y numerosos primordios ovulares por carpelo. Seis días antes de la antesis, los carpelos desarrollan una coloración amarilla, las paredes del carpelo comienzan a fusionarse y sus puntas se doblan. Los óvulos se alargan, con dos integumentos presentes, y el integumento interno se extienden más allá del externo. Dos días antes de abrir, las anteras incrementan su coloración amarilla y la superficie de las papilas del estigma se expone completamente. Los óvulos continúan creciendo y los micropilos se forman. El saco embrionario está compuesto por cuatro células,

dos sinérgidas, un ovulo y una célula central, las células antipodales están ausentes, durante el primer día de antesis el saco presenta una forma elíptica y el gametofito es completamente funcional (Orban y Bouharmont, 1998; Hu *et al.*, 2009; Povilus *et al.*, 2015).

Después de la polinización, el perianto y el androceo se desprenden mientras que el fruto se desarrolla, las semillas son liberadas cuando el fruto se desintegra, las semillas son dispersadas hidrocoria, sin embargo, también se ha hipotetizado la existencia de zoocoria por acción de reptiles como el galápago europeo (Orban y Bouharmont, 1998; Smits *et al.*, 1989; Calviño-Cancela *et al.*, 2007; Richards y Cao, 2012). Estas presentan un cotiledón bilobado en *Nymphaea* y germinan bajo el agua, primero desarrollan una raíz, después un internodo que lleva al meristemo apical y lo aleja de la cubierta de la semilla. El primer internodo es largo y los subsiguientes son cortos. La presencia de aire reduce la tasa de germinación en diversas especies. La profundidad a la que se desarrollan afecta la formación de biomasa y la morfología de las plantas juveniles (Orban y Bouharmont, 1998; Richards y Cao, 2012).

Nymphaea gracilis

En México existen once representantes del género *Nympaea*: *N. amazonum*, *N. ampla*, *N. conardii*, *N. elegans*, *N. gracilis*, *N. jamesoniana*, *N. mexicana*, *N. novogranatensis*, *N. porifera*, *N. puchella*, y *N. odonata* (Bonilla-Barbosa *et al.*, 2000).

Nymphaea gracilis Zucc. también llamada cabeza de negro, flor de loto, apapatla atzatzamoll, chachamol, etc., es una planta perenne, con un tubérculo erecto y esférico; con hojas pecioladas, ovadas a orbiculares, borde entero a eroso, haz verde a veces con máculas purpúreas y envés rojizo a purpura; sépalos 4, lanceolados; pétalos de 16 a 24 blancos los de los verticilos externos,

transformándose abruptamente en estambres; gineceo con 14 a 16 carpelos (Novelo y Bobadilla-Barbosa, 1999).

Esta especie es endémica de las partes altas de México y se registra en estados como Durango, Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Ciudad de México y Oaxaca. Crece a altitudes de 1500 a 2250 metros. Florece de mayo a noviembre (Novelo y Bobadilla-Barbosa, 1999).

Polen

Las plantas superiores tienen un ciclo de vida complejo que alterna entre el crecimiento de un organismo esporofito diploide y un enormemente reducido gametofito haploide. El grano de polen, que representa el gametofito masculino, consiste en tan solo dos o tres células al momento de ser expulsado de las anteras (Borg *et al.*, 2009). La función principal del polen es transportar los gametos masculinos del estambre de una flor al pistilo de otra flor conoespecífica. Durante este transporte, el polen, también ofrece protección contra la desecación, sobrecalentamiento, mutagénesis producida por rayos ultravioleta, foto oxidación e infecciones provocadas por bacterias u hongos (Dafni *et al.*, 2012).

La formación del grano de polen se lleva a cabo dentro de las anteras, el lóculo de las anteras contiene a las células esporogénicas que pasaran por meiosis (Bedinger, 1992). El pistilo, el órgano femenino de la flor, está formado por el estigma (donde el polen tiene el primer contacto), el estilo (un conducto entre el estigma y el ovario), y el ovario, que contiene a los óvulos. Cuando el polen entra en contacto con el estigma, se adhiere a este, se hidrata y germina. El resultado es una célula tubular llamada tubo polínico, que lleva las células espermáticas hasta el saco embrionario y a la célula germinal dentro del óvulo. Los eventos de adhesión e hidratación del polen en el estigma han sido estudiados intensivamente

ya que son los pasos iniciales de la polinización y son fácilmente observables (Lord y Russell, 2002).

En la madurez, la superficie del polen puede ser dividida en tres estratos, I) una pared exterior de exina, compuesta por capas de esporopolenina dividida por aperturas; II) la intina, formada principalmente por celulosa que también puede presentar varias capas; III) la cobertura del polen, compuesta por lípidos, proteínas, pigmentos y compuestos aromáticos, que llenan las cavidades de la exina (Edlund *et al.*, 2004).

Estructuralmente, la exina es la pared celular más compleja y diversa morfológicamente. Un componente importante de esta diversidad es el arreglo de las aperturas germinales, que constituyen espacios predeterminados en la exina que permiten la emergencia del tubo polínico (Blackmore *et al.*, 2007).

Los granos de polen varían en tamaño de menos de 10 μm hasta más de 100 μm (Halbritter *et al.*, 2018). La forma del grano se divide en diversas categorías dependiendo de la proporción entre el eje polar y el eje ecuatorial, por ejemplo, esferoide, subesferoidal, oblongo, suboblongo, etc (Kriebel *et al.*, 2017; Rahmawati *et al.*, 2019), además existen granos de polen triangulares o en forma de v , que pueden ser planos, convexos o cóncavos (Saénz-Lain, 2004). Las ornamentaciones están limitadas a la sexina, la parte exterior de la exina, estas pueden ser reticuladas, estriadas, psiladas, verrugosas, perforadas, ruguladas, gemadas o bien, carecer de ellas (Banks, 2003; Flores-Cruz *et al.*, 2006; Rahmawati *et al.*, 2019). Además, el polen puede presentar aberturas en su superficie y por ello se clasifican en colpados, colporados, porados, apocolpos, mesocolpos, sulcados, fenestrados, clivelados, etc (Saénz-Lain, 2004; Flores-Cruz *et al.*, 2006).

La forma de los granos de polen depende de tres factores: (I) posición de la micróspora en la tétrada; la pared celular del progenitor actúa como molde debido al efecto de la presión, (II) distribución y forma de las aperturas, y (III) la forma de expansión celular posterior a la separación de la pared del progenitor (Shukla *et al.*, 1998). La posición de espinas y otras ornamentaciones dependen del llenado de espacios y otras interacciones entre las microsporas en desarrollo, durante y después de la meiosis (Blackmore *et al.*, 2007).

Dentro de la familia Nymphaeaceae existe una ornamentación variable, *Barclaya*, *Nymphaea* y *Victoria* presentan superficies sin ornamentaciones y verrugosas; *Euryale*, *Trithuria* y algunas especies de *Nymphaea* presentan elementos ornamentales de diferentes tamaños; *Cabomba* y *Nuphar* presentan espinas (Taylor *et al.*, 2015) El polen de *Nymphaea* es zonosulcado y tiene una gran área de apertura. Al momento de la germinación, la pared interna está fuertemente engrosada por depósitos de calosa, los cuales se extienden a través de la apertura a la pared interna del tubo polínico (también compuesto de calosa). El polen germina sobre y debajo del líquido estigmático (Williams *et al.*, 2010).

Polinización

La longevidad del polen determina la posibilidad del entrecruzamiento entre plantas. Un gran número de plantas con semilla liberan polen seco, con muy baja actividad metabólica. De esta manera el polen puede permanecer viable durante largos periodos de tiempo hasta que adquiere humedad en el estigma, en este punto inician diversos procesos de desarrollo, en los que se incluye la polarización celular, liberación de calosa, migración del núcleo y elongación del tubo polínico (Hashida *et al.*, 2013).

El proceso de doble fertilización o polinización es un proceso único que define a los angiospermas como grupo sistemático. La doble fertilización comienza con la

entrada del tubo polínico en el saco embrionario (Russell, 1992). El tubo polínico se elonga en una matriz extracelular en el estilo, guiado principalmente por señales de éste y del saco embrionario. Estos eventos inician la doble fertilización, en la cual las células espermáticas se fusionarán, una con el ovulo, para formar el cigoto; y otra con la célula central para producir el endospermo (Lord y Russell, 2002).

La germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico generalmente están divididos en cuatro fases; fase de imbibición, fase de retraso, iniciación del tubo y fase de elongación rápida. Estas fases pueden verse afectados por muchos factores, incluida la temperatura, la osmolaridad del medio y la disponibilidad de sacarosa, calcio, zinc y boro (Patel y Mankad, 2014).

El tiempo necesario para realizar la fertilización es variable entre organismos: en arroz (*Oryza sativa*) dura <30 minutos, pero muchos otros organismos ocupan más de seis horas (Russell y Jones, 2015). Después de entrar al saco embrionario, el tubo polínico detiene su crecimiento y libera su contenido a través de la interacción con las sinérgidas (Berger *et al.*, 2008). Este proceso está asociado con la degradación de la sinérgida receptiva. Subsecuentemente, ambas células espermáticas llegan al sitio de fusión de los gametos y fertilizan al óvulo y a la célula central (Bleckmann *et al.*, 2014). La fusión de una célula espermática da como resultado la formación del embrión, mientras que la fusión de la otra da como resultado la formación del endospermo (Russell y Jones, 2015).

Para llegar al ovario, el tubo se desarrolla a un paso admirable, hasta 1 cm por hora. Este desarrollo es un proceso rápido y polarizado que ocurre exclusivamente en la punta del tubo e involucra la elongación del tubo dentro de los tejidos reproductivos femeninos (Qin y Yang, 2011; Rojas *et al.*, 2011). La punta del tubo se divide en cuatro zonas: una zona apical, esencialmente llena de vesículas exocíticas acumuladas típicamente en forma de V; una zona sub apical, llena de

organelos; una zona nuclear y una vacuolar que se puede extender hacia el grano, el flujo de organelos y vesículas está mediado por filamentos de actina y cada una de las partes presenta diferentes tipos de filamentos (Qin y Yang, 2011; Zhu *et al.*, 2013).

El tubo exhibe una organización citoplásmica altamente polarizada. Las células germinales tienen poco control en la elongación, en su lugar, el núcleo vegetativo controla todo el proceso, por lo cual, las mutaciones que afectan al tubo pueden ser mantenidas en plantas heterocigotas, lo que facilita el análisis de genes involucrados en el control de la polaridad y el crecimiento (Qin y Yang, 2011).

El ciclo de crecimiento del tubo polínico empieza con la deposición de pectina en la pared celular. Las vacuolas que depositan material en el ápice provienen del sub-ápice, donde el aparato de Golgi las llena con pectina (Rojas *et al.*, 2011) además, el ápice presenta una concentración de Ca^{2+} elevada, esto crea un gradiente que es necesario para la elongación (Rojas *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2013).

A un nivel subcelular, mientras que el tubo crece, depósitos de calosa aíslan al protoplasma del polen, el cual contiene las células germinales y la maquinaria para la biosíntesis. El movimiento citoplásmico, mueve a los organelos rápidamente hacia adelante y hacia atrás en el eje principal del tubo en un patrón de fuente inverso, lo que mantiene la distribución de las estructuras membranosas y libera las vesículas en la zona apical (Qin y Yang, 2011).

Durante la extensión, la dirección del tubo es modificada por señales externas y obstáculos físicos. Este crecimiento guiado es regulado por cascadas de señalamiento que involucran la actividad de quinasas y la familia de GTA-asas homologas de Ras (Zhu *et al.*, 2013). Al mismo tiempo, este proceso involucra una

atracción mediada por señales hacia al tejido femenino, así como la repulsión y competencia entre diversos tubos polínicos. En condiciones *in vivo*, la dirección y la elongación también están mediadas por señales del tejido femenino, a la fecha se han observado dos moléculas con posible participación en este fenómeno, una proteína parecida a la cianina, la quimiocianina y una proteína de las sinérgidas llamada LURE (Qin y Yang, 2011).

Además, variaciones en el flujo de iones pueden estar involucrados en la reorganización de los filamentos de actina. El Ca^{2+} y los filamentos regulan el transporte y acumulación de vesículas secretoras y su fusión con regiones específicas en la membrana plasmática del ápice. La proteína asociada a microtúbulos o MAP18 regula la organización cortical de microtúbulos, se ha observado que la actividad de esta proteína regula la dirección del tubo polínico, independientemente de su crecimiento. Su expresión irregular, provoca engrosamiento del ápice y patrones de crecimiento curvos (Zhu *et al.*, 2013).

Los granos de polen son ricos en hormonas, vitaminas y aminoácidos, generalmente no requieren una fuente exógena de estos para la germinación y la elongación del tubo (Patel y Mankad, 2014). Sin embargo, como muchos otros procesos fisiológicos la germinación del polen y el desarrollo del tubo polínico están altamente influenciados por la presencia de diversos tipos de carbohidratos y fuentes de energía. El proceso de elongación rápida consume altos niveles de energía generada por carbohidratos, sin embargo, los azúcares pueden tener otro papel, como el control de la dirección del crecimiento del tubo (Hirsche *et al.*, 2017; Lagera *et al.*, 2017). El polen contiene suficientes carbohidratos para garantizar su supervivencia y germinación, sin embargo, el tubo polínico usa carbohidratos del canal estilar para sustentar el crecimiento, dado que el tubo polínico está aislado simplásticamente del tejido estilar que lo rodea, la actividad de transportadores de membrana es requerida para importar nutrientes del

esporofito para la síntesis de la pared celular y la respiración del tubo polínico (Rainders, 2016).

Se ha observado que el efecto sobre la tasa de germinación de diversos azúcares está ligado a su composición, concentración y a las proteínas de membrana del polen; Hirsche *et al.* (2017) observaron que en el caso del polen de *Arabidopsis thaliana*, algunos monosacáridos tienen poco efecto sobre la germinación; mientras oligosacáridos la promueven, las investigaciones indican que en la membrana plasmática del tubo polínico se encuentran diversas proteínas o transportadoras cuya actividad determina la incorporación de exógena de azúcares (Reinders, 2016). Lagera *et al.* (2017) encontraron que en el caso del polen de *Cassia alata*, la glucosa, sacarosa y galactosa promueven la germinación y la elongación del tubo polínico; mientras que la maltosa y fructuosa no lo hacen. En *Jatropha mollissima*, la concentración de sacarosa a 10 % aumenta la formación de tubos polínicos, mientras que la de 20 % los disminuye, ambos respecto al tratamiento testigo (Lyra *et al.*, 2011).

La conversión de sacarosa a hexosas por parte de las invertasas no solo es necesaria para el desarrollo del polen, sino también para el crecimiento del tubo polínico en muchas plantas. En tabaco, la reducción de consumo de sacarosa provoca la reducción de la formación de tubos polínicos (Li *et al.*, 2020).

Otro de los factores que influyen en el crecimiento celular y desarrollo de tejidos en las plantas es la presencia, tipo e intensidad de la luz a la que los organismos son expuestos. Se ha observado que variaciones en esta afecta la biomasa general producida por plantas adultas, el tiempo y duración de la floración, y que puede ser un factor determinante durante la germinación (Milberg *et al.*, 2000; Cerdán y Chory, 2003; Zervoudakis *et al.*, 2012). Estos efectos se deben principalmente a la estimulación de diferentes compuestos sensibles a la luz como la clorofila, los carotenoides y el fitocromo (Cerdán y Chory, 2003). En el caso de

los granos de polen y los tubos polínicos se ha observado que la calidad y tipo de luz puede determinar su tasa de germinación, así como la velocidad y dirección del crecimiento de los tubos (Campbell *et al.*, 2001; Hoyo *et al.*, 2014).

Bodhipadma *et al.* (2013) determinaron que tanto la iluminación, como la concentración de sacarosa y la temperatura afectan la tasa de germinación en *Nymphaea nouchali*, observaron que las condiciones más favorables para la formación de tubo polínico son la oscuridad 32°C y 5 % de sacarosa. La luz y las concentraciones de sacarosa superiores a 5 % provocan una tasa de germinación significativamente menor.

Justificación

El entendimiento de los mecanismos responsables de la reproducción sexual en plantas, en este caso la germinación de los granos de polen es sumamente útil no solo para enriquecer el conocimiento general de diferentes procesos que se llevan a cabo dentro del ciclo de vida de un organismo, sino que también representa oportunidades dentro del campo de la conservación y mejoramiento de estos (Sun *et al.*, 2015). En *Nymphaea* la polinización cruzada es un proceso importante ya que para algunas especies es el único mecanismo de reproducción que existe (Chen *et al.*, 2017). Esto, asociado con los fenómenos de antesis típicos de los representantes del género, pueden representar una desventaja en los fenómenos hibridación o enriquecimiento genético de una población (Wiersema, 1988). La reproducción sexual, resulta ser aún más importante en poblaciones pequeñas o fragmentadas donde los niveles de endogamia pueden ser altos, inclusive en poblaciones polinizadas por insectos (Chen *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2017). Uno de los métodos por los cuales se pueden resolver estos problemas es la polinización asistida, sin embargo, es necesario el conocimiento de algunas de sus particularidades funcionales de los granos de polen como el tiempo de vida media y las condiciones de formación y elongación de los tubos polínicos, esto para

poder implementarlo en programas de conservación y mejoramiento genético efectivos (Hoekstra, 1995; Volk, 2011; Gill, 2014). Este tipo de conocimiento puede ser útil en el caso de *N. gracilis* y el resto de los representantes del género que existen en México, sobre todo por la situación pobre en la que muchas de sus poblaciones se encuentran actualmente y la poca información que se tiene sobre los fenómenos reproductivos y sus aplicaciones en la conservación de plantas acuáticas.

Hipótesis

La germinación de los granos de polen, el crecimiento y longitud total de los tubos polínicos de *N. gracilis* está influenciado positivamente por las condiciones de iluminación, concentración de sacarosa y presencia del líquido estigmático en las que se cultiva y negativamente por el tiempo de almacenamiento.

Objetivos

Objetivo general:

Determinar las características morfológicas de los granos de polen y algunos factores que afectan la formación de tubos polínicos y la germinación de los granos de polen de *Nymphaea gracilis*.

Objetivos particulares:

- Describir las características morfológicas de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* y determinar su porcentaje de viabilidad por pruebas colorimétricas.
- Determinar el volumen de líquido estigmático producido por las flores de *Nymphaea gracilis*.

- Analizar el efecto de diferentes concentraciones de azúcar, presencia de líquido estigmático e iluminación en la formación y tamaño del tubo polínico de *Nymphaea gracilis*.
- Determinar la vida media de los granos de polen de *Nymphaea gracilis*.
- Comparar la longitud del tubo polínico, la tasa de germinación y viabilidad de los granos de polen de los estambres presentes en las flores de *Nymphaea gracilis* dependiendo de su posición en la flor.

Metodología

Zona de estudio

El estudio se llevó a cabo con las flores una población de *N. gracilis* ubicada en un bordo de agua temporal localizado al sureste de la ciudad de Toluca y al este del Campus el Cerrillo de la Universidad Autónoma del Estado de México, en el poblado de El Cerrillo, Piedras Blancas, municipio de Toluca (-99.679167, 19.415833). La zona se encuentra a una altitud media de 2,632 metros. La temperatura media del mes más frío es 2.4 °C (diciembre), la del mes más cálido es 11.5 °C (junio) y una temperatura media anual de 8.2 °C. Se distingue una estación seca de noviembre a febrero y una lluviosa de junio a septiembre. El clima de la región es C(w2) (w) b (i) g, es decir, templado subhúmedo con régimen de lluvias en verano y con oscilación térmica (Álvarez-Lopezello *et al.*, 2016).

Recolección del material biológico

Durante la época de floración de 2018 (agosto a octubre) cuando las flores estaban abriendo (aproximadamente a las 11:00 am) se colectaron los estambres de 30 flores de *N. gracilis*. Los estambres colectados se dividieron según su posición en la flor y tamaño (externos, medios e internos; figura 2), se combinaron según esta misma característica y se almacenaron en bolsas de papel a

temperatura ambiente en el Laboratorio de Plantas Acuáticas de la Facultad de Ciencias.

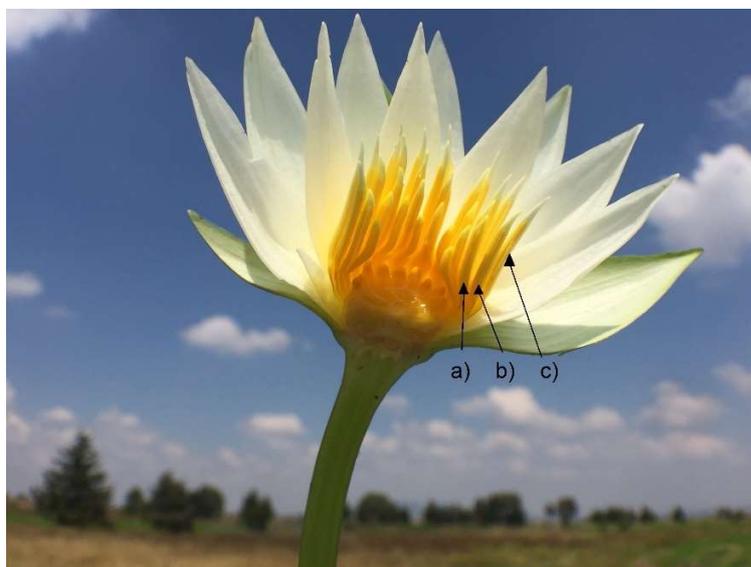


Figura 2. Corte transversal de una flor de *Nymphaea gracilis*. Posición en la flor y tamaño de los estambres: a) juego de estambres internos, b) juego de estambres medios, c) juego de estambres externos

Volumen de líquido estigmático

Adicionalmente se colectó la secreción estigmática (figura 3) de 32 flores usando una jeringa de 1 ml, este líquido se filtró usando un papel filtro de 20 micrones y un embudo de cristal para retirar polen y otras partículas suspendidas, se almacenó en un vial de 5 ml a $-4.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso, este líquido fue inoculado en algunas de las pruebas de germinación y elongación, este proceso es explicado en los párrafos siguientes.

Para determinar el volumen de líquido estigmático contenido en las flores y si este variaba en función del área del estigma de las flores, durante el otoño de 2019 se colectó el líquido estigmático de 30 flores usando una jeringa de 1 ml, al ser colectado se tomó nota de la cantidad de líquido por flor y se depositó en viales de

5 ml para conservarlo a $-4.0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Adicionalmente, de las mismas flores se midió el diámetro del disco estigmático usando un vernier digital Mitotuyo CD-6”C. Con los datos obtenidos se realizó una prueba de correlación de Pearson que permitió determinar si existía una relación entre el volumen de líquido estigmático y el área del estigma.



Figura 3. Disco estigmático lleno con fluido, ubicado en el centro de la flor de *Nymphaea gracilis*.

Morfología de los granos de polen

Para describir la morfología de los granos de polen de *N. gracilis* se realizaron fotografías con Microscopio Electrónico de Barrido marca Zeiss usando granos de polen frescos (si ningún tratamiento químico), las fotografías se tomaron en el laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad Anáhuac, Campus Huixquilucan por la M. en C. Aline Hernández García, a quien se le agradece enormemente por la ayuda brindada.

Las características morfológicas fueron descritas siguiendo las consideraciones de Halbritter *et al.* (2018). Adicionalmente se analizó la relación entre el tamaño de los granos de polen y la categoría de estambre del que provenían (externos, medios e internos), para ello se midió, con un microscopio óptico MOTIC modelo DMB3-223, 100 granos de cada categoría de estambre. Los resultados se analizaron con una prueba de ANOVA de una vía con un $\alpha=0.05$ para determinar si existían diferencias en el diámetro de los granos de polen según el juego de estambres al que pertenecían.

Viabilidad de los granos de polen por pruebas colorimétricas

Con el fin de estimar la viabilidad de los granos de polen, se realizaron pruebas de viabilidad con tinciones de acetocarmín al 1 % (V/P) y azul de anilina en lactofenol al 1 % (V/P). En la prueba de acetocarmín los granos de polen se consideraron como viables cuando presentaron una fuerte coloración roja, mientras que en la prueba de lactofenol se consideraron viables a los granos que presentaban una fuerte coloración azul. En ambos casos los granos de polen que no presentaban la coloración típica de la prueba y aquellos que presentaban anomalías morfológicas se contaron como no viables. La evaluación colorimétrica de la viabilidad se realizó al inicio de cada experimento de germinación *in vitro*. Se probaron en total 100 granos de polen por cada tinción (Bodhipadma *et al.*, 2013; Melloni *et al.*, 2013).

Preparación de cultivos para pruebas de germinación y formación de tubos polínicos

Para permitir la germinación de los granos de polen y evaluar el efecto de diferentes condiciones en su germinación y en la formación de tubos polínicos, se preparó un medio de cultivo base de ácido bórico 0.1 mM, cloruro de calcio 1.0 mM, agar al 5 % (P/V) como gelificante y una concentración específica de sacarosa como abajo se indica. El medio se mantuvo a un pH de 5.7 (Bodhipadma

et al., 2013; Patel y Mankad, 2014) y se preparó en un microondas LG MS-07487 de 700W durante 15 segundos (Kothari *et al.*, 2011).

Cada medio en estado líquido se colocó entre dos láminas de acetato previamente esterilizadas y se aplicó presión hasta que alcanzó un grosor cercano a 0.7 mm, una vez solidificado se cortó en porciones de 1 cm². Tres de estas secciones se montaron en una laminilla de cristal y se inocularon, con la ayuda de un pincel, con una mezcla de granos de polen de cada tipo de estambre (internos, medios y externos), de esta forma cada laminilla constituyó una muestra con tres repeticiones. Una vez inoculadas, las laminillas se colocaron en cajas de Petri estériles con papel filtro húmedo (RH<95%) (Myint *et al.*, 2012) y se mantuvieron en una cámara de crecimiento Labline / Thermo scientific modelo 844 a 22±2 °C durante 24 horas, con focos fluorescentes de 20 watts de luz blanca, para permitir la germinación. Los procesos de elaboración y montaje de los medios de cultivo fueron realizados usando un mechero de alcohol para evitar cualquier tipo de contaminación.

La germinación y formación de tubos polínicos se probó en diferentes condiciones de sacarosa (en total 11 concentraciones diferentes), iluminación y presencia de líquido estigmático. Para ello se prepararon once diferentes medios de cultivo, cada uno con una de las siguientes concentraciones de sacarosa: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 % (P/V) (Bodhipadma *et al.*, 2013; Patel y Mankad, 2014).

Una laminilla de cada concentración de sacarosa se colocó en los siguientes tratamientos de luz y líquido estigmático: 1) iluminación y líquido estigmático (IcL); 2) oscuridad y líquido estigmático (OcL); 3) iluminación sin líquido estigmático (IsL); 4) oscuridad sin líquido estigmático (OsL). En los tratamientos que incluyen líquido estigmático, se colocó aproximadamente 20 µl de este con ayuda de una jeringa de 1 ml, cuidando depositarlo sobre el área donde fue inoculado el polen. En los tratamientos de oscuridad los cultivos fueron cubiertos con papel aluminio para asegurar que la luz no llegara a los granos de polen.

Con el fin de determinar el tiempo de vida de los granos de polen después de ser colectados, los experimentos fueron realizados un día después de la colecta de los estambres, ocho días después de la colecta y quince días después de la colecta.

En cada uno de los experimentos y de todas las repeticiones se tomó una fotografía a las 2 horas y a las 24 horas de haber sido iniciados (Bodhipadma *et al.*, 2013). Las fotografías se tomaron usando un microscopio estereoscópico Olympus modelo SZ2.ILST con una cámara Canon integrada y bajo un objetivo de 11X, esto permitió evaluar la respuesta de germinación de los granos de polen a través del tiempo de cultivo y en los diferentes tratamientos. Las fotografías fueron analizadas usando el software Motic Images Plus 3.0. y en cada caso se observó un campo, en él se tomaron en cuenta: número de granos de polen visibles, número de tubos polínicos formados y longitud de los tubos.

Se consideró como grano de polen germinado a cualquiera que tuviese al menos un tubo polínico adherido, sin importar el tamaño de este. Para calcular el porcentaje de germinación de granos de polen en cada tratamiento se usó la siguiente ecuación (Myint *et al.*, 2012):

$$\begin{aligned} & \textit{Porcentaje de germinación de granos de polen} \\ = & \frac{\textit{Número de granos de polen germinados por campo de observación}}{\textit{Número total de granos de polen por campo de observación}} \times 100 \end{aligned}$$

Con el fin de determinar si los resultados de las pruebas colorimétricas indicaban algún cambio de viabilidad durante el tiempo de experimentación, los datos obtenidos a través de estas pruebas fueron analizados con una prueba de Chi-cuadrada con un $\alpha=0.05$.

Para determinar si existió una diferencia entre las tasas de germinación y longitud de los tubos polínicos entre las observaciones a las 2 horas y a las 24 horas de haber iniciado los experimentos se realizó una prueba del signo (Zar, 1999). Para estudiar el efecto del líquido estigmático, la concentración de sacarosa y la iluminación sobre la longitud del tubo polínico y la germinación del polen se realizó una prueba de Kruskal-Wallis con ella se compararon los resultados de los tres experimentos, de las categorías de estambres y de la concentración de sacarosa.

Adicionalmente se realizó una prueba de U de Mann-Whitney para comparar los resultados de los tratamientos de iluminación y de líquido estigmático. Se hizo una prueba de Dunn para definir los grupos homogéneos con los resultados de las pruebas de Kruskal-Wallis cuando fue necesario. Además, se hicieron análisis de correlación de Spearman para determinar la magnitud y dirección de la influencia del líquido estigmático y la iluminación sobre la longitud de los tubos polínicos y la germinación del polen, en todas las pruebas de Kruskal-Wallis, U de Mann-Whitney, Dunn y correlaciones de Spearman se empleó un $\alpha=0.05$. Adicionalmente y como una forma de evaluar el efecto de la luz sobre la germinación de los granos de polen, se adecuó una prueba de germinación relativa a la luz utilizada en semillas (Baskin y Baskin, 2001) para ello se empleó la siguiente ecuación:

$$GRL = \frac{GL}{(GO + GL)}$$

Donde GRL= Germinación relativa a la luz; GL= porcentaje de germinación a la luz; GO= porcentaje de germinación en oscuridad permanente (Milberg *et al.*, 2000).

De acuerdo con la respuesta de los granos de polen a la luz, estos se han clasificado en tres tipos: 1) granos de polen indiferentes, cuando estos germinan bajo condiciones de luz blanca y en la oscuridad, 2) fotoblásticos positivos, cuando los granos de polen requieren de luz blanca para germinar y 3) fotoblásticos negativos, cuando la luz blanca inhibe la germinación de los granos de polen. Si el

valor del índice GRL está entre 0.25 y 0.75 se considera como indiferente a la luz, si este es superior a 0.75 se considera que la especie es fotoblástico positivo y si es menor a 0.25 se considera fotoblástico negativo (Funes *et al.*, 2009).

En general y previo a la realización de las pruebas estadísticas los porcentajes de germinación se transformaron mediante la función arcoseno para facilitar el análisis estadístico (Zar, 1999).

Resultados

Resumen de resultados

Los granos de polen de *N. gracilis* presentan un tamaño y características morfológicas similares a los granos de polen de otros representantes del género. Las flores generan una cantidad de líquido estigmático cuya magnitud varía en función al área de disco estigmático que lo genera. En el caso de la germinación, los granos de polen presentaron una germinación *in vitro* menor que la estimada por las pruebas colorimétricas, además los granos de polen presentaron la mayor germinación y mayor crecimiento de los tubos polínicos durante el primer día después de la colecta. Se observó que todas las variables estudiadas afectan la germinación y el crecimiento de los tubos polínicos, la magnitud y significancia de este efecto depende de cada variable. El líquido estigmático es la variable que mayor efecto tiene sobre ambos fenómenos, es decir, la presencia de este aumenta y disminuye la germinación de los granos de polen y el crecimiento de los tubos polínicos, este efecto cambia entre los grupos de estambres y el fenómeno observado. Las diferentes concentraciones de sacarosa aumentan la germinación y el crecimiento de los tubos polínicos, pero también los hacen disminuir respecto al testigo, si bien pocas veces se observan diferencias significativas y solamente en el caso de los estambres externos la concentración de sacarosa de 2 % reprime significativamente la germinación, las concentraciones menores de 5 % presentan tasas de germinación más altas, mientras que concentraciones

superiores a 5 % las la hacen disminuir, aunque también se observaron concentraciones de sacarosa superiores a 5 % que aumentaron la germinación respecto al tratamiento testigo, en ninguno de los casos este fenómeno se comportó de manera lineal, sin embargo, de manera contrastante en el polen proveniente los estambres externos, las concentraciones superiores a 5 % aumentan la germinación respecto a las concentraciones de 1-5 % pero no del testigo. Por su parte la iluminación presenta un efecto que pocas veces es significativo y cuyo comportamiento no sigue un patrón aparente. Además de esto, se observó que los diferentes juegos de estambres (internos, medios y externos) presentan tasas de germinación y de crecimiento de tubos polínicos significativamente entre sí.

Morfología de los granos de polen

Los granos de polen de *N. gracilis* son de tipo mónadas, por lo que la unidad de dispersión es en granos individuales (figura 4). De acuerdo con su polaridad y simetría se trata de granos de polen heteropolares. En la vista polar presentan una morfología casi esferoidal, mientras que en la vista ecuatorial su morfología es elíptica u oblata. Son granos zonosulcados, es decir, presentan una apertura con forma de anillo que aparentemente los rodea por completo. En vista ecuatorial se observan dos secciones: la anterior es más grande y convexa, mientras que la sección posterior es pequeña y cóncava. En la vista polar la exina presenta una ornamentación verrucada pero las zonas más próximas a la apertura son psiladas.

Los granos de polen de *N. gracilis* miden en promedio $38.78 \pm 3.24 \mu\text{m}$, por lo que se consideran granos de polen medianos (Halbritter *et al.*, 2018). El tamaño de los granos de polen según la posición de los estambres de los que provienen no varía significativamente (Estambres internos= $38.83 \pm 3.72 \mu\text{m}$, estambres medios= $34.04 \pm 3.15 \mu\text{m}$, estambres externos= $38.46 \pm 2.78 \mu\text{m}$), el análisis de ANOVA de una vía indica que independientemente de la ubicación y tamaño de

los estambres, estos producen granos de polen del mismo tamaño ($F_{2,297}=0.81$, $p=0.443776$).

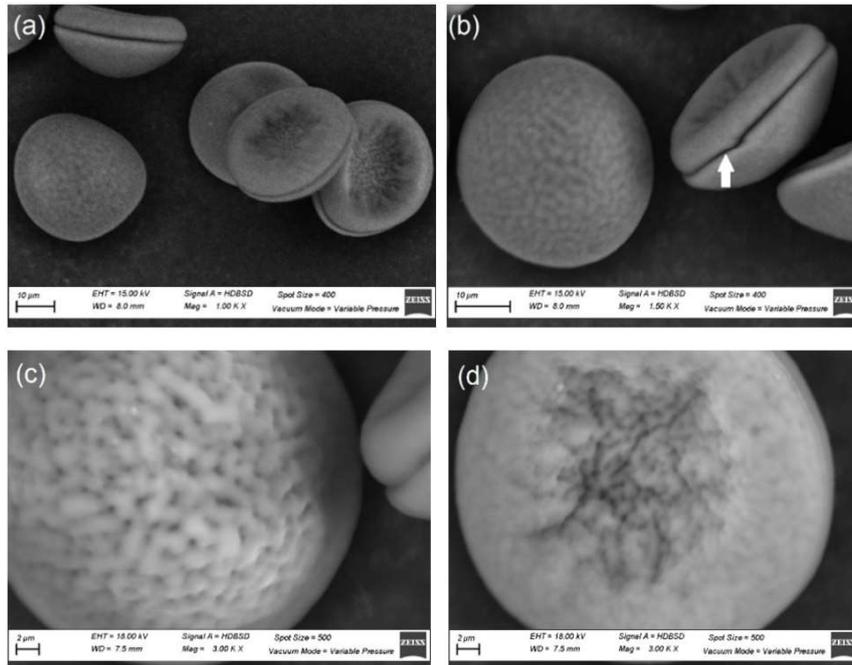


Figura 4. Granos de polen de los estambres medios de *Nymphaea gracilis* observados en un microscopio electrónico de barrido. (a) del lado izquierdo y arriba se observa un grano de polen en vista ecuatorial, debajo de este se observa un grano de polen en vista polar del lado anterior, del lado derecho se observan tres granos de polen en vista polar del lado posterior (barra= 10 μm); (b) del lado derecho se observa la apertura con forma de anillo, señalado por una flecha blanca (barra= 10 μm); (c) grano de polen en vista polar anterior, se observa con detalle la exina (barra= 2 μm); (d) grano de polen en vista polar posterior, se observa con detalle la exina (barra = 2 μm).

Evaluación de la viabilidad de los granos de polen por pruebas colorimétricas

Las evaluaciones químicas de viabilidad de los granos de polen de *N. gracilis* (tabla 1) indican que presentan en promedio una viabilidad de 90.5 % durante el primer día después de la colecta la cual disminuye a 89.6 % en el día quince desde que se realizó la colecta. En los granos de polen provenientes de los estambres internos la prueba de viabilidad con acetocarmín indica que la viabilidad no presentó cambios significativos durante el tiempo de experimentación (X^2 (2, $N=300$)=1.06, $p=0.587$).

En los granos de los estambres medios la misma prueba reveló que los granos de polen aumentaron significativamente su viabilidad a partir del octavo día desde la colecta ($X^2 (2, 300)=42.82, p<0.05$), mientras que en los granos de polen de los estambres externos la viabilidad significativamente menor se encontró al octavo día ($X^2 (2, N=300)=10.60, p<0.05$).

Por su parte, en la prueba de azul de anilina se encontró que en los estambres internos la viabilidad no varió entre las fechas de análisis ($X^2 (2, N=300)=4.60, p>0.05$). En el caso de los estambres medios la viabilidad solo fue significativamente más baja en el octavo día después de que se colectaron los estambres ($X^2 (2, N=300)=19.58, p<0.05$). En los estambres externos la viabilidad se mantuvo estable en los primeros ocho días de experimentación pero disminuyó significativamente en el día quince ($X^2 (2, N=300)=41.20, p<0.05$).

Tabla 1. Porcentaje de viabilidad de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* dependiendo de la posición de los estambres de los cuales provienen, a lo largo del tiempo de experimentación de experimentación calculado por las técnicas de acetocarmín y azul de anilina.

Juego de estambres	Tinción	N	Porcentaje de viabilidad durante el tiempo de experimentación		
			Día 1	Día 8	Día 15
Internos	Acetocarmín	100	96	93	93
	Azul de anilina	100	90	97	95
Medios	Acetocarmín	100	80*	100	100
	Azul de anilina	100	98	86*	99
Externos	Acetocarmín	100	89	76*	91
	Azul de anilina	100	90	92	60*
Promedio general			90.50	90.66	89.66

Nota: Los * denotan viabilidad significativamente menor

Volumen de líquido estigmático

Las flores de *Nymphaea gracilis* presentaron estigmas con un área promedio de $55.80 \pm 16.89 \text{ mm}^2$ y contuvieron $290 \pm 118.81 \text{ }\mu\text{l}$ de líquido estigmático. Se determinó que conforme aumenta el área del estigma la cantidad de líquido estigmático producido también aumenta ($r^2=0.299$, $p=0.002$; figura 5).

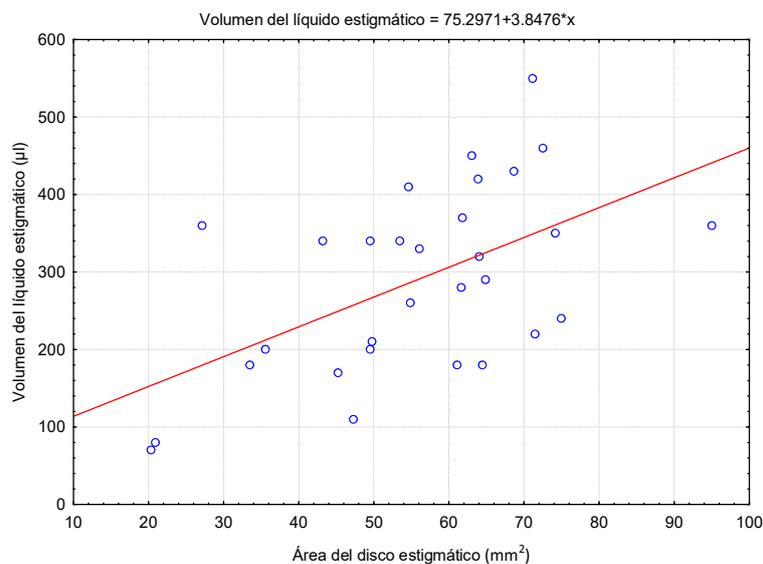


Figura 5. Relación entre el tamaño del estigma y el líquido estigmático producido por las flores de *Nymphaea gracilis*.

Germinación de los granos de polen

Las diferentes pruebas que se realizaron para determinar en qué condiciones se obtendría la mayor germinación de los granos de polen, sugieren que los granos de los diferentes juegos de estambres presentan diferentes tasas de germinación, pero su comportamiento bajo las variables de iluminación, líquido estigmático y concentración de sacarosa es relativamente similar.

Asimismo, de manera general se observó que la germinación *in vitro* ocurre activamente desde las primeras 2 horas que los granos fueron inoculados en el

medio de cultivo y aumenta significativamente en las horas subsecuentes. Se encontró poca influencia por parte de la iluminación, es decir, no hubo diferencias significativas según el tipo de iluminación, sin embargo, se observó una tendencia de mayor germinación en la oscuridad. La concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo modifica la tasa de germinación de los granos de polen, mientras que el líquido estigmático la aumenta significativamente.

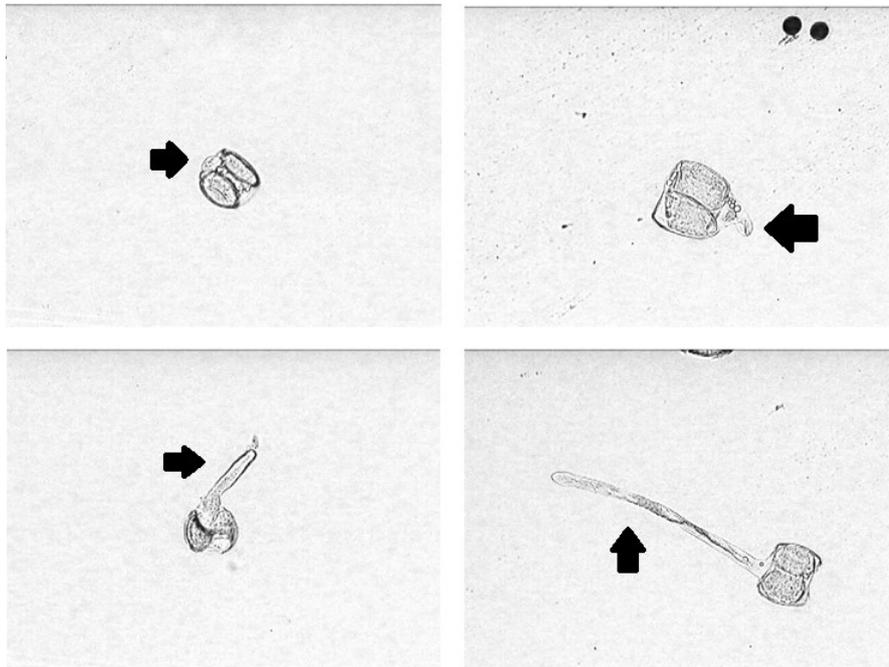


Figura 6. Granos de polen de *Nymphaea gracilis* con diferentes grados de germinación, se observan a 40x, las flechas señalan el tubo polínico.

El patrón general de germinación de los granos de polen de *N. gracilis* indica incrementos de germinación a lo largo de la incubación. La prueba del signo mostró diferencias significativas entre la tasa de germinación a las 2 horas y a las 24 horas de haber iniciado los experimentos ($Z=7.097$, $p<0.0001$). A las 2 horas la germinación fue significativamente más baja (2.86 ± 0.23 %), ya que a las 24 horas se observó cerca del doble de los granos de polen germinados (5.42 ± 0.41 %).

Al estudiar la germinación de los granos de polen por la posición de los estambres de los que provienen, la prueba de Kruskal-Wallis mostró que la tasa de germinación es significativamente diferente entre los tres tipos de estambres, tanto a las 2 horas ($H_{2, 1179}=26.51882$, $p<0.0001$, tabla 2) como a las 24 horas de haber iniciado el experimento ($H_{2, 1179}=15.38977$, $p<0.0005$, tabla 2).

La prueba de Dunn muestra que los estambres medios presentan la tasa de germinación significativamente más baja en ambos tiempos, 2.59 ± 0.42 % a las 2 horas y 3.55 ± 0.41 % a las 24 horas (tabla 2). Si bien la tasa de germinación de los granos de polen de los estambres internos y externos no presentan una diferencia significativa, existe una tendencia de germinación mayor en los granos de polen de los estambres internos, siendo esta de 3.30 ± 0.40 % a las 2 horas y 6.94 ± 0.86 % a las 24 horas.

Sin embargo, en la mejor combinación de condiciones de iluminación, concentración de sacarosa y presencia de líquido estigmático, los estambres internos presentan la menor tasa de germinación siendo su germinación más alta 31.88 ± 15.26 %, mientras que los estambres medios y externos presentaron una tasa de germinación de 41.84 ± 4.18 % y 53.07 ± 11.11 %, respectivamente, además los estambres internos presentaron la germinación más baja en el tratamiento testigo.

Al evaluar la germinación de los granos de polen a través del tiempo de experimentación, se observa que la tasa de germinación disminuye a lo largo de éstas, tanto a las 2 horas ($H_{2, 1179}=32.41834$, $p<0.0001$, tabla 3) como a las 24 horas de haber iniciado el experimento ($H_{2, 1179}=102.7225$, $p<0.0001$, tabla 3). El primer día después de la colecta presentó la mayor tasa de germinación tanto a las 2 horas como a las 24 horas (5.08 ± 0.52 % y 9.13 ± 0.98 % respectivamente, tabla 3). De esta forma la viabilidad disminuye hasta 64 % entre el primer y el octavo día, y hasta 88 % entre el octavo día y el día 15.

Tabla 2. Porcentaje de germinación (promedio \pm ES) de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* por el tipo de estambres a las 2 horas y a las 24 horas de incubación.

Estambres	N		Porcentaje promedio de germinación \pm error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
Internos	396	396	3.13 \pm 0.40 ^a	6.94 \pm 0.86 ^a
Medios	395	395	2.59 \pm 0.42 ^b	3.55 \pm 0.41 ^b
Externos	391	391	2.87 \pm 0.40 ^a	5.78 \pm 0.77 ^a

Nota: Las letras diferentes en los superíndices indican diferencias significativas entre los grupos por columnas (Dunn, $p < 0.05$).

Tabla 3. Porcentaje de germinación (promedio \pm ES) de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* a través del tiempo de experimentación a las 2 horas y a las 24 horas de incubación.

Días después de la colecta	N		Porcentaje promedio de germinación \pm error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
1	392	392	5.08 \pm 0.52 ^a	9.13 \pm 0.98 ^a
8	396	396	1.81 \pm 0.35 ^a	6.13 \pm 0.68 ^a
15	394	394	1.72 \pm 0.32 ^b	1.02 \pm 0.16 ^b

Nota: Los superíndices diferentes denotan diferencias significativas entre los grupos por columnas (Dunn, $p < 0.05$).

Germinación de los granos de polen de los estambres internos

La germinación de los granos de polen de los estambres internos fue significativamente mayor a las 24 horas de haber iniciado el experimento ($Z = 5.384686$, $p < 0.0001$) y fue cerca del doble (6.94 \pm 0.86 %) de lo que se encontró a las 2 horas (3.13 \pm 0.40 %). Al comparar la tasa de germinación entre los días desde la colecta, no se observaron diferencias significativas (H_2 , $393 = 0.9051606$, $p = 0.6360$), sin embargo, el día 8 mostró una tendencia de mayor germinación a las 2 horas (3.50 \pm 1.00 %, tabla 4). En general, se encontró que a las 24 horas hay

una tendencia de disminución en el número de granos germinados a lo largo del tiempo de experimentación, con la mayor germinación en el primer día (10.93 ± 2.06 %; $H_{2, 393} = 16.26647$, $p = 0.0003$, tabla 4) y la menor en día quince (2.17 ± 0.42 %, tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de germinación (promedio \pm ES) de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* provenientes de los estambres internos a través del tiempo de experimentación.

Días después de la colecta	N		Porcentaje promedio de germinación \pm error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
1	132	132	2.81 ± 0.49^a	10.93 ± 2.06^a
8	132	132	3.50 ± 1.00^a	7.72 ± 1.43^a
15	132	132	3.08 ± 0.50^a	2.17 ± 0.42^b

Nota: Los super índices diferentes indican diferencias significativas entre los grupos por columnas (Dunn, $p < 0.05$).

Debido a que las tasas de germinación fueron más altas durante el primer día después de la colecta de los estambres estos datos se usaron para determinar el efecto de los diferentes tratamientos de iluminación y líquido estigmático sobre la germinación de los granos de polen.

Los tratamientos en los cuales se inoculó líquido estigmático presentaron tasas de germinación significativamente más altas a las 2 horas de haber iniciado el experimento ($H_{3, 128} = 54.57252$, $p < 0.0001$). Dentro de estos no se observan diferencias significativas entre las tasas de germinación de los tratamientos IcL y OcL (tabla 5). El primero presentó una tasa de germinación de 5.25 ± 1.06 %, mientras que en el tratamiento de OcL fue de 6.00 ± 1.36 %. Sin embargo, a las 24 horas el tratamiento de OcL presentó la tasa significativamente más alta de germinación (35.62 ± 6.24 %; $H_{3, 128} = 47.58921$, $p < 0.0001$, tabla 5).

La prueba de Spearman sobre el efecto de las variables de iluminación y líquido estigmático muestra que la iluminación tiene un efecto negativo sobre la tasa de germinación ya que en presencia de luz la germinación disminuye, aunque este efecto es muy bajo y solamente es significativo a las 24 horas ($r=-0.26$), mientras que el líquido estigmático presentó un efecto positivo sobre la misma variable tanto a las 2 horas ($r=0.64$) como a las 24 horas ($r=0.41$).

Tabla 5. Porcentaje de germinación (promedio \pm ES) de los granos de polen provenientes de los estambres internos de *Nymphaea gracilis* según el tratamiento de iluminación y líquido estigmático a las 2 horas y 24 horas de haber iniciado los experimentos.

Tratamiento	N		Porcentaje promedio de germinación \pm error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
IcL	33	33	5.25 \pm 1.06 ^a	3.33 \pm 1.37 ^b
IsL	33	33	0.01 ^b	1.41 \pm 0.53 ^b
OcL	33	33	6.00 \pm 1.36 ^a	35.62 \pm 6.24 ^a
OsL	33	33	0 ^b	3.35 \pm 1.79 ^b

Nota: Los superíndices diferentes denotan diferencias significativas por columnas (Dunn, $p<0.05$). IcL= Iluminación + líquido estigmático, IsL= Iluminación sin líquido estigmático, OcL= Oscuridad + líquido estigmático; OsL= Oscuridad sin líquido estigmático.

En el caso del índice de germinación relativa a la luz, los granos de polen de los tratamientos IcL y OcL presentaron un índice de 0.46 por lo que se consideran indiferentes a la luz.

Para determinar el efecto de la concentración de sacarosa sobre la germinación se utilizaron los datos de los tratamientos IcL, OcL y su respectivo testigo. El tratamiento de 0 % o testigo presentó una tasa de germinación de 7.11 \pm 1.87 % (tabla 6, figura 7) a las 2 horas de haber iniciado el experimento mientras que la concentración de 2 % presentó la tasa de germinación más alta (13.50 \pm 3.50 %;

H_{10, 55} 27.56187, p=0.0021, tabla 6, figura 7), si bien se observa una diferencia significativa con algunas otras concentraciones probadas, no se encontró diferencia significativa con el tratamiento testigo. A las 24 horas no se encontraron diferencias significativas entre la tasa de germinación del testigo y el resto de los tratamientos, sin embargo, la concentración de 20 % presenta una tendencia a una tasa de germinación mayor (31.88±15.26 %; H_{10, 55}=7.956001, p=0.6331, tabla 6, figura 7).

Tabla 6. Porcentaje de germinación (promedio ± ES) de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* provenientes de los estambres internos según la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo a las 2 horas y a las 24 horas de haber iniciado los experimentos.

Concentración	N		Porcentaje promedio de germinación ± error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
0	6	6	7.11±1.87 ^{ab}	20.09±14.93 ^a
1	6	6	12.93±3.45 ^{ab}	14.04±12.14 ^a
2	6	6	13.50±3.50 ^a	18.35±16.41 ^a
3	6	6	5.63±2.34 ^{ab}	30.55±13.67 ^a
4	6	6	6.69±3.12 ^{ab}	19.84±16.14 ^a
5	6	6	3.47±2.69 ^{ab}	27.41±14.77 ^a
10	6	6	2.60±1.21 ^{ab}	26.46±13.46 ^a
15	6	6	0.96±0.54 ^{ab}	15.46±10.09 ^a
20	6	6	6.74±3.00 ^{ab}	31.88±15.26 ^a
25	6	6	0.14 ^b	4.53±3.28 ^a
30	6	6	2.08 ^{ab}	5.60±3.40 ^a

Nota: Las letras diferentes en los superíndices indican diferencias significativas entre los grupos por columnas (Dunn, p<0.05).

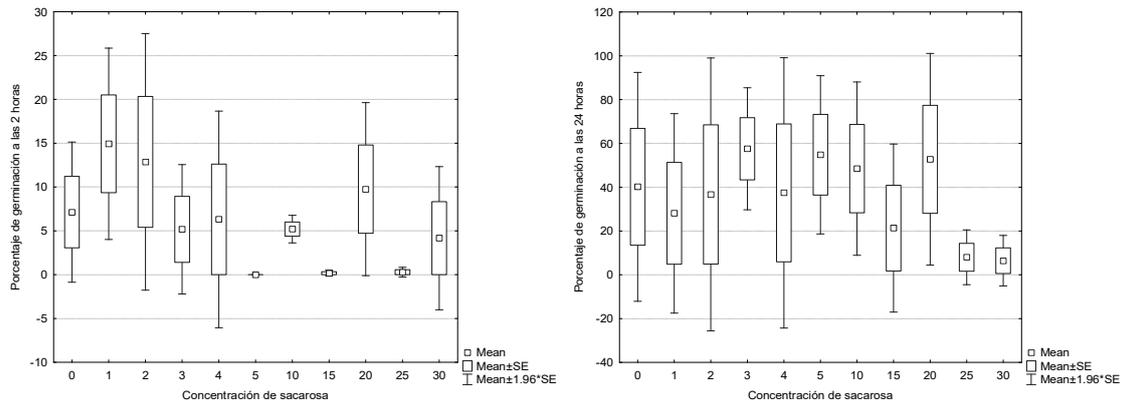


Figura 7. Porcentaje de germinación de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* provenientes de los estambres internos según la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo a las 2 horas (izquierda) y a las 24 horas (derecha) de haber iniciado los experimentos.

Germinación de los granos de polen de los estambres medios

Los granos de polen provenientes de los estambres medios presentaron la mayor tasa de germinación a las 24 horas de haber iniciado el experimento (3.55 ± 0.41 %; $Z=5.888312$, $p < 0.0001$). En la germinación a través del tiempo de experimentación se observa una disminución de la germinación a través del tiempo, el primer mostró el porcentaje de germinación más alto, tanto a las 2 horas de haber iniciado el experimento (7.35 ± 1.18 %; $H_{2, 392}=51.30179$, $p < 0.001$, tabla 7) como a las 24 horas (7.42 ± 1.04 %; $H_{2, 392}=77.84527$, $p < 0.0001$, tabla 7).

Para determinar el efecto de los tratamientos de líquido estigmático e iluminación se tomaron en cuenta solamente los datos del primer día después de la colecta de los estambres. Al igual que en los estambres internos, los tratamientos en los que se inoculó líquido estigmático presentan las tasas de germinación significativamente más altas que los tratamientos en los no se inoculó, sin diferencia entre ellos, esto sucede a las 2 horas de haber iniciado el experimento ($H_{2, 127}=65.85901$, $p < 0.0001$, tabla 8) y a las 24 horas ($H_{2, 127}=36.07258$, $p < 0.0001$, tabla 8). A las 2 horas las tasas de germinación fueron 8.60 ± 2.15 % para el tratamiento OcL y 20.15 ± 3.10 % para el tratamiento IcL, mientras que a las 24 horas estas fueron 7.08 ± 1.14 % y 14.32 ± 2.71 % respectivamente.

Tabla 7. Porcentaje de germinación (promedio \pm ES) de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* provenientes de los estambres medios a través del tiempo de experimentación.

Días después de la colecta	N		Porcentaje de germinación \pm error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
1	131	131	7.35 \pm 1.18 ^a	7.42 \pm 1.04 ^a
8	132	132	0.16 \pm 0.05 ^b	2.78 \pm 0.51 ^b
15	132	132	0.30 \pm 0.09 ^b	0.48 \pm 0.10 ^c

Nota: Los super índices diferentes indican diferencias significativas entre los grupos, por columnas (Dunn, $p < 0.05$).

La prueba de Spearman muestra que en este caso no existe ninguna clase de influencia significativa en la tasa de germinación por parte de las variables de iluminación, no obstante, en el caso de la variable de líquido estigmático se observó una relación positiva y significativa con la tasa de germinación tanto a las 2 horas de haber iniciado los experimentos ($r=0.670$) como las 24 horas ($r=0.491$).

Tabla 8. Porcentaje de germinación (promedio \pm ES) de los granos de polen de los estambres medios de *Nymphaea gracilis* según el tratamiento de iluminación y líquido estigmático a las 2 horas y 24 horas de haber iniciado los experimentos.

Tratamiento	N		Porcentaje de germinación \pm error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
IcL	33	33	20.15 \pm 3.10 ^a	14.32 \pm 2.71 ^a
IsL	33	33	0 ^b	2.56 \pm 0.92 ^c
OcL	33	33	8.60 \pm 2.15 ^a	7.08 \pm 1.14 ^{ab}
OsL	32	32	0.45 \pm 0.29 ^b	5.67 \pm 2.46 ^{bc}

Nota: Los superíndices diferentes denotan diferencia significativa entre los grupos por columnas (Dunn, $p < 0.05$). IcL= Iluminación + líquido estigmático, IsL= Iluminación sin líquido estigmático, OcL= Oscuridad + líquido estigmático; OsL= Oscuridad sin líquido.

Para analizar el efecto de la luz sobre la germinación de los granos de polen de los estambres medios, se emplearon solamente los datos de los tratamientos en los que se inoculó líquido estigmático, en este caso los granos de polen se consideran indiferentes a la luz ya que el valor de GRL calculado fue de 0.70.

Se emplearon los datos de los tratamientos OcL, IcL y su respectivo testigo para determinar el efecto de las diferentes concentraciones de sacarosa, se encontró que la concentración de sacarosa modifica la germinación de los granos de polen. A las 2 horas la concentración de 2 % de sacarosa presentó la tasa de germinación más alta (41.84 ± 4.18 %; $H_{10, 55} = 39.48567$, $p < 0.0001$, tabla 9, figura 8) en comparación a las otras 10 concentraciones probadas, mientras que a las 24 horas no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de sacarosa analizadas ($H_{10, 55} = 8.017273$, $p = 0.6271$, tabla 9, figura 8), sin embargo, la concentración de 30 % presentó una tendencia de germinación mayor (23.40 ± 13.72 %).

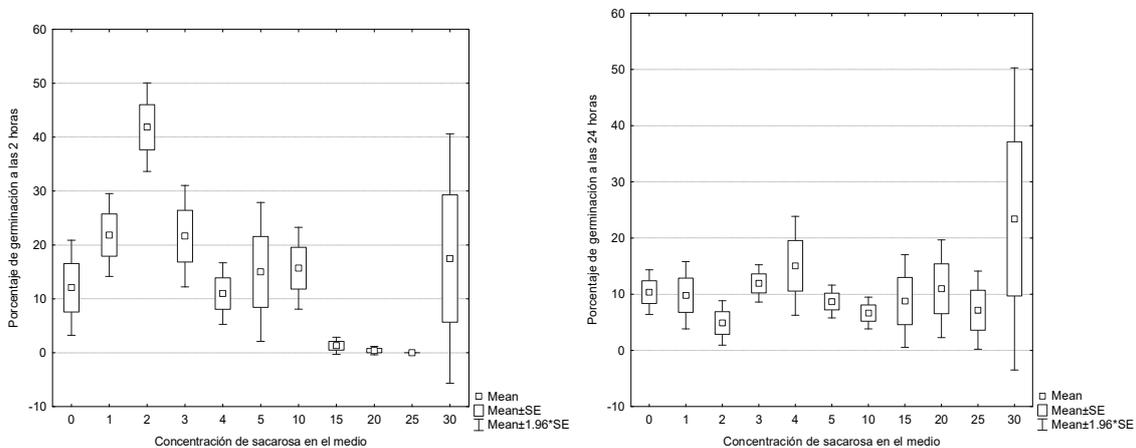


Figura 8. Porcentaje de germinación de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* provenientes de los estambres medios según la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo a las 2 horas (izquierda) y a las 24 horas (derecha) de haber iniciado los experimentos.

Tabla 9. Porcentaje de germinación (promedio \pm ES) de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* provenientes de los estambres medios según la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo a las 2 horas y a las 24 horas de haber iniciado los experimentos.

Concentración	N		Porcentaje promedio de germinación \pm error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
0	6	6	12.05 \pm 4.49 ^{ab}	10.36 \pm 2.02 ^a
1	6	6	21.84 \pm 3.91 ^{ab}	9.82 \pm 3.05 ^a
2	6	6	41.84 \pm 4.18 ^a	4.88 \pm 2.01 ^a
3	6	6	21.62 \pm 4.80 ^{ab}	11.92 \pm 1.69 ^a
4	6	6	10.97 \pm 2.91 ^{ab}	15.05 \pm 4.48 ^a
5	6	6	14.99 \pm 6.58 ^{ab}	8.70 \pm 1.49 ^a
10	6	6	15.67 \pm 3.86 ^{ab}	6.64 \pm 1.44 ^a
15	6	6	1.28 \pm 0.81 ^b	4.78 \pm 4.21 ^a
20	6	6	0.39 ^b	10.97 \pm 4.43 ^a
25	6	6	0 ^b	7.15 \pm 3.54 ^a
30	6	6	17.47 \pm 1.80 ^{ab}	23.40 \pm 13.72 ^a

Nota: Las letras diferentes en los superíndices indican diferencias significativas entre los grupos por columnas (Dunn, $p < 0.05$).

Germinación de los granos de polen de los estambres externos

Los resultados de los estambres externos son similares a los de los estambres internos, con la excepción de que si bien a las 24 horas de iniciado el experimento la tasa de germinación es mayor (5.78 \pm 0.77 %), pero esta no es significativamente diferente con la de las 2 horas (2.87 \pm 0.40 %) ($Z=0.760286$, $p=0.447084$). En este caso se observa una disminución de la germinación a lo largo del tiempo de experimentación, el primer día presentó la tasa de germinación significativamente más alta tanto a las 2 horas (5.10 \pm 0.86 %; $H_{2, 388}=27.96968$, $p < 0.0001$, tabla 10) como a las 24 horas (9.03 \pm 1.81 %; $H_{2, 388}=52.51712$, $p < 0.0001$, tabla 10).

Tabla 10. Porcentaje de germinación (promedio \pm ES) de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* provenientes de los estambres externos a través del tiempo de experimentación.

Días después de la colecta	N		Porcentaje promedio de germinación \pm error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
1	129	129	5.10 \pm 0.86 ^a	9.03 \pm 1.81 ^a
8	132	132	1.76 \pm 0.24 ^b	7.91 \pm 1.32 ^a
15	130	130	1.78 \pm 0.80 ^b	0.39 \pm 0.18 ^b

Nota: Los super índices diferentes indican diferencias significativas entre los grupos por columnas (Dunn, $p < 0.05$).

Para determinar el efecto de los tratamientos de líquido estigmático e iluminación se usaron los datos de germinación del primer día. En este caso los tratamientos en los que se inoculó líquido estigmático presentaron las mayores tasas de germinación, tanto a las 2 horas de haber iniciado el experimento ($H_{2,125}=60.54065$, $p < 0.0001$, tabla 11) como a las 24 horas ($H_{2,125}=24.37552$, $p < 0.0001$, tabla 11). El tratamiento IcL tuvo la tasa de germinación de 7.34 ± 1.46 % durante las primeras 2 horas y 11.75 ± 2.86 % a las 24 horas, mientras que el tratamiento OcL presentó tasa de germinación de 12.87 ± 2.52 % y 20.69 ± 5.85 % respectivamente.

La prueba de Spearman muestra que la iluminación no presenta una correlación significativa con el promedio de granos de polen germinados, mientras que en el caso del líquido estigmático se observó que su presencia contribuye a presentar significativamente mayor germinación tanto a las 2 horas de haber iniciado el experimento ($r=0.672$) como a las 24 horas ($r=0.419$).

Tabla 11. Porcentaje de germinación (promedio \pm ES) de los granos de polen provenientes de los estambres externos de *Nymphaea gracilis* según el tratamiento de iluminación y líquido estigmático usado a las 2 horas y 24 horas de haber iniciado los experimentos.

Tratamiento	N		Porcentaje promedio de germinación \pm error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
IcL	33	33	7.34 \pm 1.46 ^a	11.75 \pm 2.86 ^a
IsL	33	33	0 ^b	0.03 \pm 0.03 ^b
OcL	32	32	12.98 \pm 2.52 ^a	20.69 \pm 5.85 ^a
OsL	31	31	0.03 \pm 0.03 ^b	3.71 \pm 2.05 ^b

Nota: Los superíndices diferentes denotan diferencias significativas por columnas (Dunn, $p < 0.05$). IcL= Iluminación + líquido estigmático, IsL= Iluminación sin líquido estigmático, OcL= Oscuridad + líquido estigmático; OsL= Oscuridad sin líquido estigmático.

Para analizar el efecto de la luz sobre la germinación de los granos de polen de los estambres externos, se emplearon solamente los datos de los tratamientos OcL e IcL, los granos de polen en este caso son considerados indiferentes a la luz ya que el GRL calculado fue de 0.36.

Para determinar el efecto de las diferentes concentraciones de sacarosa se analizaron los datos combinados de los tratamientos OcL, IcL y su respectivo testigo. La concentración de 0 %, o el tratamiento testigo, presentó la tasa de germinación más alta (24.40 \pm 4.25 %; $H_{10, 55}=34.23971$, $p=0.0002$, tabla 12, figura 9) a las 2 horas de haber iniciado los experimentos, mientras que a las 24 horas el testigo presentó una tasa de germinación de 5.73 \pm 0.46 %, sin embargo, en este caso, la concentración de 15 % presentó la tasa de germinación más alta, aunque la diferencia no es significativa respecto al testigo (53.07 \pm 11.11 %; $H_{10, 55}=24.32675$, $p=0.0068$, tabla 12, figura 9).

Tabla 12. Porcentaje de germinación (promedio \pm ES) de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* proveniente de los estambres externos según la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo a las 2 horas y a las 24 horas de haber iniciado los experimentos.

Concentración	N		Porcentaje promedio de germinación \pm error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
0	6	6	24.40 \pm 4.25 ^a	5.73 \pm 0.46 ^{ab}
1	6	6	17.39 \pm 3.46 ^{ab}	0.83 \pm 0.83 ^{ab}
2	6	6	9.01 \pm 4.29 ^{ab}	0 ^b
3	6	6	22.71 \pm 8.43 ^{ab}	17.93 \pm 16.45 ^{ab}
4	6	6	10.26 \pm 2.62 ^{ab}	3.75 \pm 2.39 ^{ab}
5	6	6	11.47 \pm 3.66 ^{ab}	14.83 \pm 7.43 ^{ab}
10	6	6	9.36 \pm 4.02 ^{ab}	23.93 \pm 9.09 ^{ab}
15	6	6	3.28 \pm 1.52 ^{ab}	53.07 \pm 11.11 ^a
20	6	6	0.24 \pm 0.24 ^b	34.27 \pm 16.44 ^{ab}
25	6	6	1.12 \pm 0.73 ^b	5.34 \pm 3.96 ^{ab}
30	5	5	0.40 \pm 0.40 ^b	18.31 \pm 11.75 ^{ab}

Nota: Las letras diferentes en los superíndices indican diferencias significativas entre los grupos por columnas (Dunn, $p < 0.05$).

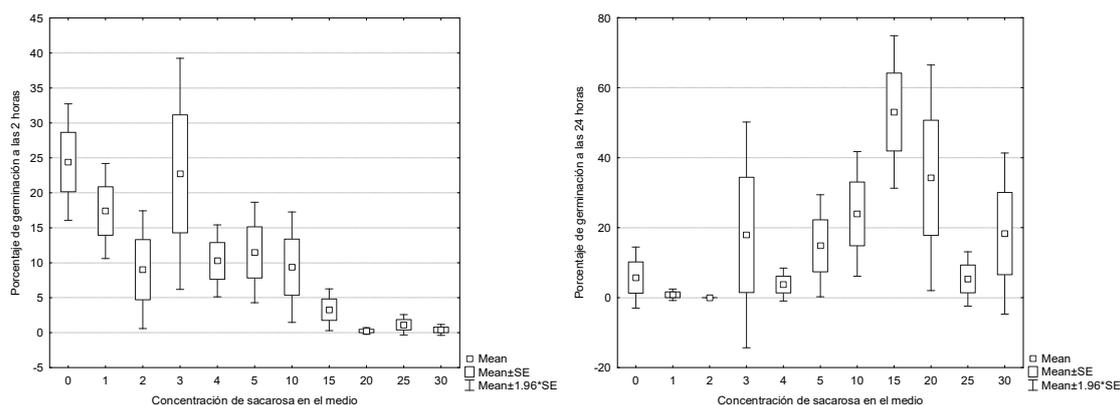


Figura 9. Porcentaje de germinación de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* provenientes de los estambres externos según la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo a las 2 horas (izquierda) y a las 24 horas (derecha) de haber iniciado los experimentos.

Formación y longitud de tubos polínicos

Las pruebas para determinar en qué condiciones se desarrollan tubos polínicos más largos muestran que a las 24 horas desde que los granos de polen fueron inoculados en el medio de cultivo los tubos polínicos son significativamente más largos que cuando son observados a las 2 horas. Además, observamos que los tubos polínicos son más largos durante el primer día después de la colecta de los estambres y su longitud promedio disminuye de manera continua en los siguientes días de experimentación. De la misma manera se encontró que los granos de polen provenientes de los estambres medios desarrollaron tubos polínicos más largos.

En el caso de los tratamientos de iluminación y líquido estigmático, se encontró que la iluminación usualmente disminuye de forma significativa el crecimiento de los tubos; por su parte el líquido estigmático de manera general favorece el crecimiento de los tubos. También se encontró que la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo afecta el tamaño de los tubos polínicos, de manera similar al efecto que tiene sobre la tasa de germinación.

De manera general se observó que la longitud promedio alcanzada por los tubos polínicos a las 2 horas de haber iniciado los experimentos fue de $51.04 \pm 1.00 \mu\text{m}$ lo cual fue significativamente menor que a las 24 horas ($60.89 \pm 1.38 \mu\text{m}$; $Z=7.803802$, $p<0.0001$). En cuanto a la posición de los estambres, a las 2 horas los estambres medios presentaron los tubos polínicos significativamente más largos ($69.18 \pm 2.24 \mu\text{m}$; $H_{2, 4006}=105.1594$, $p<0.0001$, tabla 13) que los otros tipos de estambres, este comportamiento también se observó a las 24 horas ($63.85 \pm 1.70 \mu\text{m}$; $H_{2, 5410}=264.8285$, $p<0.0001$, tabla 13).

Tabla 13. Longitud (promedio \pm ES) de los tubos polínicos según el juego de estambres de *Nymphaea gracilis* de los cuales provienen los granos de polen a las 2 horas y a las 24 horas de haber iniciado los experimentos, se incluyen los datos de todos los tiempos de experimentación.

Estambres	N		Longitud promedio (μm) \pm error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
Internos	1102	1758	36.00 \pm 2.25 ^{ab}	54.20 \pm 1.66 ^b
Medios	1798	1962	69.18 \pm 2.24 ^a	63.85 \pm 1.70 ^a
Externos	1109	1693	26.65 \pm 1.18 ^b	29.96 \pm 0.92 ^c

Nota: Los superíndices diferentes indican diferencias significativas entre los grupos por columnas (Dunn, $p < 0.05$).

Además, durante el primer día de experimentación, los tubos polínicos fueron significativamente más largos tanto a las 2 horas ($H_2, 4006=826.1282$, $p < 0.0001$, tabla 14) como a las 24 horas ($H_2, 5410=953.7377$, $p < 0.0001$, tabla 14) y llegaron a medir $76.90 \pm 1.94 \mu\text{m}$ y $64.21 \pm 1.41 \mu\text{m}$, respectivamente.

Tabla 14. Longitud (promedio \pm ES) de los tubos polínicos de *Nymphaea gracilis* según el tiempo de experimentación a las 2 horas y a las 24 horas de haber iniciado los experimentos.

Días después de la colecta	N		Longitud promedio (μm) \pm error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
1	2208	2633	76.90 \pm 1.94 ^a	64.21 \pm 1.41 ^a
8	918	1782	17.90 \pm 1.50 ^b	46.21 \pm 1.18 ^b
15	883	998	14.82 \pm 1.71 ^c	24.61 \pm 2.60 ^c

Nota: Los superíndices diferentes indican diferencias significativas entre los grupos por columnas (Dunn, $p < 0.05$).

Tubos polínicos de estambres internos

Los granos de polen de los estambres internos desarrollaron tubos polínicos significativamente más largos a las 24 horas de haber sido inoculados (54.20 ± 1.66

μm) que a las 2 horas ($36.00 \pm 2.25 \mu\text{m}$; $Z=6.965749$, $p<0.0001$). Además, durante primer día desde la colecta de los estambres se observó el mayor crecimiento promedio, esto sucedió a las 2 horas ($45.18 \pm 3.48 \mu\text{m}$; $H_{2, 1099}=40.92822$, $p<0.0001$, tabla 15) y a las 24 horas ($56.58 \pm 1.89 \mu\text{m}$; $H_{2, 1755}=160.9137$, $p<0.0001$, tabla 15).

Tabla 15. Longitud (promedio \pm ES) de los tubos polínicos de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* provenientes de los estambres internos a través del tiempo de experimentación.

Días después la colecta	N		Longitud promedio (μm) \pm error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
1	526	921	45.18 ± 3.48^a	56.58 ± 1.89^a
8	319	574	28.39 ± 3.58^b	54.14 ± 2.54^b
15	257	263	26.66 ± 4.67^c	45.99 ± 7.00^c

Nota: Los super índices diferentes indican diferencias significativas entre los grupos por columnas (Dunn, $p<0.05$).

Para determinar el crecimiento de los tubos polínicos según el tratamiento de iluminación y líquido estigmático se usaron únicamente los datos del primer día desde la colecta de los estambres. El tratamiento OcL presenta el mayor crecimiento promedio tanto a las 2 horas de haber iniciado el experimento ($114.32 \pm 13.57 \mu\text{m}$; $H_{3, 522}=326.5563$, $p<0.0001$, tabla 16) como a las 24 horas ($68.86 \pm 2.49 \mu\text{m}$; $H_{3, 917}=129.1607$, $p<0.0001$, tabla 16).

La prueba de Spearman muestra que la iluminación tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento de los tubos polínicos, pero este efecto solamente se observó a las 24 horas de haber iniciado el experimento ($r=-0.152$), mientras que el líquido estigmático presenta una correlación significativa y positiva tanto a las 2 horas ($r=0.777$) como a las 24 horas ($r=0.357$).

Tabla 16. Longitud (promedio \pm ES) de los tubos polínicos de los granos de polen provenientes de los estambres internos de *Nymphaea gracilis* según el tratamiento de iluminación y líquido estigmático usado a las 2 horas y 24 horas de haber iniciado los experimentos.

Tratamiento	N		Longitud promedio (μm) \pm error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
IcL	216	164	57.08 \pm 3.69 ^b	57.20 \pm 5.25 ^b
IsL	101	120	1.17 ^c	36.55 \pm 5.04 ^c
OcL	99	495	114.32 \pm 13.57 ^a	68.86 \pm 2.49 ^a
OsL	110	142	0 ^c	30.00 \pm 3.06 ^c

Nota: Los superíndices diferentes denotan diferencia significativa entre los grupos por columnas (Dunn, $p < 0.05$). IcL= Iluminación + líquido estigmático, IsL= Iluminación sin líquido estigmático, OcL= Oscuridad + líquido estigmático; OsL= Oscuridad sin líquido.

Para determinar el efecto de la sacarosa presente en el medio de cultivo se analizaron los datos de los tratamientos en los que se inoculó líquido estigmático, se observaron diferencias significativas entre la longitud de los tubos polínicos en las 11 concentraciones de sacarosa probadas tanto a las 2 horas de haber iniciado el experimento ($H_{10, 305} = 88.85708$; $p < 0.0001$, tabla 17, figura 10) como a las 24 horas ($H_{10, 649} = 25.97958$, $p = 0.0038$, tabla 17, figura 10).

A las 2 horas la concentración de 15 % presenta la tasa de elongación significativamente más alta que las demás concentraciones de sacarosa (243.10 \pm 107.67 μm), este valor es más del doble de la longitud promedio en el tratamiento testigo (94.84 \pm 10.58 μm). Mientras que a las 24 horas la concentración de 10 % presentó la longitud de tubo polínico más alta (78.82 \pm 8.94 μm), aunque este no fue significativamente diferente que el tratamiento testigo (72.06 \pm 9.67 μm).

Tabla 17. Longitud (promedio \pm ES) de los tubos polínicos de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* provenientes de los estambres internos según la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo a las 2 horas y a las 24 horas de haber iniciado los experimentos.

Concentración	N		Longitud promedio (μm) \pm error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
0	41	57	94.84 \pm 10.58 ^b	72.06 \pm 9.67 ^{ab}
1	93	48	69.76 \pm 4.50 ^b	75.47 \pm 9.37 ^a
2	46	36	101.02 \pm 14.82 ^b	45.56 \pm 5.72 ^{ab}
3	16	52	39.58 \pm 11.46 ^{bc}	65.69 \pm 5.30 ^{ab}
4	26	34	51.22 \pm 5.82 ^{bc}	72.57 \pm 10.72 ^{ab}
5	28	72	30.76 \pm 6.00 ^c	45.17 \pm 3.72 ^b
10	20	106	98.42 \pm 43.04 ^{Bc}	78.82 \pm 8.94 ^a
15	5	71	243.10 \pm 107.67 ^a	61.74 \pm 3.83 ^{ab}
20	17	111	136.70 \pm 35.85 ^b	67.49 \pm 3.50 ^a
25	11	40	4.10 ^c	56.64 \pm 4.39 ^{ab}
30	12	32	24.18 \pm 16.39 ^c	77.07 \pm 15.45 ^{ab}

Nota: Las letras diferentes en los superíndices indican diferencias significativas entre los grupos por columnas (Dunn, $p < 0.05$).

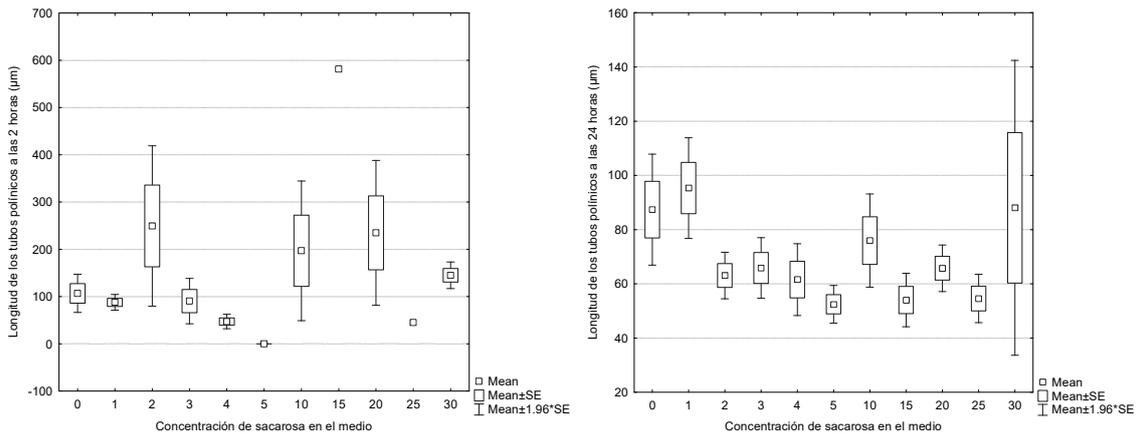


Figura 10. Longitud de los tubos polínicos de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* provenientes de los estambres internos según la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo a las 2 horas (izquierda) y a las 24 horas (derecha) de haber iniciado los experimentos.

Tubos polínicos de estambres medios

En el caso de los estambres medios la longitud promedio de los tubos polínicos fue significativamente más grande a las 2 horas de haber iniciado el experimento ($69.18 \pm 2.24 \mu\text{m}$) que a las 24 horas ($63.85 \pm 1.70 \mu\text{m}$; $Z=5.043961$, $p<0.0001$), al igual que en los estambres internos, durante el primer día de experimentación se observó el mayor crecimiento promedio que durante los otros tiempos de experimentación, esto sucedió a las 2 horas ($109.03 \pm 3.04 \mu\text{m}$; $H_2, 1795=779.4350$ $p<0.0001$, tabla 18) y a las 24 horas ($83.56 \pm 2.32 \mu\text{m}$; $H_2, 1959=390.6368$, $p<0.0001$, tabla 18).

Tabla 18. Longitud (promedio \pm ES) de los tubos polínicos de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* provenientes de los estambres medios a través del tiempo de experimentación.

Días después la colecta	N		Longitud promedio (μm) \pm error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
1	1092	1050	109.03 ± 3.04^a	83.56 ± 2.32^a
8	357	560	3.99 ± 1.13^b	46.04 ± 2.09^b
15	349	352	11.16 ± 2.36^b	33.40 ± 4.88^c

Nota: Los super índices diferentes indican diferencias significativas entre los grupos por columnas (Dunn, $p<0.05$).

Para determinar el efecto de los tratamientos de la iluminación y líquido estigmático se usaron los datos del primer día después de la colecta. A las 2 horas de haber iniciado los experimentos los tratamientos que contenían líquido estigmático presentaron tubos polínicos significativamente más largos que los tratamientos donde no se inoculó líquido ($H_3, 1088=417.5867$, $p<0.000$, tabla 19), con un promedio de $136.41 \pm 3.89 \mu\text{m}$ en el tratamiento de iluminación con líquido estigmático y $128.66 \pm 5.87 \mu\text{m}$ en el tratamiento OcL. Sin embargo, a las 24 horas se observó que, si bien el tratamiento IcL presentó los tubos polínicos más largos ($95.49 \pm 4.13 \mu\text{m}$, tabla 19), estos no fueron significativamente diferentes de los tratamientos IsL ($92.48 \pm 7.01 \mu\text{m}$, tabla 19) y OsL ($77.77 \pm 4.04 \mu\text{m}$, tabla 19), pero

sí con el tratamiento OcL ($62.77 \pm 3.29 \mu\text{m}$; $H_{3, 1046} = 28.23404$, $p < 0.0001$, tabla 19). La prueba de Spearman muestra que en este caso la iluminación tuvo un efecto significativo y positivo sobre la formación de los tubos polínicos tanto a las 2 horas ($r = 0.085$) como a las 24 horas ($r = 0.129$), también muestra que el líquido estigmático tuvo un efecto positivo sobre el desarrollo, pero este solamente es significativo a las 2 horas ($r = 0.613$).

Tabla 19. Longitud (promedio \pm ES) de los tubos polínicos de los granos de polen provenientes de los estambres medios de *Nymphaea gracilis* según el tratamiento de iluminación y líquido estigmático usado a las 2 horas y 24 horas de haber iniciado los experimentos.

Tratamiento	N		Longitud promedio (μm) \pm error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
IcL	565	383	136.41 ± 3.89^a	95.49 ± 4.13^a
IsL	110	180	0^b	92.48 ± 7.01^a
OcL	312	224	128.66 ± 5.87^a	62.77 ± 3.29^b
OsL	105	263	17.71 ± 3.39^b	77.77 ± 4.04^{ab}

Nota: Los superíndices diferentes denotan diferencia significativa entre los grupos por columnas (Dunn, $p < 0.05$). IcL= Iluminación + líquido estigmático, IsL= Iluminación sin líquido estigmático, OcL= Oscuridad + líquido estigmático; OsL= Oscuridad sin líquido.

Para determinar el efecto de la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo se analizaron los datos en conjunto de los tratamientos OcL, IcL y sus respectivos testigos. A las 2 horas la concentración de 2 % presenta los tubos significativamente más largos que las otras 10 concentraciones de sacarosa ($180.22 \pm 6.57 \mu\text{m}$; $H_{10, 866} = 242.9136$, $p < 0.0001$, tabla 20, figura 11), es importante notar que la longitud del tubo polínico en el tratamiento testigo es de $79.24 \pm 5.41 \mu\text{m}$, mientras que a las 24 horas la concentración de 2 % ($121.95 \pm 20.51 \mu\text{m}$) presenta la tasa de germinación significativamente más alta que el resto de las concentraciones de sacarosa, en este caso el tratamiento testigo presentó una longitud de tubos polínicos promedio de $81.14 \pm 8.94 \mu\text{m}$ ($H_{10, 596} = 52.80658$, $p < 0.0001$, tabla 20, figura 11).

Tabla 20. Longitud (promedio \pm ES) de los tubos polínicos de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* de los estambres medios según la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo a las 2 horas y a las 24 horas de haber iniciado los experimentos.

Concentración	N		Longitud promedio (μm) \pm error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
0	94	94	79.24 \pm 5.41 ^{ef}	81.14 \pm 8.94 ^{23bc}
1	159	69	137.09 \pm 6.59 ^{bc}	68.12 \pm 7.24 ^{23bc}
2	218	24	180.22 \pm 6.57 ^a	121.95 \pm 20. ^a
3	87	45	163.62 \pm 10.13 ^{ab}	97.09 \pm 8.35 ^{ab}
4	70	71	96.37 \pm 9.08 ^{de}	90.58 \pm 8.03 ^{abc}
5	76	49	155.78 \pm 12.28 ^{ab}	72.24 \pm 11.84 ^c
10	99	49	123.21 \pm 6.64 ^{bcd}	64.78 \pm 9.22 ^c
15	11	47	26.58 \pm 3.33 ^{efg}	85.81 \pm 9.83 ^{abc}
20	13	66	6.40 \pm 3.41 ^{fg}	110.71 \pm 10.45 ^{ab}
25	20	57	0 ^g	68.48 \pm 6.20 ^{bc}
30	30	36	109.19 \pm 27.55 ^{def}	72.84 \pm 7.77 ^{abc}

Nota: Las letras diferentes en los superíndices indican diferencias significativas por columnas (Dunn, $p < 0.05$).

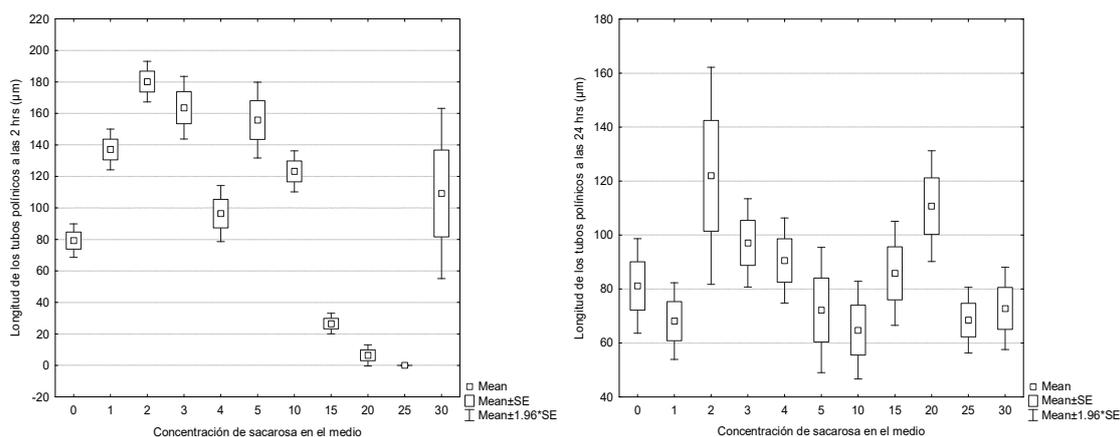


Figura 11. Longitud de los tubos polínicos de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* provenientes de los estambres medios según la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo a las 2 horas (izquierda) y a las 24 horas (derecha) de haber iniciado los experimentos.

Tubos polínicos de estambres externos

En los estambres externos la longitud de los tubos polínicos más grande se encontró a las 24 horas de haber iniciado los experimentos ($29.96 \pm 0.92 \mu\text{m}$) pero en este caso no hubo una diferencia significativa con las longitudes registradas a las 2 horas ($26.65 \pm 1.18 \mu\text{m}$; $Z=0.969590$, $p=0.332251$).

En el caso de la formación de los tubos polínicos a través del tiempo de experimentación, el primer día presentó los tubos polínicos significativamente más largos a las 2 horas de haber iniciado los experimentos ($36.05 \pm 1.79 \mu\text{m}$; $H_{2, 1106}=119.2624$, $p<0.0001$), sin embargo, en este caso el octavo día presentó el promedio de longitud de los tubos polínicos más alto a las 24 horas ($39.32 \pm 1.46 \mu\text{m}$, tabla 21), aunque no fue significativamente diferente al del primer día ($37.06 \pm 1.58 \mu\text{m}$; $H_{2, 1690}=457.1973$, $p < 0.0001$, tabla 21).

Tabla 21. Longitud (promedio \pm ES) de los tubos polínicos de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* provenientes de los estambres externos a través del tiempo de experimentación.

Días después la colecta	N		Longitud promedio (μm) \pm error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
1	590	662	36.05 ± 1.79^a	37.06 ± 1.58^a
8	242	648	24.59 ± 2.40^b	39.32 ± 1.46^a
15	277	383	8.45 ± 1.26^c	1.84 ± 0.61^b

Nota: Los super índices diferentes indican diferencias significativas entre los grupos por columnas (Dunn, $p<0.05$).

Para determinar el efecto de los diferentes tratamientos de iluminación y líquido estigmático y para poder comparar los resultados de este juego de estambres con el resto de estos se analizaron únicamente los datos de formación de tubos

pertenecientes al primer día desde la colecta de los estambres. Los tratamientos en los que se inoculó líquido estigmático presentaron los tubos polínicos significativamente más largos que los tratamientos en los que no se inoculó, aunque no fueron significativamente diferente entre ellos, esto sucede tanto a las 2 horas de haber iniciado los experimentos ($H_{3,456}=328.3277$, $p<0.0001$) como a las 24 horas ($H_{3,658}=236.5222$, $p<0.0001$). El tratamiento IcL presentó en promedio tubos de $56.29\pm 3.93 \mu\text{m}$ a las 2 horas y $46.56\pm 2.15 \mu\text{m}$ a las 24 horas (tabla 22); mientras que el tratamiento OcL presentó $55.93\pm 2.60 \mu\text{m}$ y $54.45\pm 3.29 \mu\text{m}$ (tabla 22), respectivamente.

La prueba de Spearman muestra que la iluminación tiene una influencia significativa y negativa sobre la formación de los tubos polínicos, pero esto sucede solamente a las 24 horas de haber iniciado los experimentos ($r=-0.159$), por su parte el líquido estigmático tiene una influencia significativa y positiva tanto a las 2 horas de haber iniciado los experimentos ($r=0.449$) como a las 24 horas ($r=0.379$).

Tabla 22. Longitud (promedio \pm ES) de los tubos polínicos de los granos de polen provenientes de los estambres externos de *Nymphaea gracilis* según el tratamiento de iluminación y líquido estigmático usado a las 2 horas y 24 horas de haber iniciado los experimentos.

Tratamiento	N		Longitud promedio (μm) \pm error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
IcL	147	193	56.29 ± 3.93^a	46.56 ± 2.15^a
IsL	110	101	0^b	0.21^c
OcL	232	221	55.93 ± 2.60^a	54.45 ± 3.29^a
OsL	101	147	0.18^b	23.76 ± 2.66^b

Nota: Los superíndices diferentes denotan diferencia significativa entre los grupos por columnas (Dunn, $p<0.05$). IcL= Iluminación + líquido estigmático, IsL= Iluminación sin líquido estigmático, OcL= Oscuridad + líquido estigmático; OsL= Oscuridad sin líquido.

Se usaron los datos de los tratamientos Ocl, lcl y su respectivo testigo para determinar si la cantidad de sacarosa presente en el medio tiene algún efecto sobre la formación de los tubos polínicos. Se encontró que existen diferencias significativas en la longitud de los tubos polínicos entre el testigo y algunas de las concentraciones de sacarosa usadas, a las 2 horas de haber iniciado los experimentos el testigo presentó una longitud promedio de $77.80 \pm 4.34 \mu\text{m}$, mientras que la mayor longitud registrada se presentó en la concentración de 4 % ($79.18 \pm 18.24 \mu\text{m}$; $H_{10, 365} = 152.8386$, $p < 0.0001$, tabla 23, figura 12); a las 24 horas la longitud promedio encontrada en el testigo fue de $54.58 \pm 5.05 \mu\text{m}$, en este caso la longitud más alta se encontró en la concentración de 4 % ($85.05 \pm 49.52 \mu\text{m}$; $H_{10, 403} = 98.79308$, $p < 0.0001$, tabla 23, figura 12), aunque en ninguno de los casos esta diferencia fue significativa respecto al testigo.

Tabla 23. Longitud (promedio \pm ES) de los tubos polínicos de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* provenientes de los estambres externos según la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo a las 2 horas y a las 24 horas de haber iniciado los experimentos.

Concentración	N		Longitud promedio (μm) \pm error estándar	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
0	92	20	77.80 ± 4.34^a	54.58 ± 5.05^a
1	74	13	65.57 ± 3.90^a	8.37 ± 4.94^{bc}
2	35	20	50.58 ± 4.37^a	0^c
3	50	15	70.10 ± 6.55^a	44.73 ± 6.90^{ab}
4	10	7	79.18 ± 18.24^a	85.05 ± 49.52^{ab}
5	29	40	58.07 ± 6.54^a	63.21 ± 10.00^a
10	18	38	46.90 ± 5.52^{ab}	54.68 ± 5.02^a
15	29	146	9.03 ± 3.13^c	57.68 ± 2.73^a
20	12	48	2.59^c	51.43 ± 3.39^a
25	18	33	17.44 ± 7.11^{bc}	29.56 ± 4.21^{ab}
30	12	34	3.12^c	61.25 ± 7.75^a

Nota: Las letras diferentes en los superíndices indican diferencias significativas entre los grupos por columnas (Dunn, $p < 0.05$).

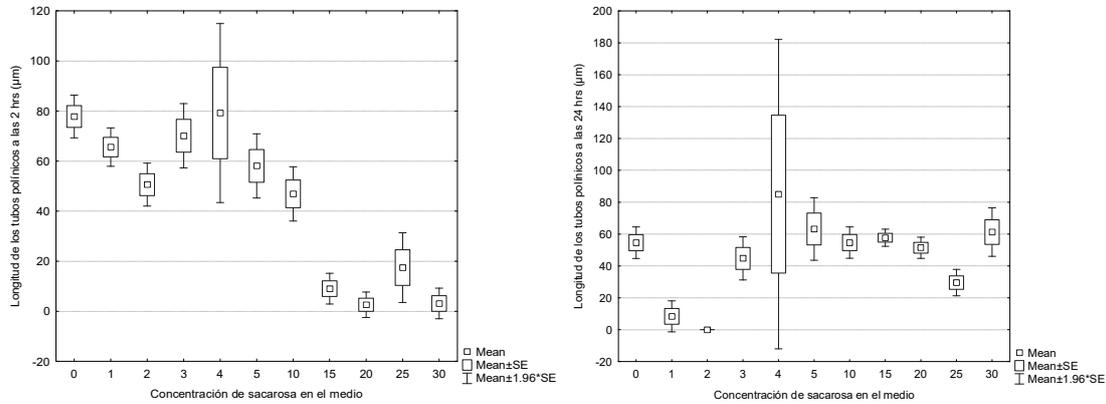


Figura 12. Longitud de los tubos polínicos de los granos de polen de *Nymphaea gracilis* provenientes de los estambres externos según la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo a las 2 horas (izquierda) y a las 24 horas (derecha) de haber iniciado los experimentos.

Discusión

Morfología de los granos de polen y volumen de líquido estigmático

Los granos de polen de *N. gracilis* son casi esferoidales y heteropolares con una sutura en forma de anillo, y un tamaño promedio de 38.78 µm. No existen reportes previos que describa los granos de polen de esta especie, pero se observa que, de forma general, esta morfología es similar a los granos de polen de otros representantes del género. Por ejemplo; en *N. mexicana* los granos de polen son en forma de domo, miden de 34-38 µm de ancho y están divididos por una sutura en forma de anillo (Capperino y Schneider, 1985). En *N. nouchali* los granos son casi elipsoidales, heteropolares con un sulco en forma de anillo y la morfología de la exina es psilada (Bodhipadma *et al.*, 2013), características similares a lo observado en *N. gracilis*. En *N. odorata* y *N. lotus* el polen también es zonosulcado (El-Ghazali y Abd-Alla, 2001; Williams *et al.*, 2010), en el último caso, los granos de polen miden en promedio 37.45 µm y la exina es también psilata (El-Ghazali y Abd-Alla, 2001).

La ornamentación de la superficie de la exina de los granos de polen, y otras características morfológicas de los mismos es variable en los representantes del género *Nymphaea*, ya que además de la condición psilada, como la que se encontró en *N. gracilis*, se han observado ornamentaciones de tipo verrugosa, baculada, gemada, faveolada, granulada y variaciones de estas (Bhowmik y Datta, 2012; Taylor *et al.*, 2015) no solamente entre individuos de diferentes especies, sino también dentro de organismos de la misma especie, pero de diversas poblaciones (Volkova y Shipunov, 2007; Remizowa *et al.*, 2008).

La morfología de los granos de polen aparentemente depende del grupo de plantas al que pertenece y es probable que se relacione con el o los tipos de polinizadores con los que interactúa. Por ejemplo, se ha propuesto que la ornamentación psilada surgió de manera temprana en la historia evolutiva de la familia Araceae y que está relacionada directamente con la polinización por escarabajos (Hesse, 2000; Punekar y Kumaran, 2010). La hipótesis de la polinización por escarabajos en especies con granos de polen sin ornamentación o con ornamentaciones suaves también ha sido propuesta para diferentes representantes de la familia Nymphaeaceae como *Nymphaea* y *Victoria* (Wiersema, 1988). Particularmente las interacciones de polinización entre *Nymphaea* y coleópteros se registra, por ejemplo, en *N. elegans* (Schneider, 1982), *N. lotus* (Hirthe y Porembski, 2003) y *N. amazonum* (Fava y Gomes, 2017), la primera perteneciente al mismo subgénero *Brachiceras* que *N. gracilis*. Sin embargo, para *N. gracilis* los coleópteros solo son visitantes ocasionales y los principales polinizadores son *Apis mellifera* y *Allograpta obliqua* (Zepeda-Gómez *et al.*, 2020).

Si bien la polinización implica el movimiento de granos de polen y, por lo tanto, las características morfológicas de estos propágulos son determinantes para ello, las interacciones de polinización en *Nymphaea* involucran, además, toda la gama de

caracteres relacionados con la morfología floral y los patrones particulares de su antesis (Wiersema, 1988).

Las flores de *N. gracilis* presentan durante la fase femenina de la antesis una secreción estigmática que está involucrada primordialmente, en la polinización y germinación de los granos de polen (Wiersema, 1988; Zepeda-Gómez *et al.*, 2020). En la presente investigación se encontró que las flores de *N. gracilis* producen en promedio 290 μ l de líquido estigmático. Prácticamente en todas las especies del género *Nymphaea* se presenta este líquido (Wiersema, 1988), aunque existe un amplio rango del volumen que se produce en las flores, desde 100 μ l en *N. mexicana* hasta 2000 μ l en algunos cultivares (Meeuse y Schneider, 1979; Capperino y Schneider, 1985). Esta variación interespecífica está relacionada con el tamaño de las flores (Schneider y Chaney, 1981; Capperino y Schneider, 1985), específicamente con la cantidad de células o glándulas secretoras presentes en el disco estigmático, dado que el número de glándulas está relacionado directamente con el tamaño de la superficie de los tejidos (Turner *et al.*, 2000).

En general, hay pocos estudios sobre la cantidad de líquido o fluido estigmático producido por las flores de diversas especies ya que la mayor parte de las angiospermas producen cantidades mínimas que son difíciles de medir (Fan y Li, 2012). Pero en algunas especies de ninfas se ha observado una correlación positiva entre la cantidad de líquido estigmático y la cantidad de semillas que se producen por fruto (Capperino y Schneider, 1985) y, al menos en *N. gracilis* la cantidad de líquido estigmático está relacionado con la fase de la antesis en la que la flor se encuentra y por lo tanto con el periodo de receptividad del gineceo y con el éxito reproductivo de las mismas (Zepeda-Gómez *et al.*, 2020).

Estimación de la viabilidad con técnicas de tinción

Los resultados de las pruebas de viabilidad con acetocarmin (min=76 % y max=100 %; Tabla 1) y azul de anilina (min=60 % y max=99 %; Tabla 1) encontrados en este estudio para los granos de polen de *N. gracilis*, fueron altamente superiores a los resultados de germinación *in vitro* de los granos de polen que observamos, incluso con los resultados más altos de las tasas de germinación observadas.

Este fenómeno ha sido observado en otras especies y por diversos autores con resultados relativamente similares. Rathod *et al.* (2018) observaron que en *Mormodica* sp. diferentes tinciones, entre ellas la de acetocarmín y el azul de anilina, presentaron una tasa de viabilidad superior al 90 % mientras que, en la mejor combinación de sacarosa, líquido estigmático e iluminación, los granos de polen presentaron una tasa de germinación del 70 %. Lyra *et al.* (2011) reportaron que estos mismos métodos de tinción tendieron a sobreestimar la germinación de *Jatropha mollissima*, al menos en cultivos *in vitro*. Sin embargo, en ensayos más sensibles, o bien, con granos de polen en los que se sabe que la germinación disminuye drásticamente en un periodo de tiempo corto como en *Saccharum*, la tinción de azul de anilina ha podido arrojar resultados más acordes a la germinación observada *in vitro* (Melloni *et al.*, 2013).

Se sugiere que las pruebas de viabilidad con las tinciones pueden sobreestimar la capacidad de germinación de los granos de polen ya que la viabilidad es un proceso continuo, en el que la actividad de muchas enzimas está involucrada y aunque los granos hayan perdido la capacidad de germinar, aún puede contener enzimas activas (Dafni y Fimarge, 2000). Por ejemplo, Abdelgadir *et al.* (2012) observaron que el azul de anilina no es capaz de distinguir entre granos de polen frescos y granos de polen que fueron inactivados usando soluciones de etanol. Además, algunos autores han observado que estas tinciones son más útiles para estimar la tasa de formación de granos saludables o no abortados (Rodríguez-Riano y Dafni, 2000).

Un método de tinción alternativo para estimar la viabilidad de los granos de polen puede ser el uso de cloruro de tetrazolio, aunque este indicador también tiende a sobre estimar la viabilidad en relación con la técnica de germinación de los granos de polen (Beyhan y Serdar, 2008). Aun así, los métodos de tinción para determinar la viabilidad de los granos de polen son comunes en la literatura dado que resultan ser más rápidos y menos costosos que otros métodos de estimación de viabilidad.

Es importante tener en cuenta que existen varios tipos de pruebas que pueden realizarse para tener una mejor idea del porcentaje de viabilidad de los granos de polen, estas pueden ser divididas en tres categorías: 1) pruebas de germinación, 2) pruebas de metabolismo de polen y 3) tinciones tradicionales para indicar la presencia de citoplasma. Además, existen otros métodos menos usados como medir la conductividad química de los lixiviados del polen, tinciones que miden la actividad enzimática, el contenido de prolina y la producción de semillas en los frutos. Dado que no existe una prueba definitiva es recomendable usar una combinación de estas (Stone *et al.*, 1995; Dafni y Firmage, 2000; Tuinstra y Wedel, 2000). De esta forma, la estimación de la viabilidad puede ser complementada, por ejemplo, con el estudio del desarrollo de semillas en los frutos producidos por las plantas que fueron fecundadas con el mismo lote de granos de polen, sin embargo, el valor real de la viabilidad tampoco es posible de determinar usando este método (Fei y Nelson, 2003).

Las pruebas de germinación *in vitro* son usualmente las más precisas para determinar la viabilidad de los granos de polen (Stone y *et al.*, 1995). De manera adicional se pueden realizar estudios de actividad enzimática y de la evaluación de la germinación *in vivo* (Tuinstra y Wedel, 2000).

La germinación *in vitro* tiene la ventaja del control de las características del ambiente y el medio de cultivo, pero estas no necesariamente representan las condiciones de germinación *in vivo*, ya que diferentes interacciones pueden ocurrir entre los granos de polen y el medio de cultivo; y en ocasiones la germinación *in vivo* puede ser significativamente más alta que la estimada por los ensayos de germinación *in vitro* (Soares *et al.*, 2016; Impe *et al.*, 2019). Sin embargo, como se explica más adelante, el tamaño máximo encontrado en los tubos polínicos cultivados *in vitro* no es necesariamente el suficiente para cubrir la distancia entre la superficie del estigma y el ovario por lo que los resultados obtenidos no necesariamente representan el comportamiento esperado en situaciones *in vivo*.

Variación en la tasa de germinación a través del tiempo de experimentación

Las pruebas de viabilidad *in vitro* aplicadas al polen de *N. gracilis* permitieron establecer las características necesarias para promover la germinación de los granos de polen y la formación de los tubos polínicos, lo que facilitará la realización de estudios ulteriores sobre temas similares dentro de la misma especie o para incorporar aspectos de la polinización asistida que permitan asegurar la reproducción sexual de esta especie endémica y con graves problemas para su conservación por el deterioro de su hábitat.

En los ensayos sobre polinización asistida uno de los aspectos más relevantes a considerar para obtener tasas de fecundación altas, es el porcentaje de viabilidad de los granos de polen, el cual depende entre otras cosas, de la fuente de los granos de polen, del tiempo de su colecta y uso. Se observó que los granos de polen de *N. gracilis* pueden ser almacenados en bolsas de papel sin refrigeración hasta aproximadamente dos semanas, durante este periodo la germinación total promedio observada en los ensayos de germinación *in vitro* cambió de aproximadamente 9 % hasta 1 % (Tabla 3).

En los tratamientos en los que se inoculó líquido estigmático y diferentes concentraciones de sacarosa, los valores de germinación fueron en general más altos y cercanos al 50 % un día después de la colecta, sobre todo en los estambres medios (41.84 ± 4.18 % en 2 % de sacarosa) y externos (53.07 ± 11.11 % en 15 % de sacarosa) y se apreció una tendencia generalizada de disminución de viabilidad después de ocho días de almacenamiento de los granos de polen. Es importante destacar esto ya que la vida media de los granos de polen es definida como el periodo en que los granos conservan más del 50 % de su viabilidad (Dafni y Firmage, 2000), lo que podría indicar que en situaciones naturales el periodo de mayor viabilidad de los granos de polen de *N. gracilis* podría ser justo durante los primeros días en los que las anteras abren, aunque se necesitan experimentos más estrictos para corroborar esto.

En algunos miembros del género *Nymphaea*, se ha observado una disminución en la germinación de los granos de polen *in vivo* y se sabe que su efectividad en la formación de semillas disminuye a lo largo de la antesis debido a la disminución del líquido estigmático de las flores durante la misma (Meeuse y Schneider, 1979; Schneider y Chaney, 1981; Orban y Bouharmont, 1995; Zepeda-Gómez *et al.*, 2020). Es probable que esto suceda en el caso de *N. gracilis* si consideramos las tasas de viabilidad encontradas a través del tiempo de experimentación. El periodo relativamente corto de receptividad estigmática de *N. gracilis* parece durar de uno a dos días (Zepeda-Gómez *et al.*, 2020) lo cual puede indicar que los granos de polen no necesitan sobrevivir mucho en el ambiente para cumplir su función (Dafni y Firmage, 2000).

Además, desde que los granos de polen son liberados de las anteras hasta que son depositados en el estigma, su viabilidad está enormemente influenciada por diversos factores ambientales que afectan el contenido de agua y la capacidad osmótica, por ejemplo, si los granos de polen son expuestos a una alta humedad, pueden ser rehidratados antes de llegar al estigma, lo que en algunas especies

provoca pérdida de viabilidad (Pacini y Dolferus, 2019). Por otro lado, un factor que podría estar influyendo en la disminución de la viabilidad de los granos de polen de *N. gracilis* es, la pérdida de humedad por su condición de monadas, dado que se ha observado que entre más granos de polen contenga la unidad de dispersión estos mantienen una humedad relativa más alta por mayor tiempo (Dafni y Fimarge, 2000).

No menos importante es el hecho de que la viabilidad polínica puede variar entre las especies y dentro de ellas, por ejemplo, en arroz la longevidad de los granos de polen se calcula de 5 a 10 minutos, en maíz es de un día, en *Pennisetum sp.* es de 1 a 5 días y hasta 8 días en *Colopogon tuberosus*, mientras que entre cultivares de la misma especie la variación puede ser más marcada (Prasad *et al.*, 2011). En el presente estudio se evaluó la viabilidad polínica de una sola población de *N. gracilis* y sin considerar las características específicas de cada planta utilizada, de forma que aún es necesario explorar si la viabilidad puede variar intra e interpoblacionalmente.

Otra característica que puede explicar el declive de la viabilidad es la densidad poblacional de la especie, se ha observado que en organismos donde los individuos crecen unos junto a otros, presentan granos de polen con vida media corta, aunque esto parece no afectar su efectividad reproductiva (Dafni y Fimarge, 2000). Además, es probable que en la especie de estudio la secuencia de eventos asociados a la fenología floral en ambientes naturales influya en la vida media de los granos de polen. En condiciones *in vivo* las poblaciones de *N. gracilis* suelen ser pequeñas, algo densas y limitadas por el hábitat acuático, las flores abren 5 o 6 días y usualmente cada flor se encuentra en diferentes fases de la antesis, pero siempre los dos primeros días de la floración el gineceo es receptivo y tiene líquido estigmático, mientras que los tres días subsiguientes la flor es solo funcionalmente masculina (Zepeda-Gómez *et al.*, 2020). En cualquier caso, la posibilidad de que

un grano de polen germine sobre un gineceo está íntimamente relacionada a su llegada a un gineceo cercano y receptivo, así como a su propia dispersión.

Germinación y elongación de los tubos polínicos entre los diferentes juegos de estambres

Como se mencionó en la sección de resultados, los granos de polen de *N. gracilis* presentan una tasa de germinación *in vitro* significativamente diferente entre los tres juegos de estambres. En la mejor combinación de sacarosa, líquido estigmático e iluminación los granos de polen de los estambres internos presentan tasas de germinación relativamente menores siendo su germinación más alta 31.88 %, mientras que los estambres medios y externos presentaron una tasa de germinación de 41.84 % y 53.07 %, respectivamente, de manera similar los estambres internos presentan la germinación más baja en el tratamiento testigo. Estos resultados son contrastantes a los encontrados en las pruebas de elongación de los tubos polínicos, ya que los estambres medios presentaron una tasa de elongación más alta que el resto de los juegos de estambres; durante el primer día de experimentación y en concentraciones de 2 % de sacarosa y a las 2 horas, mostraron los tubos polínicos más largos ($180.22 \pm 6.57 \mu\text{m}$).

En diversas especies se ha observado que cuando existen diferentes juegos de estambres, la germinación de sus granos de polen puede variar entre ellos, sin embargo, esto se ha estudiado principalmente en especies con anteras heteromorfas o que presentan heteranteria. Por ejemplo, en la familia Melastomataceae el androceo está compuesto por dos juegos de estambres morfológicamente diferentes, los externos son considerados usualmente como estambres polinizadores y los internos como estambres de alimentación, los primeros contienen en general más granos de polen y son más grandes que los estambres de alimentación, en *Melastoma dodecadrum* la tasa de germinación en los estambres polinizadores es mayor (Luo *et al.*, 2009). Peach y Mazer (2019), observaron que en *Clarika unguiculata*, los granos de polen provenientes de

estambres morfológicamente diferentes presentan una tasa de elongación del tubo polínico significativamente diferente. Hrycan y Davis (2005) indican que en *Commelina coelestis* y *C. dianthifolia*, las anteras más llamativas y de coloración amarilla producen granos de polen menos viables, sin embargo, es importante notar que en este caso la germinación fue estimada usando técnicas de fluorescencia y no calculando la germinación *in vitro* o *in vivo*.

En *Senna reniformis* las flores presentan tres tipos de anteras que difieren en longitud y en la cantidad de granos de polen que producen y aunque no presentan diferencias en la tasa de germinación los autores observaron que, si se retiran las anteras cortas de las flores, estas son visitadas por menos polinizadores que las flores control y que las flores en las cuales se retiraron los otros juegos de estambres (Mesquita-Neto *et al.*, 2017). Se cree que para hacer efectiva esta diferencia entre los tipos de estambres las plantas presentan otras características como la coloración y/o la posición de las anteras para así modificar las interacciones de polinización para aumentar o disminuir el consumo de los granos por parte del polinizador (Luo *et al.*, 2009).

Los resultados de las pruebas de germinación y elongación de los tubos polínicos de *N. gracilis*, parecen concordar con la hipótesis de que, en plantas con varios tipos de estambres, los estambres no alimentarios producen polen que es capaz de alcanzar el estigma de manera más eficiente. En el género *Nymphaea* muchos representantes presentan un cambio gradual entre la morfología de los pétalos y los estambres, este cambio ocurre usualmente con características como la coloración, el tamaño y la morfología de los estambres (Volkova *et al.*, 2007; Begum *et al.*, 2010). En *N. gracilis* los estambres internos son más pequeños que los otros dos juegos de estambres que los rodean, los cuales miden hasta el doble de largo de los estambres internos (Zepeda-Gómez *et al.*, 2020). Los estambres más externos de *N. gracilis* presentan una coloración blanquecina similar a la de los pétalos en la región más apical y este color se convierte en amarillo al

acercarse a la base del estambre, Luo *et al.* (2009) proponen que esta diferencia de color puede existir para que los polinizadores perciban los granos de polen de los estambres amarillos como alimento y eviten consumir los granos de los otros juegos de estambres que se encuentran en los verticilos más internos de la flor. Desde el punto de vista reproductivo, esto podría estar favoreciendo la fecundación cruzada y disminuyendo la autofecundación, dado que durante la antesis *N. gracilis* expone los granos de polen de las anteras externas por un periodo que coincide con la receptividad estigmática (Zepeda-Gómez *et al.*, 2020). En varios representantes de las familias en las cuales ocurre heteranteria, las flores carecen de nectarios florales (Mesquita-Neto *et al.*, 2017) como sucede en la especie estudiada, por lo que la atracción de los polinizadores debe realizarse por otros mecanismos. Además, Zepeda-Gómez *et al.*, (2020), observaron que los estambres externos y medios producen significativamente más granos de polen que los estambres internos. Otras características que puede indicar la diversificación de las funciones de las anteras de *N. gracilis* es la posición que tienen, la germinabilidad de los granos de polen que producen y la tasa de crecimiento de los tubos polínicos, por ejemplo, se ha observado que el posicionamiento de las anteras afecta la manera en que los granos de polen son depositados y con ello la posibilidad de ser transportados o no a otra planta en el cuerpo de los polinizadores (Vallejo-Marín *et al.*, 2009; Dellinger *et al.*, 2019).

Es importante considerar que los estambres en *N. gracilis* abren en días diferentes durante la antesis y dependiendo del juego al que pertenecen, (Zepeda-Gómez *et al.*, 2020), lo cual podría indicar que no existe una competencia directa entre los granos de polen. Sin embargo, es posible que la morfología y coloración de los estambres puedan seguir teniendo una utilidad durante las interacciones con los polinizadores, sobre todo para guiarlos al gineceo, esto se podría estar logrando al aumentar la coloración amarilla en el interior de las flores (Lunau, 2000).

Germinación de los granos de polen y elongación de los tubos polínicos según el tiempo de observación

En los experimentos realizados para evaluar la elongación de los tubos polínicos en diferentes concentraciones de sacarosa se observó, sobre todo, que en las concentraciones superiores al 5 % de sacarosa los tubos polínicos presentaron una elongación promedio igual o menor a las 24 horas que a las 2 horas, es decir, que los tubos polínicos ya no crecieron después de 2 horas de tener contacto con el medio de cultivo; mientras que en las concentraciones entre 0 % y 4 % de sacarosa, en general, se observó que los tubos polínicos continúan creciendo después de las primeras 2 horas de observación.

Díaz y Garay (2008) observaron que concentraciones altas de sacarosa, disminuyen la tasa del crecimiento de los tubos polínicos en *Agave tequilana* y *A. angustifolia*, y provoca la ruptura de los tubos polínicos tanto al inicio de la germinación como en tubos relativamente desarrollados debido a la osmolaridad del medio (Baloch *et al.*, 2001). Además, existe la hipótesis de que los tubos polínicos podrían detener su crecimiento *in vitro* debido a una sobreproducción de etanol (Díaz y Garay, 2008). Si bien los granos de polen y los tubos polínicos presentan respiración aeróbica la fermentación alcohólica también representa un mecanismo sumamente activo sobre todo durante la elongación del tubo polínico (Burke *et al.*, 2004; Rounds *et al.*, 2010). Los granos de polen de tabaco son capaces de generar, a las 20 horas de haber sido inoculados en un medio de crecimiento hasta 100 μM de etanol, dicha concentración, de ser agregada de manera exógena, detendría el crecimiento de los tubos polínicos (Bucher *et al.*, 1995).

Por su parte, la germinación de los granos de polen de *N. gracilis* ocurre dentro de las primeras dos horas de que se exponen a un medio de cultivo e incrementa significativamente hacia las 24 horas de observación. Para otras especies como *N. odorata* se reporta que el 50 % de la germinación de los granos de polen se

observa a los 30 minutos desde la polinización y aumenta hasta 90 % después de los 60 minutos (Williams *et al.*, 2010), mientras que en *N. micrantha* y *N. 'Peter Slocum'* los granos de polen germinaron hasta las 2 horas, pero las germinaciones no aumentan después de las 6 horas de observación (Sun *et al.*, 2019).

Algunos estudios *in vivo* señalan que tanto el proceso de germinación como el de elongación de los tubos polínicos, no ocurren inmediatamente después de que el polen entra en contacto con los tejidos femeninos ya que para que el tubo polínico se desarrolle es necesario que primero los granos de polen pasen por dos procesos fisiológicos, la adhesión y la hidratación; estos eventos usualmente tienen lugar sobre la superficie del estigma, particularmente en las células papilares (Sarker *et al.* 1988; Ma *et al.*, 2012; Dresselhaus y Franklin-Tong, 2013). En el caso de la adhesión, este proceso es resultado de la interacción entre el estigma y los granos de polen, dado que se observa una tasa menor de interacción entre granos de polen y estigmas pertenecientes a diferentes especies, este es el primer proceso celular que ocurre cuando los granos de polen son depositados en el estigma, y depende de la deposición y sedimentación de estos (Heizmann *et al.*, 2000; Dresselhaus y Frankling-Tong, 2013). Se cree que este proceso involucra interacciones físicas, mecánicas y bioquímicas entre los granos de polen y la superficie del estigma, si bien se ha observado que las características morfológicas de la exina contribuyen a la adhesión, también se ha observado que la adhesión es significativamente menor entre granos y estigmas de diferentes especies, por lo cual debe haber otro tipo de interacción adicional (Heizmann *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2016; Ito y Gorb *et al.*, 2019). Es importante considerar que el fenómeno de adhesión puede estar ausente en *Nymphaea* dado que los granos de polen usualmente germinan dentro del líquido estigmático y sin interactuar directamente con las papilas estigmáticas (Williams *et al.*, 2010). Tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro* la hidratación de los granos de polen es un proceso relativamente variable y depende de la disposición de agua, lípidos y otros componentes tanto en el exudado estigmático como en los granos de polen (Wolters-Arts *et al.*, 2002).

En condiciones *in vivo*, cuando los granos de polen entran en contacto con el estigma, se rehidratan, continúan con su desarrollo y se restaura la actividad metabólica dentro de ellos. Para promover y sostener el crecimiento del tubo polínico algunos granos de polen, que germinan rápido, contienen 30 % o más de contenido de agua, lo cual señala que la humedad relativa de los granos influye en la velocidad de germinación (Pacini y Dolferus, 2019). Además, en una etapa previa a la germinación existe una alta absorción de azúcares y su conversión a almidón de tal forma que en cuanto el crecimiento del tubo comienza, los granos aumentan dramáticamente los componentes necesarios para la respiración (Rounds *et al.*, 2011).

Durante el proceso de hidratación también intervienen algunas características de los granos de polen y el estigma, por ejemplo, se sabe que la presencia o ausencia de proteínas y lípidos en la pared celular del polen puede intervenir de manera significativa en la germinación de este. Además, se ha observado que la cantidad de hidratación del polen puede variar con la presencia o ausencia de proteínas celulares específicas del estigma como lo es Exo70A1 en *Brassica* (Samuel *et al.*, 2009; Dresselhaus y Frankling-Tong, 2013).

De la misma forma, algunos experimentos han demostrado que al agregar lípidos exógenos la tasa de germinación aumenta, inclusive en estigmas con granos de polen no compatibles, señalándolos como una característica clave del proceso (Mayfield y Preuss, 2000). En adición a estos factores, están los procesos de reconocimiento genético por parte del estigma (Pacini y Dolferus, 2019). Las interacciones de reconocimiento entre los granos de polen y los estigmas están altamente reguladas, de forma que los diferentes eventos que ocurren entre la adhesión de los granos de polen y la fecundación del ovulo son interrumpidos entre granos de polen y estigmas de diferentes especies, este fenómeno es denominado incongruidad. La incongruidad es usualmente más fuerte entre

grupos con mayor separación taxonómica y más débil entre grupos cercanos, por ejemplo, entre individuos del mismo género (Hiscock y Allen, 2008). Los mecanismos de incongruidad pueden estar presentes desde los procesos de adhesión e hidratación, sin embargo, esto se ha observado principalmente en plantas con estigmas secos (Mosseler, 1989; Swanson *et al.*, 2004). En esta discriminación de los granos por parte del estigma intervienen lípidos y proteínas contenidas en la superficie estigmática, de tal forma que se cree que esta capacidad de discriminación se debe a que los componentes de los granos de polen y el estigma son codificados por familias de genes altamente polimórficos (Mayfield *et al.*, 2001; Schein *et al.*, 2004; Swanson *et al.*, 2004). Dentro del género *Nymphaea* se ha observado un alto nivel de incongruidad al intentar crear híbridos con plantas del género, sin embargo, no se ha prestado mucha atención a las interacciones entre los granos de polen y el estigma y es probable que no haya éxito en la creación de híbridos artificiales por la diferencia del número cromosómico de las especies a hibridar (Les *et al.*, 2004; Songpanich y Hongtrakul, 2010). Aunque en estudios recientes también se ha observado incompatibilidad en las primeras interacciones entre los granos de polen y el líquido estigmático, por lo cual este debe contener muchos de los compuestos involucrados en los procesos de reconocimiento, compatibilidad e incongruidad, o bien, contener los elementos necesarios para que los tubos polínicos crezcan correctamente dentro del líquido estigmático y el estigma (Sun *et al.*, 2019).

Composición del líquido estigmático y su relación con los procesos estudiados

Como se explicó con anterioridad, se observó que los granos de polen de *N. gracilis* presentan una tasa de germinación y de elongación de los tubos polínicos mayores en los tratamientos en los que se inoculó líquido estigmático, esto probablemente se debe a las características químicas del mismo. El desempeño del polen está altamente influenciado por los tejidos femeninos y particularmente por el exudado del estigma, el cual es usualmente considerado como una reserva de agua, metabolitos secundarios y precursores de la pared celular que sirven

como fuente de energía para el crecimiento rápido del tubo polínico (Rejón *et al.*, 2013).

En todos los representantes del género *Nymphaea* se ha observado líquido estigmático abundante (Orban y Bouharmont, 1995) y, en estudios *in vivo* se reporta que los granos de polen germinan dentro o sobre esta secreción estigmática (Williams *et al.*, 2010). Sin embargo, también se ha observado que en condiciones *in vitro* los granos de polen de al menos *N. nouchali* tienen la capacidad de germinar sin la presencia del líquido (Bodhipadma *et al.*, 2013), lo que puede sugerir que la germinación y el crecimiento de los tubos depende tanto de los tejidos femeninos como de los elementos presentes en los propios granos.

El análisis químico del líquido estigmático de *Nymphaea citrina*, *N. odorata*, *N. gigantea*, *N. micranthay* y *N. zinzibarensis* indica una baja concentración de azúcares, entre 0.5 y 3 % de hexosa, glucosa y fructuosa. Estas concentraciones están por debajo del límite de detección por parte de algunos insectos polinizadores como las abejas, de tal suerte que ellas usualmente no lo liban. Además de estos azúcares, el líquido presenta boro (5 a 10 ppm), calcio, potasio y magnesio, sobre todo en forma de cloruros y iones, y en concentraciones cercanas a las óptimas para la germinación de granos de polen. (Meeuse y Schneider, 1979; Thien *et al.*, 2009). En *N. mexicana* el fluido estigmático además contiene aminoácidos y compuestos como fosfoserina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutámico, glutamina, prolina, glicina, alanina, cisteína, metionina, cistationina, isoleucina, tirosina, fenilalanina, ácido γ -aminobutírico, D-L- α -hidroxilisina, ornitina, lisina, histidina y arginina (Capperino y Schneider, 1985). Meeuse y Shneider (1979) encontraron en diversos cultivares de *Nymphaea* los siguientes aminoácidos, aunque su concentración es desconocida: prolina, alanina, lisina, cisteína, arginina, glicina, ácido glutámico, treonina, triptófano, ornitina, fenilalanina, leucina, isoleucina, histidina y tirosina.

El conocimiento de la composición del líquido estigmático es primordial para comprender de manera concisa su papel en los procesos de reconocimiento, germinación de los granos de polen, así como el desarrollo y elongación de los tubos polínicos a través de los tejidos estigmáticos. Además, el estudio de dichos componentes puede apoyar los intentos de reproducción *ex situ* e *in situ* de especies con rangos de distribución limitados como la especie de estudio, y al mismo tiempo revelar la naturaleza de los cambios evolutivos que han sucedido entre los diferentes clados de angiospermas.

Germinación de los granos de polen y relación con la concentración de sacarosa

De acuerdo con los resultados, la adición de sacarosa en los medios de cultivo afecta la tasa de germinación de los granos de polen de *N. gracilis*. De manera general las mayores tasas de germinación se observan en concentraciones menores a 5 % de sacarosa, en algunos casos las concentraciones de 15 % y 20 % presentaron germinaciones altas. En general la relación entre la concentración de sacarosa en el medio y la tasa de germinación de los granos de polen no sigue un comportamiento lineal ni de crecimiento exponencial.

Los granos de polen de una gran cantidad de especies germinan exitosamente en soluciones de azúcares y es probable que la sacarosa sea la fuente más común y frecuente de energía para el polen. Esta provee y mantiene un ambiente osmótico para la germinación y el crecimiento continuo de los tubos polínicos (Gill, 2014). O'Kelley (1955) comprobó que los granos de polen absorben sacarosa entre otros azúcares disueltos en el medio, al observar que cuando la sacarosa contenía carbono 14, el dióxido de carbono generado durante la respiración celular de los granos y los tubos polínicos también contenía carbono 14.

Patel y Mankad (2015) observaron que, al aumentar la cantidad de sacarosa en el medio de cultivo, los granos de polen de *Impatiens balsamina* aumentaron su germinación aproximadamente un 20 %, sin embargo, es importante notar que los autores usaron concentraciones relativamente bajas de sacarosa (entre 0.1 y 0.8 %) si se comparan con las usadas en la presente investigación. También se ha observado que concentraciones más altas pueden disminuir la germinación de los granos de polen, así como del crecimiento de los tubos polínicos. Liu *et al.* (2013) observaron en *Areca* una mayor germinación en la concentración de 4 % de sacarosa, la cual disminuye en las concentraciones subsecuentes y más altas, hasta alcanzar 0% de germinación bajo una concentración de sacarosa de 10 %. Stone *et al.* (2004) encontraron resultados similares, usando concentraciones relativamente más altas que los trabajos citados con anterioridad (entre 10 y 100 % de sacarosa), al examinar la germinación de los granos de polen de *Conospermum*, en las concentraciones más bajas (10-30 %) se observaron tasas de germinación de hasta aproximadamente 80 %, mientras que, en concentraciones superiores, observaron tasas de germinación significativamente más bajas (<10 % de germinación en 80% de sacarosa).

Varios grupos de proteínas parecen estar implicados en el transporte de azúcares durante el crecimiento del tubo polínico una de estas es la familia STP (Sugar Transport Protein) (Rottmann *et al.*, 2016). En *Arabidopsis* se expresan al menos tres de estas proteínas (Reinders, 2016). También existen familias de proteínas transportadoras de azúcares específicos como las proteínas transportadoras de sacarosa (SUT) y se sabe que, en ausencia de algunos de estos transportadores, los granos de polen maduran normalmente, pero son incapaces de generar tubos polínicos funcionales (Sivitz *et al.*, 2008; Hirose *et al.*, 2010). Además, se ha observado la presencia de invertasas que usan sacarosa como sustrato para producir glucosa y fructuosa en la célula vegetativa (Ylstra *et al.*, 1998).

Dentro del grano de polen la sacarosa, la fructuosa y la glucosa, pueden ser aprovechados a través de dos vías metabólicas: la respiración oxidativa en las mitocondrias y la fermentación alcohólica en los plastidios. En tabaco y petunia se ha observado una gran tasa de fermentación inclusive bajo condiciones aerobias (Selinski y Scheibe, 2014).

La disminución de la germinación en altas concentraciones de sacarosa ha sido atribuida al cambio osmótico en el medio (Liu *et al.*, 2013). Sin embargo, existe evidencia que medios con la misma osmolaridad, pero con diferentes tipos de azúcares promueven diferentes tasas de germinación y crecimiento de tubos polínicos, siendo la sacarosa la que promueve una mayor tasa de crecimiento (Burke *et al.*, 2004). Algunos autores adicionan que es probable que la respuesta a la sacarosa y al cambio osmótico observado en los diversos grupos de angiospermas esté relacionado con el tamaño de los granos de polen (Rao y Ong, 1972).

Dentro del género *Nymphaea* solamente existe un trabajo en el que se analiza el efecto de diferentes características del medio de cultivo y de las condiciones del cultivo sobre la germinación de los granos de polen. Bodhipadma *et al.* (2013) encontraron que la concentración de sacarosa y la iluminación afectan significativamente la tasa de germinación en dos variedades de *N. nouchali*, durante las primeras dos horas y desde que inocularon los granos de polen no observaron germinación, sin embargo, a las 24 horas observaron 93 % de germinación en 5 % sacarosa, mientras que en concentraciones superiores la tasa de germinación fue menor. Esta tendencia es similar a la que se encontró en la presente investigación.

Elongación de los tubos polínicos

Dentro del grupo de los Nymphaeales la tasa de crecimiento de los tubos polínicos parece variar, así como las características de los estilos (Williams *et al.*, 2010). En *N. odorata* los granos de polen germinan sobre o debajo de la secreción estigmática, pero crecen entre las papilas del estigma para entrar en la región subdermal donde se encuentran al tejido de transmisión, este tejido está compuesto de células largas que parecen dirigir mecánicamente al tubo polínico hacia la región de fusión postgenital. Entonces, al parecer la longitud del tubo polínico depende del tamaño, la profundidad y ancho de la superficie estigmática, así como del ovario. En *N. odorata* la longitud del tubo varía de entre 2.04 y 6.30 mm y todo el proceso, desde la entrada de los tubos polínicos al tejido de transmisión y hasta que alcanzar los óvulos en la base del ovario tarda hasta 3 horas, pero la mayor tasa de fertilización se observa a las 5 horas (Williams *et al.*, 2010). En otras especies como *N. capensis* los tubos polínicos tardan hasta seis horas en alcanzar el ovario (Orban y Bouharmont, 1995) y se calcula que en *N. odorata* los tubos polínicos crecen hasta 6 mm con una tasa de crecimiento de 1 mm por hora (Williams *et al.*, 2010). De acuerdo con esto y considerando el tamaño de los estigmas de *N. gracillia* es probable que en condiciones *in vivo* los tubos polínicos deberán crecer más de lo que fue observado bajo condiciones de laboratorio en los experimentos *in vitro* que se realizaron, ya que los estigmas dentro de la especie miden 2.00-3.4 mm y el tamaño promedio máximo de los tubos polínicos encontrado en los cultivos fue de tan solo 243.10 μm o 0.243 mm.

Otra razón por la cual se pueden observar bajos valores de crecimiento en condiciones *in vitro* puede estar relacionado con cambios funcionales y químicos dentro de los tejidos femeninos. En *Trifolium pratense* la secreción estigmática contiene una concentración de sacarosa de aproximadamente 35 %, lo que estimula la germinación de los granos de polen, pero es demasiado alta para el crecimiento del tubo polínico, entonces la concentración baja hasta 12-15 % para promover el crecimiento del tubo, pero bajo estas condiciones no se observa

germinación de los granos. Se cree que algunos cambios en la composición química del estigma pueden estar asociados a los procesos de antesis y no solamente a la interacción con los granos de polen (Heslop-Harrison, 2000).

Por otro lado, es probable que los resultados obtenidos de los cultivos *in vitro* también estén influenciados por el tipo y características del sustrato, además de las condiciones en las que se mantuvieron, por ejemplo, la temperatura y la iluminación. Luza y Polito (1985) sugieren que la concentración de agar usada como gelificante puede tener un efecto negativo en la elongación de los tubos polínicos, en sus experimentos con *Juglans regia* encontraron que los medios con menos de 1.0 % de agar presentaron mayor germinación y mayor crecimiento de los tubos polínicos, probablemente por la fricción que se genera al contacto. Sin embargo, el uso de medios líquidos para este tipo de investigaciones no es recomendado dado que en estos es más fácil observar el desprendimiento de los tubos polínicos, lo que dificulta el estudio de su crecimiento y también provoca la subestimación de la viabilidad de los granos (Soares *et al.*, 2013). También existe evidencia que sugiere que concentraciones altas de agarosa (hasta 8%) pueden aumentar el crecimiento de los tubos polínicos y reducir el rompimiento de estos (Burke *et al.*, 2004). En el presente estudio se usó una concentración de 5 % (P/V) de agar como gelificante, dado que no se usaron otras concentraciones es imposible saber si este factor tuvo un efecto tanto en la tasa de germinación de los granos de polen de *N. gracilis* como en el crecimiento de los tubos polínicos.

Por otro lado, en condiciones *in vitro* la temperatura es un factor muy importante durante la elongación del tubo polínico, por lo que aumentar o reducir la temperatura más allá de la temperatura óptima puede resultar en un crecimiento significativamente reducido (Kakani *et al.*, 2005). Bodhipadma *et al.* (2013) observaron que en *N. nouchali* los granos de polen presentan una mayor germinación al ser cultivados en 32 °C en comparación a los que fueron cultivados en 22 °C. En los experimentos realizados en este estudio los granos de polen se

colocaron a 22 ± 2 °C durante 24 horas, si bien se encontraron resultados positivos, el efecto de la temperatura sobre la tasa de germinación y elongación requiere de evaluaciones más precisas.

Efecto de la iluminación durante la elongación de los tubos polínicos

Si bien, los cálculos sobre la dependencia de la luz para la germinación de los granos de polen indican que en *N. gracilis* estos parecen ser indiferentes a la luz, tanto en las pruebas de germinación como en las de elongación de los tubos polínicos, se observó una tendencia a un efecto negativo, aunque no significativo, provocado por la iluminación. En casi todos los cultivos colocados en oscuridad y sobre todo en aquellos en los que además se inoculó líquido estigmático, se observó una mayor germinación mayor longitud de tubos. Estos resultados son similares a los reportados por Bodhipadma *et al.* (2013), quienes observaron que en *N. nouchali* los granos de polen cultivados en oscuridad germinaban más que los que fueron inoculados en luz, sin embargo, en este caso la diferencia entre los tratamientos es significativa, específicamente los cultivos puestos bajo luz germinaron menos del 10 % sin importar la temperatura y la concentración de sacarosa.

El fenómeno de la intensidad de la luz influenciando la germinación y el crecimiento de los tubos polínicos ha sido observado múltiples veces, esto sucede tanto en condiciones *in vitro* como en condiciones *in vivo*. Campbell *et al.* (2001) reportan que en algunas variedades de trigo los granos de polen cultivados bajo una luz de alta intensidad (750 μmol) alcanzaron una germinación de 35 % mientras que los que fueron cultivados en baja intensidad (250 μmol) presentaron una germinación de 4 %.

Dhawan y Malik (1981) indican que los granos de polen de *Pinus roxburghii* germinaron más cuando estos fueron cultivados en completa oscuridad que

cuando se cultivaron bajo luz blanca. Sin embargo, no observaron diferencias al ser cultivados en luz roja, luz roja lejana o luz azul. También obtuvieron resultados similares cuando analizaron el efecto de estos factores sobre la elongación de los tubos polínicos, con la particularidad de que la luz roja presentó una tasa de elongación mayor que el resto de las condiciones de iluminación probadas.

Esta respuesta a los diferentes tipos de luz, especialmente a la luz roja y roja lejana, indican que los procesos pueden estar mediados por el fitocromo (Dhawan y Malik, 1981; Tripathi *et al.*, 2019). Sin embargo, el papel de fitocromo ha sido solamente observado en la formación de anteras y granos de polen en arroz, al exponer las inflorescencias a diferentes tipos de luz y diferentes fotoperiodos (Oard y Hu, 1995; Sun *et al.*, 2017; Tripathi *et al.*, 2019).

Chhabra y Malik (1978) observaron que en *Arachis hypogaea* los tubos polínicos tratados con diferentes tipos de luz (azul, verde, amarilla, roja) presentaron una elongación menor que el tratamiento de oscuridad dependiendo de la cantidad de tiempo que los cultivos estuvieron expuestos a cada tratamiento, posteriormente, Dhawan y Malik (1979), observaron que al ser tratados con luz roja y luz roja lejana aumentaron la actividad de enzimas succinato deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y particularmente en el caso de la primera enzima se ha observado durante el crecimiento del tubo polínico en *Arabidopsis* ya que participan en el ciclo del ácido tricarboxílico y la degradación de etanol (Yue *et al.*, 2014). Mientras que en otros tejidos se ha observado, además, que la presencia de luz blanca disminuye la presencia de succinato deshidrogenasa hasta la mitad de la que se presenta en oscuridad (Popov *et al.*, 2010).

Conclusiones

Los granos de polen de *N. gracilis* son granos tamaño mediano, heteropolares, zonosulcados, casi esferoidales en la vista polar y elípticos en la vista ecuatorial; presentan una ornamentación verrucada que se convierte en psilada en las áreas próximas a la apertura del sulco.

El volumen del líquido estigmático está relacionado directamente con el diámetro de los estigmas de las flores de *N. gracilis*.

La viabilidad de los granos de polen de *N. gracilis* decrece rápidamente después de ser liberados de las anteras.

La concentración de sacarosa en los medios de cultivo afecta tanto la germinación *in vitro* como el crecimiento de los tubos polínicos de *N. gracilis*.

La iluminación en la que son cultivados los granos de polen tiene un efecto sobre la germinación y el crecimiento de los tubos polínicos, en este caso se observó que, en la mayor parte de los casos, en oscuridad ambos fenómenos son mayores que cuando los granos de polen son cultivados en iluminación o luz blanca.

Para encontrar los mejores resultados en ambos fenómenos, la germinación y el crecimiento de los tubos polínicos es mejor cultivar los granos de polen en oscuridad, con la presencia de líquido estigmático y una concentración de sacarosa presente en el medio de 2-3 %.

Los granos de polen de *N. gracilis* difieren tanto en su tasa de germinación como en el crecimiento de sus tubos polínicos dependiendo del juego de estambre del cual estos provienen. Los granos de polen que provienen de los estambres externos germinan más y los que provienen de los estambres medios presentan tubos polínicos de mayor longitud.

Perspectivas a futuro

Para trabajos futuros es conveniente probar las variables que no fueron probadas en este trabajo como la temperatura y el nivel de humedad relativa en la que los granos de polen son cultivados, es probable que valga la pena realizar trabajos similares a los de Chhabra y Malik (1978) para estudiar la respuesta a diferentes tipos de luz, el de Bodhipadma *et al.* (2013) respecto a el cultivo de granos de polen en diferentes temperaturas, sin embargo, en este caso es importante tener en cuenta que los autores usaron temperaturas que ocurren de manera natural en la región donde se encuentran las poblaciones de plantas estudiadas. Por último y sobre todo si se tiene interés en realizar programas de mejoramiento genético es importante estudiar el efecto de la temperatura de almacenamiento en la vida media de los granos de polen.

Referencias

- Abdelgadir, H. A., Johnson, S. D., & Van Staden, J. (2012). Pollen viability, pollen germination and pollen tube growth in the biofuel seed crop *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). *South African Journal of Botany*, 79, 132-139.
- Alrashedy, N. A., & Molina, J. (2016). The ethnobotany of psychoactive plant use: a phylogenetic perspective. *PeerJ*, 4, e2546.
- Álvarez-Lopezello, J., Rivas-Manzano, I. V., Aguilera-Gómez, L. I., & González-Ledesma, M. (2016). Diversidad y estructura de un pastizal en El Cerrillo, Piedras Blancas, Estado de México, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 87(3), 980-989.
- Anushka, P. V. A., Withanage, S. P., Amarathunge, L. A. R., Liyanage, K. K, Bandara, P. K. G. S. S., & Gamage, A. K. (2016). Towards improvement of genetic diversity of future rubber clones: evaluation of 2008 hand pollinated genotypes. *Research Institute of Sri Lanka*, 53, 57-65.

- Baloch, M. J., Lakho, A. R., Bhutto, H., & Solangi, M. Y. (2001). Impact of sucrose concentration on *in vitro* pollen germination of Okra, *Hibiscus esculentus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4(4), 402-403.
- Banks, H. (2003). Structure of pollen apertures in the Detarieae sensu stricto (Leguminosae: Caesalpinioideae), with particular reference to underlying structures (Zwischenkörper). *Annals of Botany*, 92(3), 425-435.
- Barboza, G. E., Cantero, J. J., Núñez, C., Pacciaroni, A., & Espinar, L. A. (2009). Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*, 34(1-2), 7-365.
- Baskin, C.C., and Baskin, J.M. (2001). *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press. USA. 29-42, 493-505
- Bedinger, P. (1992). The remarkable biology of pollen. *The Plant Cell*, 4(8), 879.
- Begum, H. A., Ghosal, K. K., & Chattopadhyay, T. K. (2010). Comparative morphology and floral biology of three species of the genus of *Nymphaea* from Bangladesh. *Bangladesh Journal of Botany*, 39(2), 179-183.
- Berger, F., Hamamura, Y., Ingouff, M., & Higashiyama, T. (2008). Double fertilization—caught in the act. *Trends in plant science*, 13(8), 437-443.
- Beyhan, N., & Serdar, U. (2008). Assessment of pollen viability and germinability in some European chestnut genotypes (*Castanea sativa* L.). *Horticultural Science*, 35(4), 171-178.
- Bhowmik, S., & Datta, B. K. (2012). Pollen dimorphism of several members of Nymphaeaceae and Nelumbonaceae: an index of geographical and ecological variation. *Notulae Scientia Biologicae*, 4(3), 38-44.a
- Blackmore, S., Wortley, A. H., Skvarla, J. J., & Rowley, J. R. (2007). Pollen wall development in flowering plants. *New Phytologist*, 174(3), 483-498.
- Bleckmann, A., Alter, S., & Dresselhaus, T. (2014). The beginning of a seed: regulatory mechanisms of double fertilization. *Frontiers in plant science*, 5, 452.
- Bodhipadma, K., Noichinda, S., Thaiyanto, P., & Leung, D. W. (2013). Morphology, viability, and germinability of pollen from two forms of *Nymphaea nouchali* var. *versicolor*, a day-blooming waterlily. *Science Asia*, 39, 214-218.
- Bonilla-Barbosa, J., Novelo, A., Orozco, Y. H., & Márquez-Guzmán, J. (2000). Comparative seed morphology of Mexican *Nymphaea* species. *Aquatic Botany*, 68(3), 189-204.
- Borg, M., Brownfield, L., & Twell, D. (2009). Male gametophyte development: a molecular perspective. *Journal of experimental botany*, 60(5), 1465-1478.
- Borsch, T., Hilu, K. W., Wiersema, J. H., Löhne, C., Barthlott, W., & Wilde, V. (2007). Phylogeny of *Nymphaea* (Nymphaeaceae): evidence from substitutions and microstructural changes in the chloroplast trnT-trnF region. *International Journal of Plant Sciences*, 168(5), 639-671.

- Borsch, T., Löhne, C., & Wiersema, J. (2008). Phylogeny and evolutionary patterns in Nymphaeales: integrating genes, genomes and morphology. *Taxon*, 57(4), 1052-4E.
- Borsch, T., Wiersema, J. H., Hellquist, C. B., Löhne, C., & Govers, K. (2014). Speciation in North American water lilies: evidence for the hybrid origin of the newly discovered Canadian endemic *Nymphaea loriana* sp. nov.(Nymphaeaceae) in a past contact zone. *Botany*, 92(12), 867-882.
- Bucher, M., Brander, K. A., Sbicego, S., Mandel, T., & Kuhlemeier, C. (1995). Aerobic fermentation in tobacco pollen. *Plant molecular biology*, 28(4), 739-750.
- Burke, J. J., Velten, J., & Oliver, M. J. (2004). *In vitro* analysis of cotton pollen germination. *Agronomy journal*, 96(2), 359-368.
- Calviño-Cancela, M., Ayres Fernández, C., & Cordero Rivera, A. (2007). European pond turtles (*Emys orbicularis*) as alternative dispersers of "water-dispersed" waterlily (*Nymphaea alba*). *Ecoscience*, 14(4), 529-534.
- Campbell, A. W., Griffin, W. B., Burritt, D. J., & Conner, A. J. (2001). The importance of light intensity for pollen tube growth and embryo survival in wheat×maize crosses. *Annals of Botany*, 87(4), 517-522.
- Capperino, M. E., & Schneider, E. L. (1985). Floral biology of *Nymphaea mexicana* Zucc.(Nymphaeaceae). *Aquatic Botany*, 23(1), 83-93.
- Cerdán, P. D., & Chory, J. (2003). Regulation of flowering time by light quality. *Nature*, 423(6942), 881-885.
- Chen, Y. Y., Fan, X. R., Li, Z., Li, W., & Huang, W. M. (2017). Low level of genetic variation and restricted gene flow in water lily *Nymphaea tetragona* populations from the Amur River. *Aquatic Botany*, 140, 55-61.
- Chen, Y. Y., Li, X. L., Yin, L. Y., & Li, W. (2008). Genetic diversity of the threatened aquatic plant *Ottelia alismoides* in the Yangtze River. *Aquatic Botany*, 88(1), 10-16.
- Chhabra, N., & Malik, C. P. (1978). Influence of spectral quality of light on pollen tube elongation in *Arachis hypogaea*. *Annals of Botany*, 42(5), 1109-1117.
- Dafni, A., & Firmage, D. (2000). Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Pollen and pollination* (pp. 113-132). Springer, Vienna.
- Dafni, A., Hesse, M., & Pacini, E. (Eds.). (2012). *Pollen and pollination*. Springer Science & Business Media.
- Dellinger, A. S., Pöllabauer, L., Loreti, M., Czurda, J., & Schönenberger, J. (2019). Testing functional hypotheses on poricidal anther dehiscence and heteranthery in buzz-pollinated flowers. *Acta ZooBot Austria*, 156, 197-214.
- Dhawan, A. K., & Malik, C. P. (1979). Phytochrome control of some oxidoreductases in germinating *Pinus roxburghii* Sarg pollen. *Plant and Cell Physiology*, 20(3), 675-678.

- Dhawan, A. K., & Malik, C. P. (1981). Effect of growth regulators and light on pollen germination and pollen tube growth in *Pinus roxburghii* Sarg. *Annals of Botany*, 47(2), 239-248.
- Díaz, S. L., & Garay, B. R. (2008). Simple methods for *in vitro* pollen germination and pollen preservation of selected species of the genus *Agave*. *e-Gnosis*, 6, 1-7.
- Dresselhaus, T., & Franklin-Tong, N. (2013). Male–female crosstalk during pollen germination, tube growth and guidance, and double fertilization. *Molecular plant*, 6(4), 1018-1036.
- Eckardt, N. A. (2002). Plant Reproduction Insights into the “Abominable Mystery”. *Plant Cell*, 14, 1670-1673
- Edlund, A. F., Swanson, R., & Preuss, D. (2004). Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *The Plant Cell*, 16(suppl 1), S84-S97.
- El-Ghazali, G. E. B., & Abd-Alla, W. E. (2001). Pollen morphological study on *Nymphaea lotus* L. (Nymphaeaceae) with emphasis on zonisulcate apertures. *Jpn. J. Histor. Bot*, 9, 79-84.
- Endress, P. K., & Doyle, J. A. (2015). Ancestral traits and specializations in the flowers of the basal grade of living angiosperms. *Taxon*, 64(6), 1093-1116.
- Fan, Y. L., & Li, Q. J. (2012). Stigmatic fluid aids self-pollination in *Roscoea debilis* (Zingiberaceae): a new delayed selfing mechanism. *Annals of botany*, 110(5), 969-975.
- Fava, W. S., & Gomes, V. G. (2017). “Back-to-bud” strategy in *Nymphaea amazonum* (Nymphaeaceae): A protogynous macrophyte of the Pantanal wetlands. *Aquatic botany*, 140, 1-3.
- Fei, S., & Nelson, E. (2003). Estimation of pollen viability, shedding pattern, and longevity of creeping bentgrass on artificial media. *Crop Science*, 43(6), 2177-2181.
- Flores-Cruz, M., Santana-Lira, H. D., Martínez-Bernal, A., & Fraile, M. A. (2006). Pollen Morphology of Mimosa series Quadrivalves (Leguminosae, Mimosoideae). *Acta botánica mexicana*, (77), 1-13.
- Funes, G., Díaz, S., Venier, P. (2009). *La temperatura como principal determinante de la germinación en especies del Chaco seco Argentina*. *Ecología Austral*, v.19, p. 129-138
- Gandolfo, M. A., Nixon, K. C., & Crepet, W. L. (2004). Cretaceous flowers of Nymphaeaceae and implications for complex insect entrapment pollination mechanisms in early angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(21), 8056-8060.
- Gill, M. (2014). Pollen storage and viability. *International Journal of Botany*, 4, 1-18.
- Grob, V., Moline, P., Pfeifer, E., Novelo, A. R., & Rutishauser, R. (2006). Developmental morphology of branching flowers in *Nymphaea prolifera*. *Journal of Plant Research*, 119(6), 561-570.

- Halbritter, H., Ulrich, S., Grímsson, F., Weber, M., Zetter, R., Hesse, M., ... & Frosch-Radivo, A. (2018). *Illustrated pollen terminology*. Springer.
- Hashida, S. N., Takahashi, H., Takahara, K., Kawai-Yamada, M., Kitazaki, K., Shoji, K., ... & Uchimiya, H. (2013). NAD⁺ accumulation during pollen maturation in *Arabidopsis* regulating onset of germination. *Molecular plant*, 6(1), 216-225.
- Heizmann, P., Luu, D. T., & Dumas, C. (2000). Pollen-stigma adhesion in the Brassicaceae. *Annals of Botany*, 85(suppl_1), 23-27.
- Heslop-Harrison, Y. (2000). Control gates and micro-ecology: the pollen-stigma interaction in perspective. *Annals of Botany*, 85(suppl_1), 5-13.
- Hesse, M. (2000). Pollen wall stratification and pollination. *Pollen and pollination* (pp. 1-17). Springer, Vienna.
- Hirose, T., Zhang, Z., Miyao, A., Hirochika, H., Ohsugi, R., & Terao, T. (2010). Disruption of a gene for rice sucrose transporter, OsSUT1, impairs pollen function but pollen maturation is unaffected. *Journal of Experimental Botany*, 61(13), 3639-3646.
- Hirsche, J., García Fernández, J. M., Stabentheiner, E., Großkinsky, D. K., & Roitsch, T. (2017). Differential effects of carbohydrates on *Arabidopsis* pollen germination. *Plant and Cell Physiology*, 58(4), 691-701.
- Hirthe, G., & Porembski, S. (2003). Pollination of *Nymphaea lotus* (Nymphaeaceae) by rhinoceros beetles and bees in the northeastern Ivory Coast. *Plant Biology*, 5(6), 670-676.
- Hiscock, S. J., & Allen, A. M. (2008). Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: the search for consensus. *New Phytologist*, 179(2), 286-317.
- Hoekstra, F. A. (1995). Collecting pollen for genetic resources conservation. *Collecting Plant Genetic Diversity: Technical Guidelines*. IPGRI/FAO/UNEP/IUCN. CAB International, Wallingford, 527-550.
- Hoyo, Y., Fujiwara, K., & Hoshino, Y. (2014). Effects of different wavelengths of LED light on pollen germination and direction of pollen tube elongation in *Cyrtanthus mackenii*. *Advances in Horticultural Science*, 190-194.
- Hrycan, W. C., & Davis, A. R. (2005). Comparative structure and pollen production of the stamens and pollinator-deceptive staminodes of *Commelina coelestis* and *C. dianthifolia* (Commelinaceae). *Annals of Botany*, 95(7), 1113-1130.
- Hu, G. W., Lei, L. G., Liu, K. M., & Long, C. L. (2009). Floral development in *Nymphaea tetragona* (Nymphaeaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 159(2), 211-221.
- Impe, D., Reitz, J., Köpnick, C., Rolletschek, H., Börner, A., Senula, A., & Nagel, M. (2019). Assessment of pollen viability for wheat. *Frontiers in plant science*, 10, 1588.

- Ito, S., & Gorb, S. N. (2019). Fresh “Pollen Adhesive” Weakens Humidity-Dependent Pollen Adhesion. *ACS applied materials & interfaces*, 11(27), 24691-24698.
- Kakani, V. G., Reddy, K. R., Koti, S., Wallace, T. P., Prasad, P. V. V., Reddy, V. R., & Zhao, D. (2005). Differences in *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of cotton cultivars in response to high temperature. *Annals of botany*, 96(1), 59-67.
- Klok, P. F., & van der Velde, G. (2017). Plant traits and environment: floating leaf blade production and turnover of waterlilies. *PeerJ*, 5, e3212.
- Kothari, V., Patadia, M., & Trivedi, N. (2011). Microwave sterilized media supports better microbial growth than autoclaved media. *Research in Biotechnology*, 2(5).
- Kriebel, R., Khabbazian, M., & Sytsma, K. J. (2017). A continuous morphological approach to study the evolution of pollen in a phylogenetic context: An example with the order Myrtales. *PLOS one*, 12(12).
- Lagera, A. J., Balinado, L. O., Baldomero, J. R., Rotairo, H. F. I., Tero, N. L., Maghinay, M. S., ... & Rufino, J. V. (2017). Varying sugars and sugar concentrations influence *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of *Cassia alata* l. *Journal of Young Investigators*, 33(1).
- Les, D. H., Moody, M. L., Doran, A. S., & Phillips, W. E. (2004). A genetically confirmed intersubgeneric hybrid in *Nymphaea* L. (Nymphaeaceae Salisb.). *HortScience*, 39(2), 219-222.
- Li, J., Gu, J., Wang, X., Zhang, W., & Jin, Z. (2020). Pollen limitation in the endangered Chinese endemic species *Sinocalycanthus chinensis*. *Ecology and Evolution*, 10(15), 8439-8448.
- Lin, H., Qu, Z., & Meredith, J. C. (2016). Pressure sensitive microparticle adhesion through biomimicry of the pollen–stigma interaction. *Soft Matter*, 12(11), 2965-2975.
- Liu, L., Huang, L., & Li, Y. (2013). Influence of boric acid and sucrose on the germination and growth of areca pollen. *American Journal of Plant Sciences*, 2013.
- Löhne, C., Yoo, M. J., Borsch, T., Wiersema, J., Wilde, V., Bell, C. D., ... & Soltis, P. S. (2008). Biogeography of Nymphaeales: extant patterns and historical events. *Taxon*, 57(4), 1123-19E.
- Lord, E. M., & Russell, S. D. (2002). The mechanisms of pollination and fertilization in plants. *Annual review of cell and developmental biology*, 18(1), 81-105.
- Lunau, K. (2000). The ecology and evolution of visual pollen signals. *Plant Systematics and Evolution*, 222(1), 89-111.
- Luo, Z. L., Gu, L., & Zhang, D. X. (2009). Intrafloral differentiation of stamens in heterantherous flowers. *Journal of Systematics and Evolution*, 47(1), 43-56.
- Luza, J. G., & Polito, V. S. (1985). *In vitro* germination and storage of English walnut pollen. *Scientia Horticulturae*, 27(3-4), 303-316.

- Lyra, D. H., Sampaio, L. S., Pereira, D. A., Silva, A. P., & Amaral, C. L. F. (2011). Pollen viability and germination in *Jatropha ribifolia* and *Jatropha mollissima* (Euphorbiaceae): Species with potential for biofuel production. *African Journal of Biotechnology*, 10(3), 368-374.
- Ma, J. F., Liu, Z. H., Chu, C. P., Hu, Z. Y., Wang, X. L., & Zhang, X. S. (2012). Different regulatory processes control pollen hydration and germination in *Arabidopsis*. *Sexual plant reproduction*, 25(1), 77-82.
- Maia, A. C. D., de Lima, C. T., Navarro, D. M. D. A. F., Chartier, M., Giulietti, A. M., & Machado, I. C. (2014). The floral scents of *Nymphaea* subg. *Hydrocallis* (Nymphaeaceae), the New World night-blooming water lilies, and their relation with putative pollinators. *Phytochemistry*, 103, 67-75.
- Mayfield, J. A., & Preuss, D. (2000). Rapid initiation of *Arabidopsis* pollination requires the oleosin-domain protein GRP17. *Nature Cell Biology*, 2(2), 128-130.
- Mayfield, J. A., Fiebig, A., Johnstone, S. E., & Preuss, D. (2001). Gene families from the *Arabidopsis thaliana* pollen coat proteome. *Science*, 292(5526), 2482-2485.
- Meeuse, B. J., & Schneider, E. L. (1979). *Nymphaea* revisited: a preliminary communication. *Israel Journal of Plant Sciences*, 28(2), 65-79.
- Melloni, M. L. G., Scarpari, M. S., de Mendonça, J. R., Perecin, D., de Andrade Landell, M. G., & Pinto, L. R. (2013). Comparison of two staining methods for pollen viability studies in sugarcane. *Sugar Tech*, 15(1), 103-107.
- Mendoza-Cariño, M., Quevedo-Nolasco, A., Bravo-Vinaja, A., Flores-Magdaleno, H., de la Isla, D. B., de Lourdes, M., ... & Zamora-Morales, B. P. (2014). Estado ecológico de ríos y vegetación ribereña en el contexto de la nueva ley general de aguas de México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 30(4), 429-436.
- Mesquita-Neto, J. N., Costa, B. K. P., & Schindwein, C. (2017). Heteranthery as a solution to the demand for pollen as food and for pollination—Legitimate flower visitors reject flowers without feeding anthers. *Plant Biology*, 19(6), 942-950.
- Milberg, P., Andersson, L., Thompson, K. (2000). Large-seeded species are less dependent on light for germination than small-seeded ones. *Seed Science Research*, v.10 p.99-104.
- Mosseler, A. (1989). Interspecific pollen–pistil incongruity in *Salix*. *Canadian Journal of Forest Research*, 19(9), 1161-1168.
- Myint, K. A., Rafii, M. Y., Sheikh-Abdullah, S. A., Din, N. L. A. M., & Latif, M. A. (2012). Determination of the optimum pollen germination medium for different fruit forms of oil palm (*Elaeis guineensis*). *Journal of Animal & Plant Sciences*, 14(1), 1855-1865.
- Novelo, A., & Bonilla-Barbosa, J. (1999). Nymphaeaceae. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. *Instituto de Ecología, AC, fascículo*, 63, 19.

- Novelo, A., & Wiersema, J. H. (2000). Tres nuevos registros para México de plantas acuáticas vasculares. *Acta botánica mexicana*, (51), 53-60.
- Oard, J. H., & Hu, J. (1995). Inheritance and characterization of pollen fertility in photoperiodically sensitive rice mutants. *Euphytica*, 82(1), 17-23.
- O'Kelley, J. C. (1955). External carbohydrates in growth and respiration of pollen tubes *in vitro*. *American Journal of Botany*, 322-327.
- Orban, I., & Bouharmont, J. (1995). Reproductive biology of *Nymphaea capensis* Thunb. var. *zanzibariensis* (Casp.) Verdc. (Nymphaeaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 119(1), 35-43.
- Orban, I., & Bouharmont, J. (1998). Megagametophyte development of *Nymphaea nouchali* Burm. f. (Nymphaeaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 126(4), 339-348.
- Pacini, E., & Dolferus, R. (2019). Pollen developmental arrest: maintaining pollen fertility in a world with a changing climate. *Frontiers in plant science*, 10, 679.
- Patel, E., & Mankad, A. (2015). Sucrose needs for pollen germination of *Impatiens balsamina* L. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering, and Technology*, 4(10), 10242-10244.
- Patel, R. G., & Mankad, A. U. (2014). *In vitro* pollen germination-A review. *International Journal of Science and Research*, 3(5), 304-307.
- Peach, K., & Mazer, S. J. (2019). Heteranthery in *Clarkia*: Pollen performance of dimorphic anthers contradicts expectations. *American journal of botany*, 106(4), 598-603.
- Popov, V. N., Eprintsev, A. T., Fedorin, D. N., & Igamberdiev, A. U. (2010). Succinate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* is regulated by light via phytochrome A. *FEBS letters*, 584(1), 199-202.
- Povilus, R. A., Losada, J. M., & Friedman, W. E. (2015). Floral biology and ovule and seed ontogeny of *Nymphaea thermarum*, a water lily at the brink of extinction with potential as a model system for basal angiosperms. *Annals of botany*, 115(2), 211-226.
- Prasad, P. V. V., Boote, K. J., & Allen Jr, L. H. (2011). Longevity and temperature response of pollen as affected by elevated growth temperature and carbon dioxide in peanut and grain sorghum. *Environmental and Experimental Botany*, 70(1), 51-57.
- Punekar, S. A., & Kumaran, K. P. N. (2010). Pollen morphology and pollination ecology of *Amorphophallus* species from North Western Ghats and Konkan region of India. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 205(5), 326-336.
- Qin, Y., & Yang, Z. (2011, October). Rapid tip growth: insights from pollen tubes. *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 22, No. 8, pp. 816-824). Academic Press.

- Rahmawati, L. U., Purwanti, E., Budiyanto, M. A. K., Zaenab, S., Susetyarini, R. E., & Permana, T. I. (2019). Identification of pollen grains morphology and morphometry in Liliaceae. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 276, No. 1, p. 012031). IOP Publishing.
- Raja, M. M. M., Sethiya, N. K., & Mishra, S. H. (2010). A comprehensive review on *Nymphaea stellata*: A traditionally used bitter. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 1(3), 311.
- Ram, R. A., Rahim, M. A., & Alam, M. S. (2020). Diagnosis and management of nutrient constraints in mango. *Fruit Crops* (pp. 629-650). Elsevier.
- Rao, A. N., & Ong, E. T. (1972). Germination of compound pollen grains. *Grana*, 12(2), 113-120.
- Rathod, V., Behera, T., Munshi, A., Durgesh, K., Jat, G., Krishnan, B., & Sharma, N. (2018). Pollen viability and *in vitro* pollen germination studies in *Momordica* species and their intra and interspecific hybrids. *International Journal of Chemical Studies*, 6(6), 32-40.
- Reinders, A. (2016). Fuel for the road—sugar transport and pollen tube growth. *Journal of experimental botany*, 67(8), 2121.
- Rejón, J. D., Delalande, F., Schaeffer-Reiss, C., Carapito, C., Zienkiewicz, K., de Dios Alché, J., ... & Castro, A. J. (2013). Proteomics profiling reveals novel proteins and functions of the plant stigma exudate. *Journal of experimental botany*, 64(18), 5695-5705.
- Remizowa, M. V., Sokoloff, D. D., Macfarlane, T. D., Yadav, S. R., Prychid, C. J., & Rudall, P. J. (2008). Comparative pollen morphology in the early-divergent angiosperm family Hydatellaceae reveals variation at the infraspecific level. *Grana*, 47(2), 81-100.
- Richards, J. H., & Cao, C. (2012). Germination and early growth of *Nymphaea odorata* at different water depths. *Aquatic botany*, 98(1), 12-19.
- Rodriguez-Riano, T., & Dafni, A. (2000). A new procedure to assess pollen viability. *Sexual Plant Reproduction*, 12(4), 241-244.
- Rojas, E. R., Hotton, S., & Dumais, J. (2011). Chemically mediated mechanical expansion of the pollen tube cell wall. *Biophysical journal*, 101(8), 1844-1853.
- Rottmann, T., Zierer, W., Subert, C., Sauer, N., & Stadler, R. (2016). STP10 encodes a high-affinity monosaccharide transporter and is induced under low-glucose conditions in pollen tubes of *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 67(8), 2387-2399.
- Rounds, C. M., Hepler, P. K., Fuller, S. J., & Winship, L. J. (2010). Oscillatory growth in lily pollen tubes does not require aerobic energy metabolism. *Plant Physiology*, 152(2), 736-746.
- Rounds, C. M., Winship, L. J., & Hepler, P. K. (2011). Pollen tube energetics: respiration, fermentation and the race to the ovule. *AOB Plants*, 2011.

- Russell, S. D. (1992). Double fertilization. *International Review of Cytology* (Vol. 140, pp. 357-388). Academic Press.
- Russell, S. D., & Jones, D. S. (2015). The male germline of angiosperms: repertoire of an inconspicuous but important cell lineage. *Frontier in plant science*, 6, 173.
- Saéñz-Lain, C. S. (2004). Glosario de términos palinológicos. *Lazaroa*, 25, 93-112.
- Samuel, M. A., Chong, Y. T., Haasen, K. E., Aldea-Brydges, M. G., Stone, S. L., & Goring, D. R. (2009). Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in *Brassica* and *Arabidopsis* stigmas intersect at Exo70A1, a putative component of the exocyst complex. *The Plant Cell*, 21(9), 2655-2671.
- Sarker, R. H., Elleman, C. J., & Dickinson, H. G. (1988). Control of pollen hydration in *Brassica* requires continued protein synthesis, and glycosylation is necessary for intraspecific incompatibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(12), 4340-4344.
- Schein, M., Yang, Z., Mitchell-Olds, T., & Schmid, K. J. (2004). Rapid evolution of a pollen-specific oleosin-like gene family from *Arabidopsis thaliana* and closely related species. *Molecular Biology and Evolution*, 21(4), 659-669.
- Schneider, E. L. (1982). Notes on the floral biology of *Nymphaea elegans* (Nymphaeaceae) in Texas. *Aquatic Botany*, 12, 197-200.
- Schneider, E. L., & Chaney, T. (1981). The floral biology of *Nymphaea odorata* (Nymphaeaceae). *The Southwestern Naturalist*, 159-165.
- Schneider, E. L., Tucker, S. C., & Williamson, P. S. (2003). Floral development in the Nymphaeales. *International Journal of Plant Sciences*, 164(S5), S279-S292.
- Selinski, J., & Scheibe, R. (2014). Pollen tube growth: where does the energy come from?. *Plant signaling & behavior*, 9(12), e977200.
- Severns, P. M. (2013). Precautionary hand pollination suggests outbreeding depression between potential seed donor populations for a rare wetland plant. *The Journal of the Torrey Botanical Society*, 140(1), 20-25.
- Shukla, A. K., Vijayaraghavan, M. R., & Chaudhry, B. (1998). *Biology of pollen*. APH Publishing.
- Sivitz, A. B., Reinders, A., & Ward, J. M. (2008). *Arabidopsis* sucrose transporter AtSUC1 is important for pollen germination and sucrose-induced anthocyanin accumulation. *Plant Physiology*, 147(1), 92-100.
- Smits, A. J. M., Van Ruremonde, R., & Van der Velde, G. (1989). Seed dispersal of three nymphaeid macrophytes. *Aquatic Botany*, 35(2), 167-180.
- Soares, T. L., Jesus, O. N. D., Santos-Serejo, J. A. D., & Oliveira, E. J. D. (2013). *In vitro* pollen germination and pollen viability in passion fruit (*Passiflora* spp.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35(4), 1116-1126.
- Soares, T. L., Souza, E. H. D., Costa, M. A. P. D. C., & Santos-Serejo, J. A. D. (2016). Viability of pollen grains of tetraploid banana. *Bragantia*, 75(2), 145-151.

- Songpanich, P., & Hongtrakul, V. (2010). Intersubgeneric cross in *Nymphaea* spp. L. to develop a blue hardy waterlily. *Scientia horticultrae*, 124(4), 475-481.
- Stone, J. L., Thomson, J. D., & Dent-Acosta, S. J. (1995). Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: a review. *American Journal of Botany*, 82(9), 1186-1197.
- Stone, L. M., Seaton, K. A., Kuo, J., & McComb, J. A. (2004). Fast pollen tube growth in *Conospermum* species. *Annals of Botany*, 93(4), 369-378.
- Sun, C. Q., Chen, F. D., Teng, N. J., Yao, Y. M., Shan, X., & Dai, Z. L. (2019). Transcriptomic and proteomic analysis reveals mechanisms of low pollen-pistil compatibility during water lily cross breeding. *BMC plant biology*, 19(1), 1-15.
- Sun, C. Q., Ma, Z. H., Sun, G. S., Dai, Z. L., Teng, N. J., & Pan, Y. P. (2015). Cellular mechanisms of reproductive barriers in some crosses of water lily (*Nymphaea* spp.) cultivars. *HortScience*, 50(1), 30-35.
- Sun, W., Xu, X. H., Lu, X., Xie, L., Bai, B., Zheng, C., ... & Xie, X. Z. (2017). The rice phytochrome genes, PHYA and PHYB, have synergistic effects on anther development and pollen viability. *Scientific reports*, 7(1), 1-12.
- Swanson, R., Edlund, A. F., & Preuss, D. (2004). Species specificity in pollen-pistil interactions. *Annual Review of Genetics*, 38, 793-818.
- Taylor, M. L., Cooper, R. L., Schneider, E. L., & Osborn, J. M. (2015). Pollen structure and development in Nymphaeales: insights into character evolution in an ancient angiosperm lineage. *American journal of botany*, 102(10), 1685-1702.
- Thien, L. B., Bernhardt, P., Devall, M. S., Chen, Z. D., Luo, Y. B., Fan, J. H., ... & Williams, J. H. (2009). Pollination biology of basal angiosperms (ANITA grade). *American Journal of Botany*, 96(1), 166-182.
- Toledo-Hernández, M., Tscharrntke, T., Tjoa, A., Anshary, A., Cyio, B., & Wanger, T. C. (2020). Hand pollination, not pesticides or fertilizers, increases cocoa yields and farmer income. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 304, 107160.
- Tripathi, S., Hoang, Q. T., Han, Y. J., & Kim, J. I. (2019). Regulation of Photomorphogenic Development by Plant Phytochromes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6165.
- Tuinstra, M. R., & Wedel, J. (2000). Estimation of pollen viability in grain sorghum. *Crop science*, 40(4), 968-970.
- Turner, G. W., Gershenzon, J., & Croteau, R. B. (2000). Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. *Plant physiology*, 124(2), 655-664.
- Vallejo-Marín, M., Manson, J. S., Thomson, J. D., & Barrett, S. C. (2009). Division of labour within flowers: heteranthery, a floral strategy to reconcile contrasting pollen fates. *Journal of evolutionary biology*, 22(4), 828-839.
- Volk, G. M. (2011). Collecting pollen for genetic resources conservation. *Collecting plant genetic diversity: technical guidelines*. 1-10.

- Volkova, P. A., & Shipunov, A. B. (2007). Morphological variation of *Nymphaea* (Nymphaeaceae) in European Russia. *Nordic Journal of Botany*, 25(5-6), 329-338.
- Volkova, P. A., Choob, V. V., & Shipunov, A. B. (2007). The flower organ transition in water lily (*Nymphaea alba* sl, Nymphaeaceae) under cross-examination with different morphological approaches. *Belgian Journal of Botany*, 60-72.
- Wang, H. J., Huang, J. C., & Jauh, G. Y. (2010). Pollen germination and tube growth. *Advances in Botanical Research*, 54, 1-52.
- Wiersema, J. H. (1988). Reproductive biology of *Nymphaea* (Nymphaeaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 795-804.
- Williams, J. H., McNeilage, R. T., Lettre, M. T., & Taylor, M. L. (2010). Pollen tube growth and the pollen-tube pathway of *Nymphaea odorata* (Nymphaeaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 162(4), 581-593.
- Wolters-Arts, M., Van Der Weerd, L., Van Aelst, A. C., Van der Weerd, J., Van As, H., & Mariani, C. (2002). Water-conducting properties of lipids during pollen hydration. *Plant, Cell & Environment*, 25(4), 513-519.
- Ylstra, B., Garrido, D., Busscher, J., & Van Tunen, A. J. (1998). Hexose transport in growing petunia pollen tubes and characterization of a pollen-specific, putative monosaccharide transporter. *Plant Physiology*, 118(1), 297-304.
- Yue, X., Gao, X. Q., Wang, F., Dong, Y., Li, X., & Zhang, X. S. (2014). Transcriptional evidence for inferred pattern of pollen tube-stigma metabolic coupling during pollination. *PloS one*, 9(9), e107046.
- Zar, J. H. (1999). *Biostatistical analysis*. Pearson Education India.
- Zepeda-Gómez, C., Cruz-Muciño, E., Burrola-Aguilar, C., & Estrada-Zuñiga, M. E. (2020). Biología floral, visitantes florales y sistema reproductivo de *Nymphaea gracilis* Zucc. (Nymphaeaceae). *Botanical Sciences*, 98(4), 499-515.
- Zervoudakis, G., Salahas, G., Kaspiris, G., & Konstantopoulou, E. (2012). Influence of light intensity on growth and physiological characteristics of common sage (*Salvia officinalis* L.). *Brazilian archives of biology and technology*, 55(1), 89-95.
- Zhang, L., Chen, F., Zhang, X., Li, Z., Zhao, Y., Lohaus, R., ... & Song, A. (2019). The water lily genome and the early evolution of flowering plants. *Nature*, 1-6.
- Zhu, L., Zhang, Y., Kang, E., Xu, Q., Wang, M., Rui, Y., ... & Fu, Y. (2013). MAP18 regulates the direction of pollen tube growth in *Arabidopsis* by modulating F-actin organization. *The Plant Cell*, 25(3), 851-867.

