

**RECEPTIVIDAD DEL ESTIGMA Y CRECIMIENTO DEL TUBO  
POLÍNICO EN EL ENDEMISMO *SILENE ACUTIFOLIA*  
LINK EX ROHRB.**

**María Luisa Buide & Javier Guitián**

Departamento de Biología Vegetal, Laboratorio de Botánica, Facultad de Farmacia,  
Universidad de Santiago de Compostela, Campus Sur, E-15706,  
Santiago de Compostela, España.

Buide, M. L. & Guitián, J. (2000). Receptividad del estigma y crecimiento del tubo polínico en el endemismo *Silene acutifolia* Link ex Rohrb. *Portugaliae Acta Biol.* **19**: 97-106.

Las flores de *Silene acutifolia* Link ex Rohrb. muestran una separación entre las fases masculina y femenina, liberando primero el polen, a medida que los estilos y estigmas se van elongando y las papilas estigmáticas se van desarrollando. En este estudio nos centramos en comprobar si existe o no verdadera protandria en esta especie. Para ello analizamos la receptividad del estigma, la germinabilidad del polen y el grado de autogamia espontánea y autogamia inducida. Se comprobó que en *S. acutifolia* el nº de granos de polen adheridos al estilo y estigma, nº de granos de polen germinados y nº de tubos polínicos en el estilo aumenta con la longitud del estilo. Por otra parte, la germinabilidad del polen se reduce rápidamente con el tiempo. Los resultados de los tratamientos de autogamia inducida nos muestran que en presencia de los polinizadores hay una reducción tanto en el nº de semillas/fruto como en el % semillas en relación a óvulos ("seed-set"), aunque sólo en el último caso las diferencias frente al control son significativas. Sin embargo, en ausencia de polinizadores sí que se observa una clara reducción en ambos casos.

Palabras clave: *Silene*, endemismo, protandria, autogamia.

Buide, M. L. & Guitián, J. (2000). Stigma receptivity and growth of the pollen tube in the endemism *Silene acutifolia* Link ex Rohrb. *Portugaliae Acta Biol.* **19**: 97-106.

The anthers of the hermaphrodite flowers of *Silene acutifolia* Link ex Rohrb. begin to release pollen gradually, while the style and stigma are still growing and the stigma

papillae are not fully developed. These facts suggest that *Silene acutifolia* shows separation between male and female functions. In our study we test if this endemic *Silene* is a “strictly” proteandrous species. To test this hypothesis we used three different methods. Thus, we measured (1) the receptivity of the stigma, (2) germinability of the pollen and (3) the degree of “spontaneous” and “induced” autogamy. Our study established that the number of pollen grains adhered to the stigma and the style, the number of germinated pollen grains and the number of pollen tubes are positively correlated with the length of the style. On the other hand, the germinability of the pollen quickly brake down with time. The results of the induced autogamy experiments indicated that in presence of pollinators there was a reduction in both the number seeds per fruit and in the seeds/ovules rate (“seed-set”), although only in the last case the differences were significant. Nevertheless, removing pollinators has a significant reduction in both measures.

Key words: *Silene*, endemism, protandry, autogamy

## INTRODUCCIÓN

*Silene acutifolia* Link ex Rohrb. es un endemismo de Galicia y N y C de Portugal. Recientemente esta especie ha sido incluida en un listado de flora rara y amenazada de Galicia, que siguiendo los criterios de la IUCN (1981) la incluyen como rara y la proponen como planta de interés a proteger (ORTIZ, RODRÍGUEZ-OUBIÑA & PULGAR, 1998). Por estos motivos, el conocimiento de sus mecanismos reproductivos nos pareció de gran interés para su conservación. En esta comunicación nos centramos en comprobar si existe o no dicogamia. La dicogamia se define como la separación de la dehiscencia de la antera y la receptividad del estigma dentro de una flor en el tiempo, de forma que la autogamia no pueda ocurrir (RICHARDS, 1997). De los dos tipos de dicogamia, la protoginia ha sido definida como más efectiva para minimizar la autofertilización, porque asegura un período en el cual no hay polen disponible para permitir la autofertilización dentro de una flor (en casos de dicogamia intrafloral) o dentro de una planta (en especies monoicas). En contraste, el polen puede a menudo permanecer en las anteras de flores protándricas cuando los estigmas comienzan a ser receptivos, permitiendo autopolinizaciones al comienzo de la fase femenina (BERTIN, 1993).

El objetivo de este estudio es comprobar en qué grado existe verdadera protandria. Para ello se vio si las diferentes longitudes del estilo permiten recibir granos de polen y si la capacidad de germinación del grano de polen se mantiene. Por último, mediante tratamientos polínicos, se comprobó el grado de autogamia.

## DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA

*S. acutifolia* es una planta perenne. Los tallos fértiles son erectos, ramificados, con una roseta de hojas en la base. Las flores se disponen en inflorescencias de tipo dicasio (CASTROVIEJO *et. al.*, 1990).

Las flores de *S. acutifolia* tienen 10 estambres que se disponen de manera introrsa. Cuando la flor acaba de abrir, uno o dos de los estambres se elongan y se abren las anteras por dehiscencia longitudinal. En ese momento los estilos son de pequeño tamaño. Poco a poco los estilos van creciendo, a medida que el resto de los estambres maduran y liberan el polen. Cuando ya se ha producido la senescencia de las anteras los estilos alcanzan su mayor tamaño y con ayuda de una lupa es posible observar las papilas desarrolladas. El estilo presenta longitudinalmente una hilera de papilas a las que también se adhieren los granos de polen cuando están desarrolladas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Receptividad del estigma

Existen diferentes métodos para determinar en qué momento el estigma empieza a ser receptivo (KEARNS & INOUE, 1993). Debido a la liberación sucesiva del polen de las distintas anteras y al progresivo crecimiento del estilo en las flores de *Silene acutifolia*, lo más interesante para conocer si existe o no verdadera protandria nos pareció medir diferentes longitudes del estilo y ver si en ese momento se adhieren o no granos de polen y si estos dan lugar a tubos polínicos. Se utilizó la técnica de epifluorescencia descrita en KEARNS & INOUE (1993) para contar los tubos polínicos, después de medir con la lupa binocular las diferentes longitudes del estilo y estigma.

Se embolsaron flores antes de la antesis, se emascularon y se polinizaron suplementariamente a diferentes longitudes del estilo. Una vez polinizadas artificialmente se embolsaron nuevamente y se recogieron 24 horas más tarde. En pruebas anteriores se hizo lo mismo, recogiendo las flores 5 horas después, y se observó que no era tiempo suficiente para que los tubos polínicos se desarrollaran en el estilo, a diferencia de lo que sucede *in vitro*, en las placas Petri. Las flores recogidas se almacenaron en F.A.A (formaldehído 37-40%, etanol 95%, ácido acético glacial y H<sub>2</sub>O destilada). Posteriormente se midió la longitud de los estilos al microscopio óptico y se almacenaron en etanol al 70%.

Para la observación de los tubos polínicos al microscopio de epifluorescencia los tejidos se ablandaron previamente a la tinción, con NaOH 8N. Después se enjuagan en agua del grifo para eliminar el NaOH. Para la tinción se utiliza azul de anilina 0,1% decolorado previamente con K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

Los tejidos se observaron al microscopio de epifluorescencia, iluminando con luz ultravioleta. Se contaron el número de granos de polen adheridos, el número de granos de polen germinados y el número de tubos polínicos bien desarrollados (aproximadamente a la mitad del estilo). Como se dijo anteriormente, el estilo

presenta longitudinalmente papilas a las que se adhieren los granos de polen, los cuales también se contabilizaron.

### **Germinabilidad de los granos de polen**

Previamente se hicieron pruebas con diferentes concentraciones del medio de cultivo, dividiendo cada placa petri en 6 partes iguales y sembrando polen de diferentes plantas para cada parte de la misma placa y la misma planta para los diferentes medios de cultivo y concentraciones. Para las pruebas previas se utilizaron medios de cultivo con agar y diferentes concentraciones de sacarosa (0%, 10%, 30% y 50%) y medios de cultivo con agar y diferentes concentraciones de sacarosa y nutrientes (0%, 10%, 30% y 50%). Los nutrientes utilizados fueron ácido bórico, nitrato potásico, nitrato cálcico y sulfato magnésico. Pasadas unas horas se observaron a la lupa, y se vio que los mayores porcentajes de germinación correspondían a los siguientes medios: 30% sacarosa > 10% sacarosa + nutrientes > 30% sacarosa + nutrientes > 10% sacarosa. En los medios con 50% de sacarosa, con y sin nutrientes, no se observó germinación.

Se embolsaron 5 capullos cerrados de 5 individuos diferentes y se recogió polen al abrir la flor, 24 horas más tarde y 48 horas más tarde. El polen se recogió con una punta de micropipeta cerrada y se sembró en las placas con 30% de sacarosa en agar como medio de cultivo y divididas en partes. El primer día y a las 24 horas los porcentajes son aproximados, ya que resulta muy difícil contar exactamente el número de tubos polínicos debido a la longitud y a que algunos granos de polen desarrollan más de un tubo polínico.

### **Autogamia espontánea y autogamia inducida**

Para embolsar se utilizaron bolsas de tela de gasa de color verde, con un diámetro de rejilla que no deja pasar ningún tipo de animal. Se embolsaron las flores de forma individual, cerrando las bolsas sobre el pedúnculo con hilo de cobre. Se realizó un control paralelo marcando en el mismo momento otro capullo dentro del mismo individuo y en la misma posición de la inflorescencia. Ese control se marcó en diferente tallo floral para evitar posibles efectos de las manipulaciones sobre las otras flores de la misma inflorescencia. En total, se realizaron los siguientes tratamientos, con sus correspondientes controles:

- a) Autogamia espontánea: embolsado, no emasculado, no polinizado
- b) Autogamia inducida: embolsado, no emasculado, polinización con polen de la propia flor

En ambos casos para el control se marcó otro capullo el cual no se manipuló

### **TRATAMIENTOS ESTADÍSTICOS**

Para ver el efecto de la longitud del estilo y estigma sobre el nº de granos de polen que se adhieren, los que germinan y el nº de tubos polínicos en el estilo se aplicaron regresiones simples. Mediante test de la t para muestras relacionadas se comprobaron las diferencias entre autogamia espontánea y su control y entre

autogamia inducida y su control. Los resultados obtenidos de la autogamia espontánea y autogamia inducida se compararon con un ANOVA de una vía (ZAR, 1996). Se realizaron las transformaciones apropiadas cuando los datos no se ajustan a normalidad y homogeneidad de varianzas (test de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov para normalidad y las pruebas de Levene para comprobar la homogeneidad de varianzas). Para todos los tratamientos estadísticos se utilizó el paquete estadístico SPSS 8.0 para Windows.

## RESULTADOS

### Receptividad del estigma

En la Tabla 1 se muestran los resultados de las regresiones, utilizando como variable independiente la longitud de los estilos y como variables dependientes los granos de polen adheridos. En los tres casos se observan valores significativos ( $p < 0,05$ ).

Tabla 1.- Resultados de las regresiones entre cada una de las variables dependientes analizadas y la longitud del estilo-estigma

Variable dependiente	R <sup>2</sup>	$\beta$	$\alpha$	p
Granos de polen adheridos	0,435	-272,932	47,914	0,010
Granos de polen germinados	0,421	-48,478	8,013	0,016
Tubos polínicos en el estilo	0,252	-45,109	7,746	0,020

En la Figura 1a se muestra que por debajo de 6,20 mm de longitud del estilo no se observan granos de polen adheridos al estilo y estigma. Cuando las longitudes del estilo son pequeñas las papilas no se encuentran bien desarrolladas, impidiendo que los granos de polen se adhieran.

En la Figura 1b se ve que por debajo de 8,43 mm de longitud del estilo no se encuentran granos de polen germinados, mientras que por debajo de 9 mm (Figura 1c) no se observan tubos polínicos bien desarrollados en el estilo.

### Germinabilidad del polen

Como vemos en la Figura 2 en las placas de cultivo hay una clara reducción de la germinación con el tiempo, siendo muy elevada en las flores recién embolsadas y con valores del 10% de germinación a las 48 horas.

### Autogamia espontánea e inducida

El número de semillas por fruto producidas por autogamia espontánea es muy inferior al producido en los controles de las mismas plantas (Tabla 2,  $p < 0,001$ ). También es menor en el caso de la autogamia inducida, si bien los valores no son significativamente diferentes del control (Figura 3a). Se observa que las

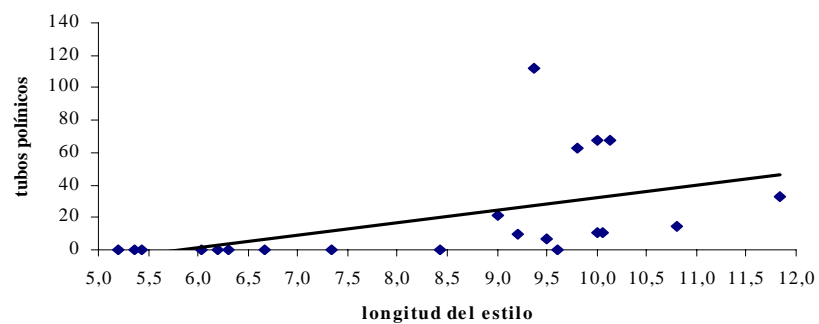
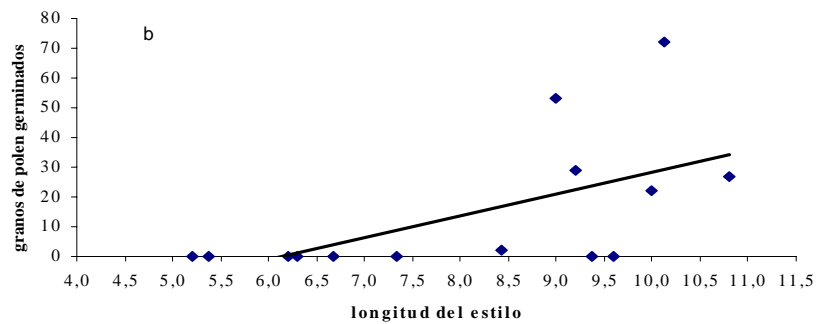
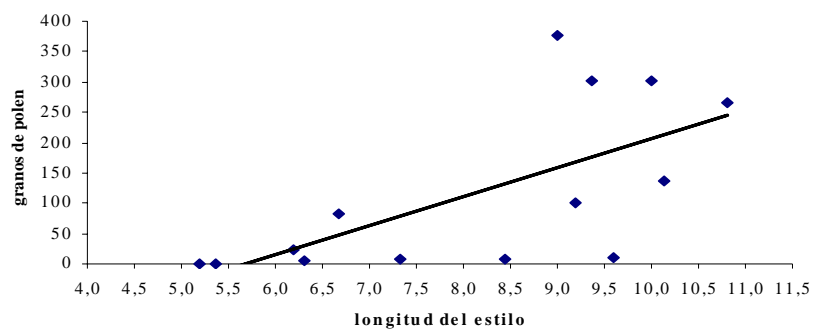


Fig. 1. Variación en el número de granos de polen en estilo y estigma (a), nº de granos de polen germinados (b) y tubos polínicos en el estilo (c) con la longitud del estilo y el estigma.

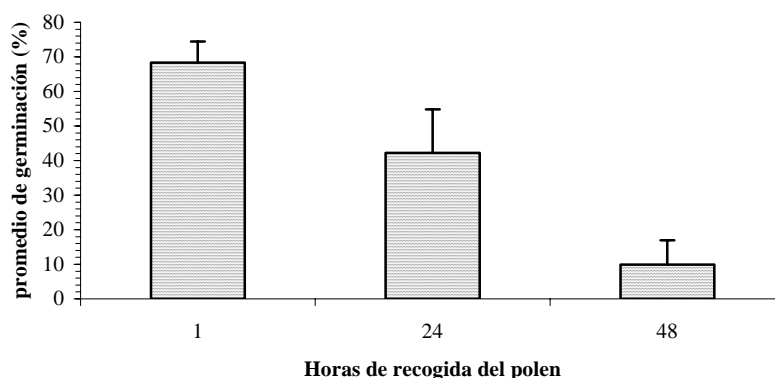


Fig. 2. Granos de polen germinados en placas de cultivo, recogidos a diferentes horas desde la apertura de la flor.

variaciones entre frutos son muy elevadas, con variaciones que van entre las 2 y las 56 semillas/fruto, en los tratamientos de autogamia inducida, a diferencia de sus controles.

El porcentaje de semillas producidas en relación a óvulos (“seed-set”) es inferior a sus controles (Figura 3b), y estas diferencias son significativas tanto en los tratamientos de autogamia espontánea ( $p < 0,001$ ) como en los de autogamia inducida ( $p < 0,05$ ) (Tabla 2).

Tabla 2.- Comparación entre cada uno de los tratamientos y sus controles

	$\bar{X} \pm \sigma(n)$	<i>t</i>	<i>p</i>
<b>Nºsemillas/fruto</b>			
<i>Autogamia espontánea</i>			
Tratamiento	16,80±13,51 (15)		
Control	43,20±9,95 (15)	-6,40	<0,001
<i>Autogamia inducida</i>			
Tratamiento	33,82±18,13 (17)		
Control	45,16±9,95 (19)	-1,71	n.s
<b>% semillas/óvulos</b>			
<i>Autogamia espontánea</i>			
Tratamiento	32,83±27,32 (15)		
Control	88,45±15,46 (18)	-6,79	<0,001
<i>Autogamia inducida</i>			
Tratamiento	66,52±34,76 (17)		
Control	89,16±17,02 (19)	-2,64	<0,05

De los resultados del ANOVA (Tabla 3) se obtienen diferencias significativas entre el número de semillas por fruto entre los tratamientos de autogamia espontánea con el de autogamia inducida ( $p < 0,01$ ). También hay diferencias significativas cuando la variable estudiada es el porcentaje de semillas en relación a óvulos.

Tabla 3.- ANOVA de una vía comparando el nº de semillas/fruto o el % de semillas en relación a óvulos para los tratamientos de autogamia espontánea frente a autogamia inducida.

ANOVA	F	p
Variables:		
Nº semillas/fruto	8,863	<0,01
% semillas/óvulos	9,372	<0,01

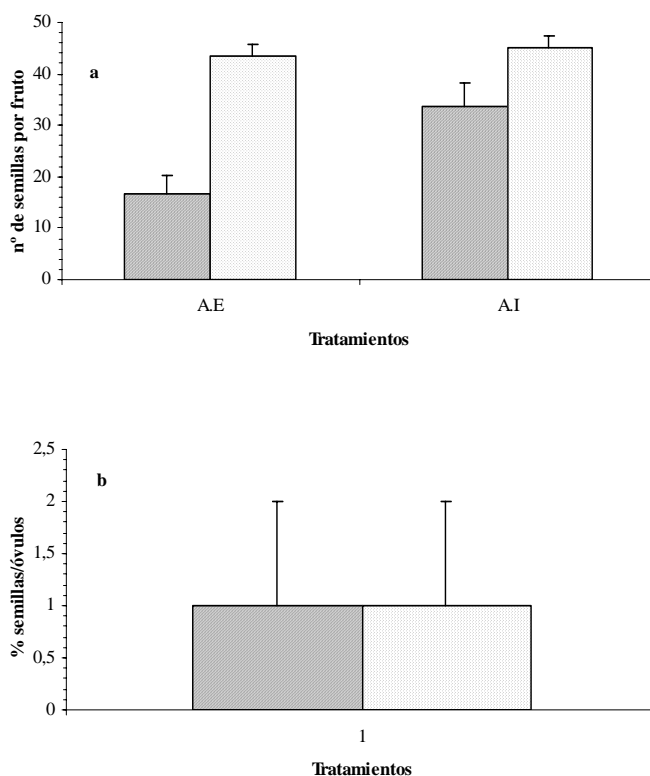


Fig. 3. Nº medio y error estándar de semillas por fruto (a) y semillas en relación a óvulos (b) para los tratamientos de autogamia espontánea (A.E.) y autogamia inducida (A.I.). Las rayas transversales son los tratamientos y la superficie punteada los controles.



## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La germinabilidad del polen se reduce rápidamente, pero el hecho de que los 10 estambres vayan elongándose y madurando secuencialmente hace que aumente la disponibilidad de polen. Por otra parte, la disposición introrsa de los estambres también facilita que el polen sea depositado en el estigma de la propia flor.

La extensión en el tiempo de la fase de presentación del polen ha sido explicada en otras especies como un mecanismo de selección sexual (LLOYD & YATES, 1982). Según estos autores, el éxito en la donación de polen se incrementa extendiendo temporalmente la presentación de polen, de forma que los visitantes puedan recoger polen en más ocasiones y de ese modo incrementan el número de óvulos fertilizados.

En *S. acutifolia* hay una separación temporal entre las fases masculina y femenina porque además de esta rápida reducción de la capacidad germinativa del grano de polen, estos no se adhieren hasta que los estilos no alcanzan una determinada longitud. Sin embargo, como se puede deducir de los experimentos de autogamia, la separación entre la fase masculina y la femenina no es total.

La dicogamia ha sido explicada clásicamente como un mecanismo favorecido por la selección para reducir la autofertilización (FAEGRI & VAN DER PIJL, 1979). Otros autores están en desacuerdo con esta hipótesis. CURRAH & OCKENDON (1978) encuentran protandria dentro de las flores de *Allium cepa* y altas tasas de polinización cruzada. Sin embargo ellos concluyen que la protandria no es aquí un mecanismo efectivo para evitar la autofertilización, ya que existe suficiente polen disponible dentro de la planta, y achacan los altos niveles de polinización cruzada al comportamiento de los polinizadores. BERTIN (1993) también muestra resultados que no concuerdan con la hipótesis de una reducción de la autofertilización y discute algunas alternativas para explicar la dicogamia, una de las cuales sería reducir la interferencia entre las funciones masculina y femenina. LLOYD & YATES (1982) habían propuesto anteriormente que el comportamiento protándrico de *Wahlenbergia albomarginata* puede haber evolucionado a través de la selección para separar la presentación de polen y estigmas en una flor. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que en *Silene acutifolia* la protandria no es una barrera para la autofertilización. En el caso de la autogamia inducida, en presencia de los polinizadores hay una reducción tanto en el número de semillas/fruto como en el % de semillas en relación a óvulos, pero sólo en el último caso las diferencias frente al control son significativas. Sin embargo, en ausencia de polinizadores sí que se observa una clara reducción en ambos casos.

## AGRADECIMIENTOS

M<sup>a</sup> Luisa Buide disfrutó durante parte de la realización de este estudio de una beca predoctoral de la Xunta de Galicia. Ramón Anadón facilitó la utilización del microscopio de epifluorescencia.

## BIBLIOGRAFÍA

- BERTIN, R. I. 1993. Incidence of monoecy and dichogamy in relation to self-fertilization in angiosperms. *Amer. J. Bot.* 80(5): 557-560.
- CASTROVIEJO, S. *et al.* (eds.). 1990. *Flora Ibérica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Vol. II. Real Jardín Botánico, C.S.I.C, Madrid.
- CURRAH, L. & OCKENDON, D. J. 1978. Protandry and the sequence of flower opening in the onion (*Allium cepa* L.). *New Phytol.* 81: 419-428.
- FAEGRI, K. & VAN DER PIJL, L. 1979. *The Principles of Pollination Ecology*. Pergamon Press, Oxford, U.K.
- KEARNS, C. A. & INOUE, D. W. 1993. *Techniques for Pollination Biologists*. University Press of Colorado, Niwot, Colorado.
- LLOYD, D. G. & YATES, J. M. 1982. Intrasexual selection and the segregation of pollen and stigmas in hermaphrodite plants, exemplified by *Wahlenbergia albomarginata* (Campanulaceae). *Evolution*. 36(5): 903-913.
- ORTIZ, S.; RODRÍGUEZ-OUBIÑA, J., & PULGAR, I. 1998. Unha primeira aproximación ao listado da flora rara e amenazada de Galicia (NO da Península Ibérica). *Nova Acta Científica Compostelana* (Biología). 8: 95-101.
- RICHARDS, A. J. 1997. *Plant Breeding Systems*. Chapman & Hall, London.
- ZAR, J. H. 1996. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall International Editions, New Jersey.