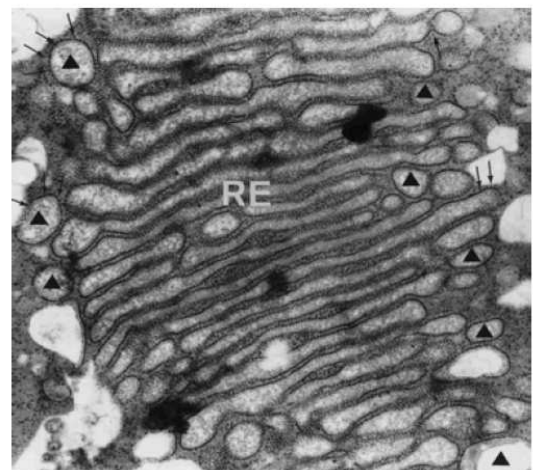
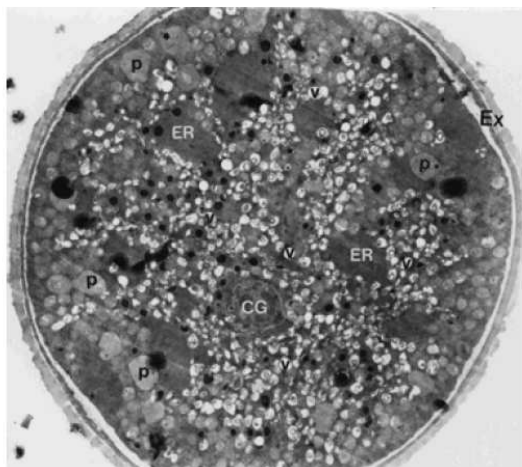
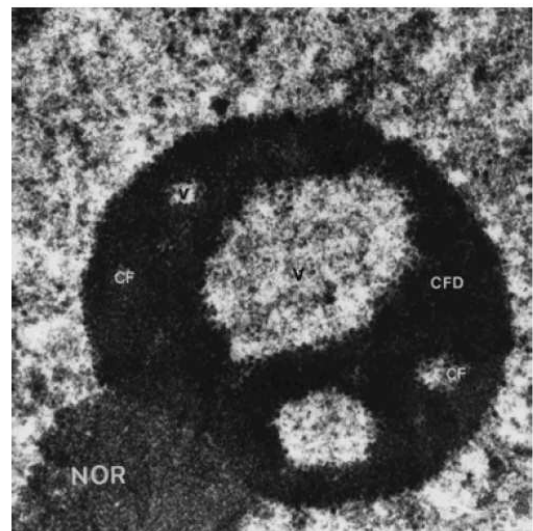
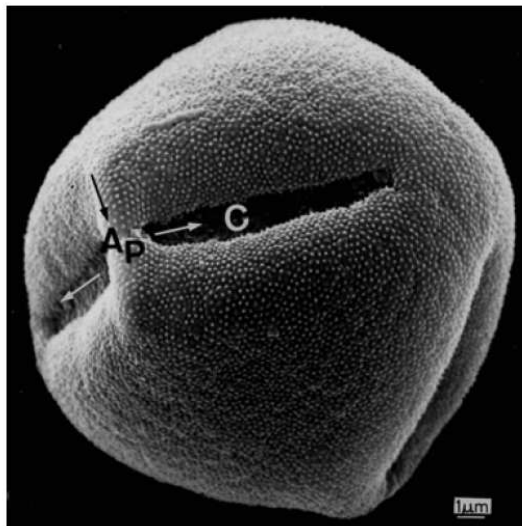


# ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL Y CITOQUÍMICO DEL DESARROLLO Y MADURACIÓN DE LA MICROSPORA DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* M.)

Tesis doctoral

Universidad de Granada  
Facultad de Ciencias  
Dpto. de Biología Vegetal



M<sup>a</sup> Begoña Carretero Gómez  
Granada, 1993

Universidad de Granada

Facultad de Ciencias



Departamento de Biología Vegetal

Tesis doctoral

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL Y  
CITOQUÍMICO DEL  
DESARROLLO Y MADURACIÓN DE LA  
MICROSPORA DE  
TOMATE (*Lycopersicum esculentum* M.)

M<sup>a</sup> Begoña Carretero Gómez  
Granada, 1993

ISBN 84-609-14499-2

Depósito Legal GR-1122-2004

La Dra. M<sup>a</sup> ISABEL RODRÍGUEZ GARCÍA Investigador Científico del  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

**CERTIFICA:**

Que la Tesis Doctoral titulada **Desarrollo y Maduración de la Microspora del Tomate (*Lycopersicum esculentum* M.)** realizado por la Lda. M<sup>a</sup> Begoña Carretero Gómez en la Estación Experimental del Zaidín (C S I C ) bajo su dirección reúne todas las condiciones para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Granada, Enero 1993



Fdo. Dra. M<sup>a</sup> Isabel Rodríguez García

Investigador Científico del C.S.I.C



UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL

18071 GRANADA  
(ESPAÑA)

CAMPUS DE FUENTENUEVA

Facultad de Ciencias

Teléf. (958) 24 32 54

La Dra. **ANA TERESA ROMERO GARCÍA** Profesor Titular del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Granada,

**RATIFICA:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada **Desarrollo y Maduración de la Microsporogénesis del Tomate (*Lycopersicum esculentum* M.)** del doctorando M<sup>a</sup> Begoña Carretero Gómez.

Granada, Enero 1993

Fdo: Dra. Ana Teresa Romero García

Profesor Titular de la Universidad de Granada.

Esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizada en el Laboratorio de Citología Vegetal (Unidad Estructural de Bioquímica Vegetal) de la Estación Experimental del Zaidín de Granada (C S I C ) gracias a la concesión de una beca del Subprograma General de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia. Este trabajo ha sido financiado por la D G I C Y T Proyecto N<sup>o</sup> PB87-0332-CO2-02

"Una experiencia nunca es un fracaso, pues viene a demostrar algo"

(Edison)

## AGRADECIMIENTOS:

Lo primero que quiero reflejar es mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas que tanto me han animado y ayudado en la realización de este trabajo

A la Dra. M<sup>a</sup> Isabel Rodríguez García por el apoyo que me ha dado y por permitirme disponer de todos los medios necesarios para la realización del trabajo. Por transmitirme sus conocimientos y su experiencia. Gracias por estar siempre a mi lado

A la Dra. Ana Teresa Romero García por ser ella la que me ayudó a iniciar mi camino en este mundo tan bonito de la investigación. Gracias por ser mi tutora.

A las demás personas que forman el grupo de Citología Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín. Al Dr. Juan de Dios Alché por ayudarme en mis problemas con la fotografía. A la Dra. M<sup>a</sup> Carmen Fernández por aclarar todas mis dudas. A Matilde Garrido por la gran ayuda prestada en mi trabajo en el laboratorio, tener siempre el microscopio a punto y ser una buena amiga. A Dolores Garrido por estar siempre dispuesta a echar una mano. A la Dra. Adela Olmedilla por ayudarme a conocer mejor esa parte tan fundamental para la célula que es el núcleo. A la Dra. Anna Majewska Sawka por su gran calidad científica y humana, por su sinceridad

A la Dra. Risueño del Centro de Investigaciones Biológicas Madrid por sus consejos y por permitirme realizar experiencias en su laboratorio, a la Dra. Pilar Sánchez siempre dispuesta a ayudar

A la Dra. Rosario Hermoso por solucionar todos los problemas que he tenido en mis experiencias de inmunocitoquímica.

A la Dra. Luisa Sandalio por darme consejos muy útiles con respecto a la localización de microcuerpos.

A Manuel Martínez Martín por el trabajo de rotulación

A Dr. Juan Pedro Donaire por permitirme utilizar su laboratorio para la realización de toda la parte de cultivo "in vitro"

Al Prof. Heberle-Bors (Univ. de Viena) por haberme aceptado en su grupo permitiéndome aumentar mis conocimientos acerca de la androgénesis

También quiero agradecer mi familia, en especial a mis padres toda la ayuda y ánimos que me han dado durante mis estudios y durante la realización de este trabajo. A Juan Antonio por siempre estar dispuesto a solucionar mis problemas con el ordenador y por soportar los momentos menos agradables de esta tesis

A todos muchas gracias.

A Juan Antonio



**ÍNDICE**

Resumen .....	1
Capítulo 1: Introducción .....	3
1.1- Antecedentes históricos .....	5
1.2- Importancia del estudio del polen .....	9
1.3- Reproducción sexual .....	13
1.4- El microsporangio .....	15
1.5- Microsporogénesis .....	17
1.6- Formación del grano de polen .....	19
1.7- Formación de la pared del grano de polen .....	22
1.8- El tomate como material de estudio .....	27
1.8.1- Orígenes .....	28
1.8.2- Usos y propiedades .....	29
1.8.3- ¿Por que el tomate como material de estudio? ...	30
Capítulo 2: Justificación y Objetivos	
2.1- Justificación .....	33
2.2- Objetivos .....	35
Capítulo 3: Material y Métodos	
3.1- Material .....	37
3.2- Métodos .....	41
3.2.1- Cultivo <i>in vitro</i> de anteras de tomate .....	41
3.2.2- Procesamiento de muestras para microscopía electrónica de transmisión .....	47
3.2.3- Tallado de la pieza, corte y recogida de secciones. Tinción. ....	52
3.2.4- Estudio de cortes al microscopio óptico y microscopio electrónico .....	53
3.2.5- Determinación de polisacáridos .....	54

## ÍNDICE

---

3.2.5.1- Test ácido periódico-tiosemicarba- cida proteinato de plata (Thiery) . . . . .	54
3.2.5.2- Técnica del ácido fosfotúngstico . . . . .	56
3.2.6- Tinción regresiva del EDTA (Etilen-Diami- no-Tetracético) . . . . .	56
3.2.7- Localización de la actividad enzimática de peroxidasa y catalasa . . . . .	58
3.2.7.1- Tinción citoquímica con 3,3'-Dia- mino minobenzidina (DAB) . . . . .	58
3.2.7.2.- Técnica del cerio . . . . .	60
3.2.7.3- Inmunolocalización de peroxidasas . . . . .	62
3.2.8- Estudio de elementos inorgánicos en la pa- red del polen . . . . .	64
3.2.8.1- Técnica del piroantimoniato potásico . . . . .	64
3.2.8.2- Preparación de muestras para mi- croanálisis de rayos X al MEB . . . . .	65
3.2.9- Paso de material a través de las paredes celulares . . . . .	67
3.2.9.1- Técnica del nitrato de lantano co- mo elemento traza . . . . .	67
3.2.9.2- Incorporación del lantano al me- dio de cultivo de granos de polen. . . . .	68
Capítulo 4: Resultados	
4.1- Cultivo "in vitro" de anteras . . . . .	71
4.2- Estudio de la organización celular del grano de polen durante su formación . . . . .	73
4.2.1- Caracteres generales . . . . .	73
4.2.2- Fases en las que se divide . . . . .	74
4.2.2.1- Tetradas . . . . .	75
4.2.2.2- Microspora joven recién liberada . . . . .	79

4.2.2.3- Microspora media . . . . .	81
4.2.2.4- Microspora vacuolada . . . . .	84
4.2.2.5- Grano bicelular joven . . . . .	87
4.2.2.6- Grano bicelular medio . . . . .	90
4.2.2.7- Grano bicelular maduro . . . . .	95
4.3- Paso de material a través de la pared del polen . . . . .	98
4.4- Microcuerpos: actividad catalásica, peroxidásica y oxidasa . . . . .	100
4.1- Citoquímica . . . . .	101
4.1.1- Técnica de la 3,3'-Diaminobencidina (DAB) . . . . .	101
4.1.2- Técnica del cerio para detectar di- ferentes oxidasas . . . . .	102
4.4.2- Inmunocitoquímica: antiperoxidasa . . . . .	103
4.5- Láminas . . . . .	105
 Capítulo 5: Discusión	
5.1- Cultivo "in vitro" de anteras . . . . .	183
5.2- Cambios sufridos por el grano de polen durante su desarrollo y maduración . . . . .	187
5.2.1- Citoplasma . . . . .	187
5.2.2- Núcleo . . . . .	194
5.3- Ontogenia y desarrollo de la pared del grano . . . . .	203
5.4- Microcuerpos: actividad catalasa, peroxidasa y oxidasa . . . . .	213
 Capítulo 6: Conclusiones . . . . .	217
 Bibliografía . . . . .	219



## *Resumen*

Esta memoria presenta los resultados del estudio evolutivo del grano de polen de tomate (*Lycopersicum esculentum*, M.), desde la microspora recién formada hasta la consecución del gametofito masculino o grano de polen propiamente dicho, constituido por las células generativa y vegetativa. Se contemplan las transformaciones metabólicas que experimenta el citoplasma durante la maduración del grano así como el posible papel de microcuerpos o glioxisomas en los estadios de más elevado metabolismo celular.

Otro aspecto a destacar son las características y propiedades de la pared del polen. Es bien conocido que se trata de una pared perfectamente estructurada, muy resistente a agentes físicos y químicos y con un elevado grado de impermeabilidad. Sin embargo el grano de polen obtiene nutrientes procedentes del lóculo y del tapetum, por lo que resulta de interés conocer a través de que vías el grano de polen mantiene comunicación con el medio que le rodea y si realmente hay paso de material desde el exterior hacia el interior del grano.

Como objeto de estudio se ha elegido el tomate, por su importancia agrícola y la falta de estudios a nivel celular en esta especie, además de ser uno de los materiales elegidos en nuestro grupo de trabajo para poner a punto el cultivo de anteras, con el objetivo de inducir la androgénesis.

Este trabajo a nivel ultraestructural, se basa en técnicas de microscopía electrónica, citoquímicas e inmunocitoquímicas e incluye una discusión acerca de las transformaciones que experimenta el polen durante su desarrollo.

Este trabajo se encuadra dentro del Proyecto de Investigación subvencionado por la DGICYT N° PB87-00332-CO2 (1988-1992).

## ***Abstract***

This work presents the results of the evolutive study of the pollen grain, from the young microspore (recently formed) to the male gametophyte or pollen grain, which is constituted by the vegetative and generative cells. It also includes the metabolic transformation of the cytoplasm during the pollen grain maturation and the possible role of microbodies or glioxisomes at the highest stages of the cellular metabolism.

Other different aspects of this study are the morphological characteristics and properties of the pollen grain wall. It is known that the pollen grain wall is perfectly structured, with high resistance to physical and chemical agents, and impermeable. However, it is interesting to find out which are the pollen grain routes where the communication with exterior of the pollen is established. It is also important to determine if a flux of material from outside to inside the grain really exists.

We have chosen the tomato as a material of study because it is an important species in agriculture and the researches on cellular level are scarce, and also because it is one of the materials chosen to make anther and pollen cultures to induce androgenesis.

This ultrastructural work makes use of electron microscopy, cytochemical and immunocytochemical techniques, and includes a discussion about pollen transformations during its development.

This work has been supported by D.G.I.C.Y.T. project nº PB87-00332-CO2 (1988-1992).

# *Capítulo 1: Introducción*

La reproducción sexual tiene un papel trascendental en el ciclo de vida de las plantas. Si las diferentes partes de este ciclo sexual pudieran llegar a ser controladas y manipuladas, es evidente que se obtendría un avance espectacular en la mejora de plantas y su producción. Actualmente, cuando la ingeniería genética y otros métodos de manipulación genética se encuentran en su máximo apogeo, nos parece conveniente no olvidar los métodos convencionales mediante los que la variabilidad genética ha sido introducida en las plantas, así como los mecanismos que intervienen en ello. El potencial del sistema sexual sólo podrá ser rentable a medida que se invierta tiempo y esfuerzo en profundizar y conocer las bases celulares, moleculares, genéticas y fisiológicas de estos procesos.

La función principal de la generación gametofítica en plantas superiores es transmitir la información genética a la próxima generación esporofítica. En el

## **RESUMEN**

---

proceso de fertilización el gametofito masculino juega un papel más activo que el gametofito femenino (Barnabás y Kovács 1988). El gametofito masculino debido a su función es una estructura muy especializada independiente del esporofito (al contrario de lo que ocurre en el gametofito femenino), que sufre una intensa competición entre gametos durante el proceso de polinización, germinación y doble fertilización (Pfahler 1978). El polen es el vehículo natural para la transferencia de caracteres genéticos por lo que en programas convencionales de mejora siempre jugará un papel central en el desarrollo de nuevas variedades de cosechas, tanto en el presente como en el futuro. Por ello el polen y el conocimiento de su biología son fundamentales para los procesos de mejora vegetal.

Los procesos de reproducción sexual comprenden: meiosis, diferenciación de gametos, transporte de gametos masculinos hacia los femeninos, reconocimiento (reacciones de compatibilidad-incompatibilidad) y finalmente la fusión para dar lugar a un cigoto. La responsabilidad de que la fecundación llegue a buen término es tanto de la parte masculina como de la femenina. Sin embargo, desde tiempos históricos, el estudio de la parte masculina ha sido el principal centro de atención, siendo mucho más numerosas las publicaciones relacionadas con el polen y su desarrollo, que con el óvulo. Las razones que han llevado a este desequilibrio pueden ser varias:

a- Una más fácil accesibilidad al polen que a los óvulos y por tanto una mayor facilidad de manipulación del material. Las anteras son órganos externos que normalmente se encuentran en el ápice de un filamento constituyendo unidades independientes y que fácilmente pueden ser extirpadas sin causar grandes daños. En cambio el ovario es un órgano mucho más interno y no siempre fácil de localizar.



b- Mayor cantidad de polen, ya que mientras en una flor es posible encontrar miles de granos, el número de óvulos existentes es tan sólo uno.

c- Por último, existe una razón bastante frecuente en investigación y es que cuanto más se conoce de una determinada materia, mayor es el número de cuestiones que surgen y los deseos de encontrar respuesta a las mismas. Es difícil desear profundizar en algo que no se conoce. Por ello no se puede decir que el polen sea más interesante que el óvulo, sino que las circunstancias son más favorables para trabajar con éxito en él.

En nuestro caso, la elección no fue difícil, ya que el grupo de Citología Vegetal de la Unidad Estructural de Bioquímica Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín, en el que se ha realizado este trabajo, viene desarrollando como línea principal de investigación el estudio a nivel celular de la formación y maduración del grano de polen en angiospermas. En tesis precedentes se ha estudiado a nivel ultraestructural y citoquímico el grano de polen del olivo (*Olea europaea* L.) desde el estadio de células madres del polen hasta polen maduro. Siguiendo esta línea se planteó la realización de este trabajo eligiendo otra planta de interés agrícola como es el tomate (*Lycopersicum esculentum* Miller). Esta Memoria Doctoral se encuadró dentro del ámbito del Proyecto de Investigación "Estudio de la Expresión Génica del Grano de Polen Maduro" Proyecto Número: PB 87-00332-CO2 (1988-1992).

### **1.1- ANTECEDENTES HISTÓRICOS**

El polen según el "Diccionario de Botánica" (P. Fontquer 1985) fue definido por Palau (1778) como "polvillo muy fino contenido en la antera, la cual, arrojando

## **RESUMEN**

---

sus partículas con ímpetu, fecunda la semilla mediante el humor que exuda el estigma o remate del pistilo".

Parece lógico que el hombre desde sus primeros contactos con la naturaleza observara que los frutos derivaban de las flores e incluso que supiera de la existencia del polvo amarillento que hay en los estambres. En un principio este polen fue considerado como alimento y utilizado por tener grandes propiedades terapéuticas. Los romanos fueron los primeros en utilizar la palabra de origen latino "polen", cuyo significado significa "flor de harina" para denominar a este polvo floral debido a la utilidad que este tenía como harina.

No fue hasta el siglo XV cuando empieza a ser estudiado el polen como tal, según recoge Pla Dalmau en su monografía sobre polen (1961). Así, Juan Monardi (1462-1536) comenzó a estar interesado en los estambres de las flores. En el siglo XVII Jaime Robert, Sir Thomas Millington y Nehemias Grew empezaron a sospechar que la antera correspondía al órgano masculino de la flor. Camaerarius (1665-1721) llega a la conclusión de que el polen es el factor indispensable para la fecundación, sin existir los frutos si no hay unión previa de dos agentes fertilizadores. De esta forma se establece la existencia de la sexualidad en vegetales.

Koelereuter (1733-1806) fue quien obtuvo por primera vez plantas híbridas, con semillas capaces de germinar mediante la polinización artificial utilizando polen de plantas ornamentales de *Nicotiana* sobre estigmas de otras especies del mismo género. También lo realizó en plantas de otras especies como *Dianthus*, *Hyoscyamus*, *Mattiola*. De esta forma se dieron los primeros pasos en lo que hoy en día consideramos **mejora vegetal**.

Juan E. Purkinje (1787-1869) estudió los tejidos fibrosos de los sacos polínicos y estructuras del polen atendiendo a caracteres tales como forma, grado de transparencia, dimensiones, ornamentación.

Fisher (1890) realizó una clasificación de pólenes, siendo el primero en interpretar el significado de la tetrada como cuatro células agrupadas para formar un conjunto. Previamente se consideraba que la tetrada era una célula polinucleada. También observó que la intina es siempre la capa en contacto directo con el plasmalema del polen, siendo más gruesa allí donde la exina es más fina.

Strasburger (1884) observó en estudios realizados con *Monotropa* que en el ápice del tubo polínico, existían un núcleo vegetativo y dos gametos masculinos, de los que posteriormente uno se fusionaría con la oosfera. Sin embargo, el primero en observar la doble fecundación fue Nawaschin (1898) en *Fritillaria tenella* y *Lilium martagon*. De esta forma todos los aspectos de la **reproducción sexual en plantas** quedan estudiados, siendo ya perfectamente conocidos en el siglo pasado.

Por otra parte, en el siglo XIX también el polen comenzó a ser estudiado en medicina por sus implicaciones en la conocida "fiebre del heno", primeramente denominada "catarro de Bostock", por ser este autor el primero que describió sus síntomas. También se le denomina "catarro de rosas". Pero es Blackley (1873) quien reconoce al polen como verdadero responsable de la "fiebre del heno", o también llamada "**polinosis**", al tratarse de una enfermedad estacional cuya aparición coincide con la floración de las gramíneas y otras plantas. No fue difícil encontrar una relación entre el polen y esta enfermedad. Sin embargo, no se conocía como el polen penetraba en las vías internas del organismo. No sería hasta comienzos del siglo XX, cuando se avanzó de manera notable en el estudio de las

## **RESUMEN**

---

alergias. La mayoría de los estudios que siguieron iban dirigidos al campo médico-farmacológico.

Desde el punto de vista geológico es a partir del siglo XIX, cuando se comienza a identificar los granos de polen contenidos en las turberas, iniciándose la **Paleopalínología**. El libro "Textbook of Pollen Analysis" (Faegri y Iversen 1950) recopila la historia, técnicas y aplicaciones del análisis polínico de turberas y sedimentos.

En el siglo XIX Brown (1773-1858) demostró y utilizó el polen como carácter taxonómico para determinar los límites de ciertos géneros botánicos. Pero el estudio de la morfología del polen y sus implicaciones taxonómicas se desarrolla a principios del siglo XX y se recoge en el libro "Pollen Grains" (Wodehouse 1935), primer trabajo palinológico aplicado a la taxonomía. El máximo exponente de los morfólogos polínicos es el sueco Erdtman (1921-1971), cuyas contribuciones a la morfología del polen y taxonomía de las plantas son de un valor indiscutible y contribuyeron enormemente al desarrollo de la **Actuopalínología**. En su libro "Handbook of Palynology. An Introduction to the study of pollen grains and spores" (1969), recoge su gran experiencia en este campo.

Más recientemente, con el estudio del contenido polínico del aire y la realización de calendarios polínicos de diferentes regiones geográficas, se desarrolla el campo de la **Aerobiología**. Al mismo tiempo se han realizado estudios del contenido polínico en mieles (lo cual determina la calidad de las mismas) y que constituye el campo de la **Melitopalínología**.

Los diferentes aspectos aquí expuestos sobre el estudio del polen, es lo que constituye la **PALINOLOGÍA**. Este término fue propuesto por Hyde (1950) para

referirnos a la ciencia que estudia el grano de polen y esporas, así como otros materiales biológicos que puedan ser estudiados por medio de técnicas palinológicas. Esta disciplina relativamente joven, se encuentra en pleno auge y desarrollo, dadas las enormes aplicaciones que tiene tanto en investigación básica como aplicada.

### **1.2- IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL POLEN**

El polen es el gametofito masculino y por tanto actúa como vector de transporte de los gametos masculinos (un par de células espermáticas) hasta el estigma femenino de las angiospermas (Knox 1984). Por tanto es parte importante en el reconocimiento polen-estigma, de manera que sólo se produce fecundación entre aquellos gametos de plantas compatibles. El establecimiento de esta interacción polen-estigma es de vital importancia en la biología de la reproducción sexual de formación de semillas. Cada grano de polen actúa como una unidad aislada, con unas funciones encaminadas a mantener la viabilidad de las células espermáticas durante los procesos de deshidratación, hidratación y germinación del polen. El concepto de unidad germinal masculina compuesta por las dos células espermáticas y el núcleo vegetativo fue propuesto por Dumas y col. (1984). La competición que se origina entre los gametos, parece ser la responsable de que las angiospermas sufran una fuerte selección que las ha hecho prevalecer sobre otras plantas. Como resultado de la doble fecundación, propia de plantas superiores, se da origen a un cigoto, a partir del cual se desarrolla un embrión diploide que acaba dando

## **RESUMEN**

---

lugar a una planta (esporofito). En todo este proceso, el polen juega un gran papel por ser el responsable del origen y transporte de los gametos masculinos, indispensables en esta reproducción sexual.

Dado que el polen es parte fundamental en los procesos de reproducción de plantas, también es uno de los vehículos más utilizados en los programas de mejora de plantas cultivadas para la transferencia de caracteres genéticos. El polen es una parte esencial para la planta, con la cual comparte parte del genoma y procesos metabólicos básicos (Mascarenhas 1989; Evans 1990). La gran diferencia es su carácter haploide, carácter que junto con su tamaño y abundancia lo hacen un buen material para ser usado en programas de biotecnología.

El polen por sí sólo y en condiciones especiales, también es capaz de dar origen a embriones, debido a una desviación del proceso sexual y estos a su vez a plantas haploides, las cuales constituirían la fase esporofítica. Este fenómeno puede ocurrir de forma anormal en la naturaleza. Sin embargo hoy en día tienen un gran interés económico, de ahí el intento de inducir la embriogénesis a partir del polen o androgénesis para obtener embriones haploides *in vitro*. Fueron Guha y Mahehs-wari (1964), los que obtuvieron por primera vez y de forma regular una alta frecuencia de embriones haploides a partir de anteras de *Datura innoxia* . Posteriormente han continuado este tipo de intentos llegándose a establecer métodos generales para la inducción y desarrollo de embriones haploides, callos y plantas a partir del cultivo de anteras o polen (Sunderland 1974, 1983; Sangwan-Norreel y col. 1986; Sangwan and Norreel 1975; Foroughi-Werh y Wenzel 1989). Los estadios más apropiados para inducir con éxito la androgénesis son justo antes y después de la mitosis de la microspora (Sunderland 1984; Heberle-Bors 1985;

Prakash y Giles 1987; Benito Moreno y col. 1988). El embrión puede originarse a partir de la microspora por división simétrica, o por división asimétrica convencional seguida por divisiones, bien de la célula generativa, bien de la vegetativa (ver esquema V, pag. 260).

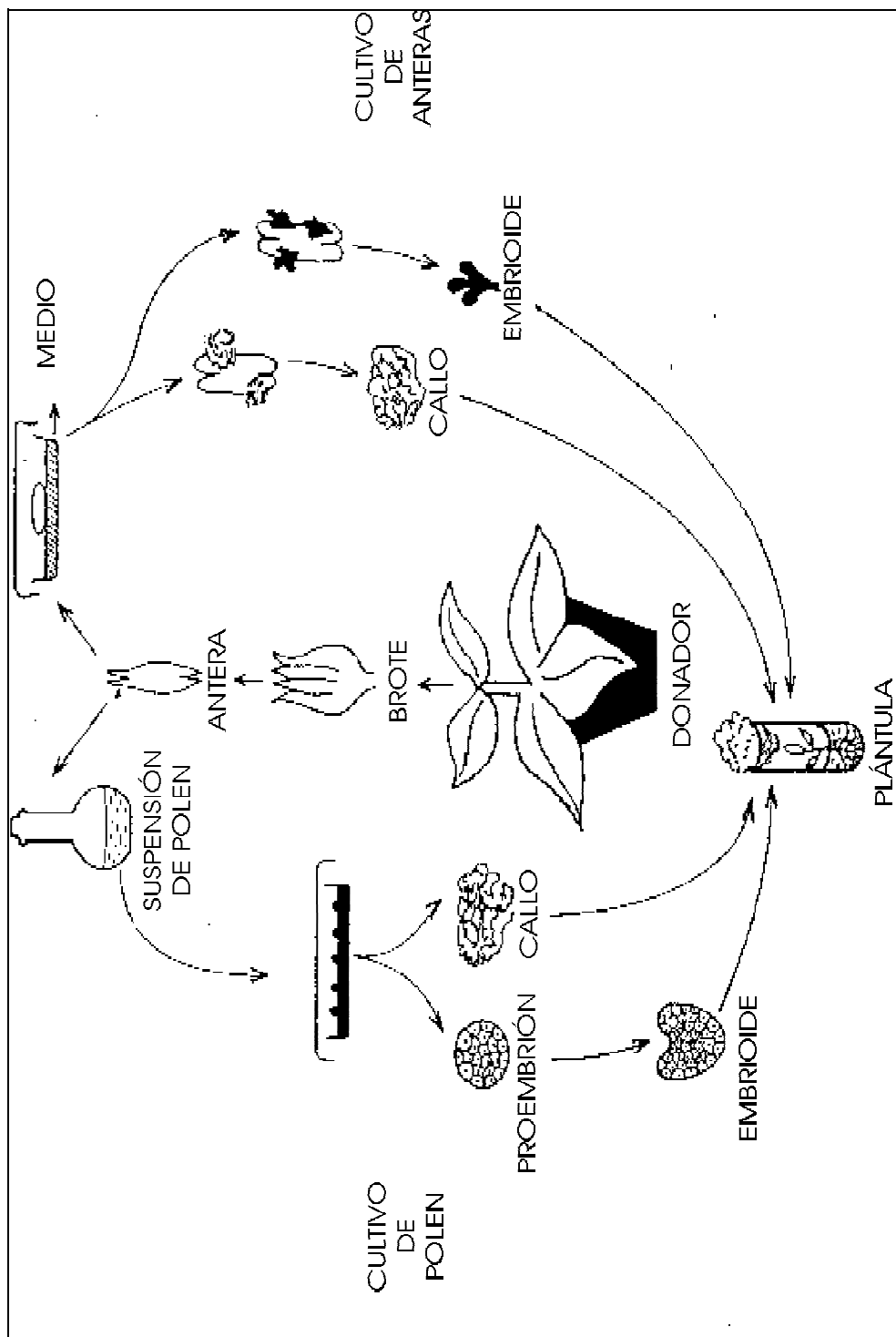
En el Esquema I se muestra como los haploides se pueden obtener a partir del cultivo de anteras o bien por cultivo del polen aislado. La androgénesis puede ser inducida de varias formas: **androgénesis directa**- cuando la antera o polen forman directamente embriones; o **androgénesis indirecta**- cuando previamente a la formación del embrión se forma un callo a partir del cual se diferencian embriones o se produce organogénesis.

La obtención de estos embriones haploides va a venir determinada por una serie de factores críticos para la consecución de la androgénesis, como son: estadio del polen; genotipo y edad del donador; sometimiento del polen a una agresión (stress) previa mediante diferentes pretratamientos, como son choque térmico o falta de nutrientes en el medio (Maheshwari y col. 1980; Praskash y Giles 1987; Benito Moreno y col. 1988).

Las aplicaciones de las plantas haploides obtenidas por androgénesis son muchas, y en ello radica su interés. En primer lugar los individuos obtenidos son haploides, con lo cual la expresión fenotípica y su genotipo van a coincidir totalmente, de manera que podemos observar caracteres que por su naturaleza

recesiva no eran observados antes. Además, y por la misma razón, se expresan mutaciones que podían también estar enmascaradas. Debido a que son plantas con una dotación cromosómica reducida a la mitad son un material óptimo para

**RESUMEN**



**ESQUEMA I**



experiencias de transformación genética. Se pueden detectar interacción entre genes. Por otra parte facilitan la obtención de plantas homocigotas diploides, sobre todo en aquellos casos en los que la fase juvenil es larga. Además ayudan a reducir el nivel de ploidia en plantas poliploides y son idóneas para procesos de fusión somática *in vitro*.

El mayor interés de los haploides es la posibilidad de producir plantas homocigóticas por duplicación cromosómica. Esta es una ruta más rápida que la natural, para la obtención de homocigosis y tiene un gran interés en la producción de plantas. En la polinización cruzada de especies, las plantas homocigóticas son mucho más usadas como parentales para la producción de híbridos por simple o doble cruzamiento.

Las plantas haploides son por tanto de gran interés económico y científico. Por ello es necesario que el material a partir del cual van ha ser obtenidas, el POLEN, sea perfectamente conocido. Es importante, pues, estudiar el polen durante su desarrollo tanto "in vivo" como *in vitro* y determinar las bases que ayuden a abordar la inducción de la androgénesis con una mayor probabilidad de éxito.

La microspora es una célula fácilmente accesible, individual y totipotente de modo que ofrece ventajas únicas para el estudio de la división celular y diferenciación.

### **1.3- LA REPRODUCCIÓN SEXUAL**

Conocemos como organismos eucariotas a aquellos en que sus células tienen material genético localizado dentro de un compartimiento llamado núcleo. En este

## **RESUMEN**

---

grupo incluimos todos los organismos celulares, a excepción de bacterias y algas verde azuladas. La reproducción en eucariotas puede ser asexual (reproducción vegetativa) y sexual. La reproducción asexual es frecuente en los organismos vegetales (estacas, estolones); sin embargo el mecanismo más generalizado y que requiere una mayor especialización es la reproducción sexual.

La reproducción sexual conlleva la unión de dos células diferenciadas, conocidas como gametos, los cuales tienen una dotación cromosómica haploide; estas células sexuales al unirse dan lugar a un cigoto diploide del que se desarrollará un individuo nuevo. Por lo general las células gaméticas se originan y provienen de organismos progenitores diferentes, aunque en algunos casos puede haber autofecundación.

En organismos eucariotas existen dos formas diferentes de división celular: **Mitosis**, propia de las células somáticas. Antes de que tenga lugar esta división se produce una duplicación de los cromosomas, resultando de esta mitosis dos células hijas con la misma dotación cromosómica que la célula madre. **Meiosis**, esta división tiene como resultado la formación de cuatro células haploides que darán lugar a las células gaméticas. Consiste en dos divisiones mitóticas pero sólo una duplicación del material cromosómico. Por tanto, el resultado serán células con una dotación cromosómica que es la mitad que la de la células somáticas. Se trata pues de una división reduccional.

Los gametos así originados, se unen dando lugar al cigoto del que se desarrolla un individuo completo y con igual dotación cromosómica que sus progenitores. Este es en definitiva el modelo general de reproducción sexual de cualquier organismo eucariota.

En los vegetales las células gaméticas se originan en sus respectivos órganos, masculinos o estambres y femeninos o carpelos. En la reproducción sexual en vegetales, el polen, originado en los microesporángios de la antera, una vez maduro es "trasladado" de muy diversas formas y medios (viento, animales, agua) hasta el órgano sexual femenino. Una vez en el estigma, forma el tubo polínico, dentro del cual hay dos células espermáticas o verdaderos gametos y un núcleo vegetativo. Estas células espermáticas penetran por el micropilo y tiene lugar la doble fecundación. Uno de los núcleos espermáticos se une a la oosfera (gameto femenino) originando el cigoto. El otro núcleo espermático, se une al núcleo del endospermo el cual da lugar a un tejido triploide que es el endospermo secundario, encargado de la nutrición del cigoto. De esta manera obtenemos semillas las cuales se encuentran encerradas dentro del fruto, entendiendo como fruto a aquellas partes de la flor que acompañan a la semilla hasta su maduración y que la ayudan en su diseminación.

#### **1.4- EL MICROSPORANGIO**

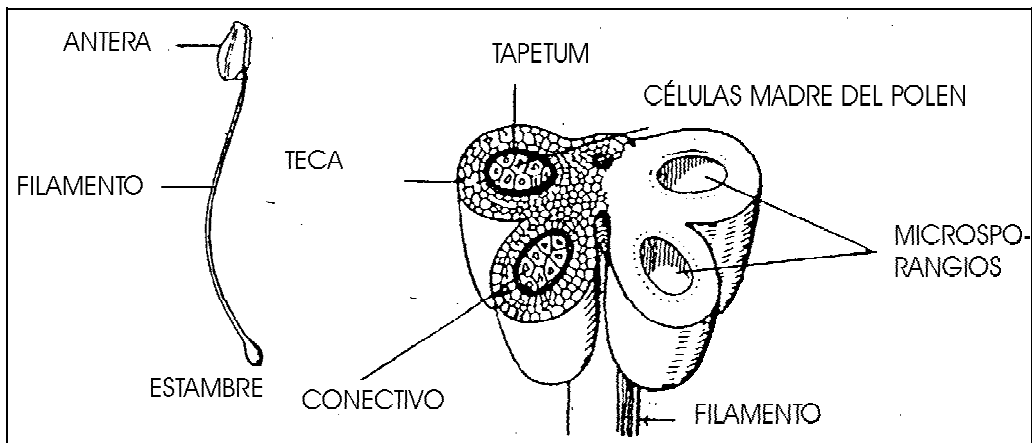
El órgano masculino en plantas está constituido por un filamento y una antera los cuales constituyen el estambre. Una antera joven es una masa de tejido meristemático rodeado de epidermis, dentro de esta existen cuatro grupos de células arquesporales o cuatro microsporangios (esquema II). Una antera madura está formada por cuatro lóculos separados entre sí por tejido conectivo. Dentro de cada lóculo hay un microsporangio o saco polínico donde se encuentran las mi-

## **RESUMEN**

---

crosporas-granos de polen, rodeadas por el tapetum y el resto de los tejidos de la pared de la antera: capa intermedia, endotecio y epidermis. El Tapetum es un tejido especializado que tiene por función la de proveer a las microsporas los nutrientes necesarios para su desarrollo. En ocasiones, estos cuatro microsporangios pueden quedar reducidos a dos por rotura del tabique de separación.

En las angiospermas primitivas el estambre era una estructura laminar y expandida, incluso sin diferenciación entre las partes fértiles y las estériles, siendo el conectivo muy desarrollado en un principio, para luego ir reduciéndose progresivamente. Los microsporangios presentan diferentes caracteres según las especies dependiendo del grado de evolución de las mismas.



**ESQUEMA II**

### 1.5- MICROESPOROGENESIS

Entendemos como **microsporogénesis** a la formación de las microsporas dentro del microsporangio. A partir de las microsporas tiene lugar la **microgametogénesis**, la cual comprende la formación del polen como consecuencia de una mitosis asimétrica y la **formación de los gametos** por mitosis de la célula generativa.

**Microsporogénesis:** el tejido esporógeno se multiplica por divisiones mitóticas sucesivas hasta alcanzar un número determinado de células. Estas células entran en meiosis pasando a ser células madres del polen (CMP). Se desconocen los factores que desencadenan el paso de dichas células a la meiosis. El resultado de esta división meiótica son cuatro células haploides reunidas dentro de una pared especial de calosa y conocidas como microsporas (Heslop-Harrison 1964; 1966a,b; Dunbar 1973a,b) que más tarde quedan libres en el lóculo, dando lugar a la formación del polen.

Las tetradas suelen estar en disposición tetraédrica o tetragonal dependiendo de que la tabicación ocurrida después de la meiosis sea de tipo sucesivo o simultáneo (Wodehouse 1935; Pla Dalmau 1961) . Hay excepciones, existiendo tetradas con formas muy diversas incluso dentro de la misma especie siendo posible encontrar dos o más tipos de tetradas (según su disposición) *Musa* (Juliano y Alcalá 1933), *Laurus* (Battaglia 1947), *Ottelia* (Islam 1959).

Durante la profase meiótica, las CMP se encuentran conectadas entre sí por los llamados canales citomícticos o conexiones, a través de los cuales puede haber intercambio de material citoplásmico e incluso de organélas (Heslop-Harrison 1966a; Risueño y col. 1969). A lo largo de la profase meiótica empieza a depo-

## **RESUMEN**

---

sitarse la calosa alrededor de los meiocitos (Waterkeyn 1962; Svarla y Larson 1966; Alché 1991). Es a partir de paquitene cuando se detectan los primeros depósitos de calosa fácilmente reconocibles por la fluorescencia que presentan con tinción mediante azul de anilina (Currier y Strugger 1956; Alché y col. 1990). En un principio la pared de calosa es incompleta alrededor de los meiocitos, permitiendo que las conexiones citoplásmicas entre células se mantengan. En la segunda división estos canales han desaparecido totalmente y las células están del todo rodeadas por la pared de calosa.

Durante el período de tetrada joven se deposita la primexina y los primeros depósitos de las probáculas y tectum que definen la futura estructura de la exina. Una vez que las jóvenes microsporas ya tienen consolidada la estructura característica de la exina, se produce la degradación de la calosa, quedando las microsporas libres en el lóculo de la antera. Se ha propuesto que la calosa se degrada por la acción de la calasa, enzima que parece proceder del tapetum (Frankel y col. 1969; Izhar y Frankel 1971).

La microspora, libre en el lóculo de la antera, es la primera célula de la generación gametofítica. La vida media de una microspora varía según la especie siendo más corta en plantas tropicales (Maheshwari 1949, 1950). Estas células van aumentando progresivamente de volumen hasta alcanzar una masa crítica para dar lugar a la división mitótica asimétrica cuyo resultado es el grano de polen bicelular (Knox 1984).

Durante el estadio de microspora el núcleo se encuentra en período de interfase, durante la que se prepara para la división asimétrica. Lo más característico de ella

parece ser el largo período S en el que ocurre una mayoritaria síntesis de DNA (Testillano 1991).

### **1.6- FORMACIÓN DEL GRANO DE POLEN**

Como consecuencia de la marcada polaridad que presenta la microspora antes de la mitosis se originan dos células desiguales, vegetativa y generativa. La vegetativa de mayor tamaño, engloba a la generativa. Estas diferencias de tamaño entre las dos células hijas lleva implícito un reparto desigual de las organelas, quedando la mayoría en el lado del grano que va a corresponder a la célula vegetativa. Generalmente, todos los plastidios permanecen en la célula vegetativa mientras la célula generativa presenta ausencia de ellos, salvo algunas excepciones (Hagemann 1981; Russell y Cass 1983). Existen pocos estudios acerca del la **célula generativa**, pero la mayoría coinciden en afirmar que el número de organelas presentes en ella es muy bajo (Mascarenhas 1975; Bhandari 1984).

El núcleo vegetativo se sitúa en el centro del grano mientras el núcleo generativo se encuentra desplazado junto a la pared del grano. Parece existir una relación entre la apertura del grano de polen y la posición que la célula generativa tiene dentro de este. Siguiendo la hipótesis de Huynh (1976) o "ley de la distancia máxima", la célula generativa se localiza en el punto más lejano de la apertura germinativa, existiendo algunas excepciones (Sampson 1981).

La placa celular, situada entre ambos núcleos, se curva alrededor del núcleo generativo para fusionarse con la intina en los extremos, formando una envoltura

## **RESUMEN**

---

semiesférica y resultando de esta manera dos células aisladas pero en cierta medida dependientes una de otra (la célula generativa depende de la célula vegetativa). La pared de la célula generativa, sin ningún tipo de plasmodesmos, se va poco a poco estrangulando hasta llegar a liberarse de la intina, quedando la célula generativa inmersa en el citoplasma de la vegetativa. La célula generativa cambia de forma pasando de ser redondeada a tener una forma alargada (Cresti y Tiezzi 1990). Merece la pena destacar el papel que juega el citoesqueleto en mantener la forma alargada y posiblemente en el desplazamiento de la célula generativa hacia el tubo polínico. Se ha descrito la presencia de microtúbulos dispuestos de forma paralela al eje longitudinal de la célula generativa (Ciampolini y col. 1988; Cresti y col. 1984, 1985; Dickinson y Sheldon 1984; Fernández 1986).

El núcleo generativo rápidamente adquiere el aspecto propio de un núcleo inactivo, con condensación de la cromatina y desaparición del nucleolo.

La **célula vegetativa** sufre una espectacular transformación del citoplasma durante la maduración del polen, pasando por diferentes etapas en cuanto a las sustancias de reserva que almacena. En la madurez puede presentar una elevada cantidad de almidón (Feijóo y Pais 1988; Sangwan y Sangwan-Norreel 1987) o bien en otras especies el almidón se transforma dando lugar a la aparición de cuerpos lipídicos (Miki-Hiroshige y Nakamura 1983; Fernández 1986; Charzinska 1989). El núcleo presenta las características propias de una gran actividad en cuanto a síntesis y procesamiento de RNA (Mascarenhas 1989), como se refleja en la estructura nucleolar y en el aspecto descondensado de la cromatina. Inicialmente es de gran volumen, esférico y ocupa el centro del grano. Sólo hacia el final de la madura-



ción, cuando el grano ya tiene la maquinaria necesaria para germinar, el núcleo presenta síntomas de degeneración: forma muy lobulada, desaparición del nucleolo y masas de cromatina condensada. Se desconocen los factores genéticos responsables de que el núcleo vegetativo no complete su ciclo para dividirse de nuevo.

La célula vegetativa es una célula altamente especializada, que adquiere a lo largo de la maduración la infraestructura necesaria para la formación del tubo polínico (Fernández 1986; Charzynska y col. 1989).

Dentro de las transformaciones que ocurren en el citoplasma vegetativo, es importante destacar aquellas encaminadas a la metabolización de almidón y cuerpos lipídicos. Se ha descrito la presencia de microcuerpos en gran variedad de tejidos vegetales (Sautter 1989), pero son muy pocas las referencias acerca de la existencia de estos orgánulos en el grano de polen (Charzynska y col. 1989; Pais y Feijoó 1986, 1987). Como es sabido estos orgánulos están íntimamente relacionados con procesos de transformación de sustancias lipídicas a azúcares (Beevers 1980). El detectar la presencia de estos orgánulos dentro del grano de polen, o actividades enzimáticas asociadas a ellos, es de gran importancia para comprender un poco mejor los procesos metabólicos que ocurren durante la maduración del grano de polen.

Antes de que se produzca la anthesis ocurre una deshidratación muy rápida en la antera (Linskens 1976a, b). La dehiscencia de la antera y dispersión de los granos de polen están influenciados por numerosos parámetros como pueden ser: temperatura, humedad y luz, entre otros (Linskens y Cresti 1988). En relación con el factor humedad, la germinación del grano de polen depende esencialmente del

## **RESUMEN**

---

grado de hidratación del grano. Los diferentes estados de hidratación que sufre el polen durante su desarrollo y germinación han sido estudiados en algunas especies (Dumas y Gaude 1983; Duplan y Dumas 1984). Durante la deshidratación previa a la germinación, que puede variar según las especies, el polen entra en una fase de dormancia que se prolonga hasta que se produce una activación, bien de forma natural o bien artificial. El polen no vuelve a ser rehidratado hasta que se encuentra en la superficie estigmática ya listo para germinar (Heslop-Harrison 1987).

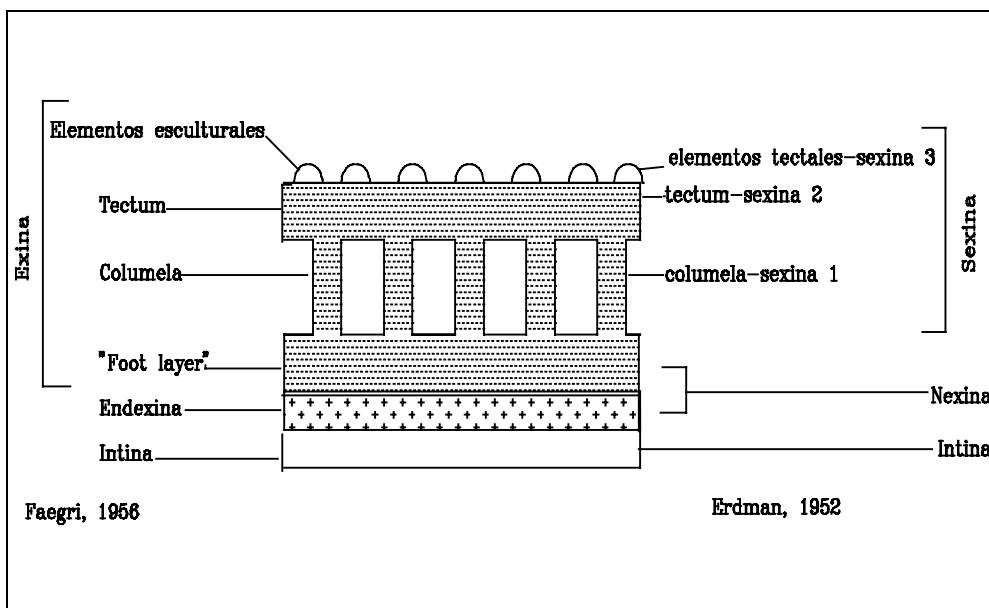
El tubo polínico emerge a través de la apertura, la cual es una región diferenciada de la pared. Esta diferenciación tiene lugar tanto a nivel de la exina como de la intina. En los pólenes inaperturados la salida del tubo polínico tiene lugar por rotura de la exina (Knox 1984). El primer hecho asociado con la germinación, es la hidratación e hinchazón que sufre la capa externa de la intina.

En el grano de polen de tipo bicelular las dos células espermáticas se forman por división de la célula generativa dentro del tubo polínico. En otros casos la célula generativa sufre la división dentro del grano de polen en donde se forman las células espermáticas antes de la antesis, se trata de pólenes de tipo tricelular.

### **1.7- FORMACIÓN DE LA PARED DEL GRANO DE POLEN**

La pared del grano de polen presenta unas características peculiares que la hacen diferente tanto en estructura como en función al resto de paredes celulares.

Ello hace que sea merecedora de una especial atención por nuestra parte. La pared del polen no sólo sirve para proteger y aislar al grano, sino que por el contrario debe permitir el paso de sustancias del exterior, necesarias tanto para su desarrollo como para llevar a cabo su función primordial: la germinación. Por tanto la organización típica que presenta la pared del polen hay que interpretarla como una adaptación para llevar a cabo este tipo de funciones (Blackmore y Barnes 1990). En el esquema III, se muestran las diferentes capas y estructuras de la pared del polen así como las denominaciones que se le han dado según se atiende a criterios puramente morfológicos (Erdtman 1952) o a las propiedades de tinción (Faegri



**ESQUEMA III**

1956). Nosotros hemos elegido la nomenclatura de Faegri por ser esta la más

## **RESUMEN**

---

comúnmente usada hoy en día.

El patrón o estructura de la exina, queda establecido mientras las microsporas se encuentran encerradas dentro de la pared de calosa constituyendo la tetrada (Heslop-Harrison 1988c). Posteriormente continua desarrollándose durante el estadio de microspora ya libre en el lóculo. El polen tiene una envoltura muy particular lo cual hace que las características de esta cubierta puedan utilizarse como dato taxonómico, debido a su apariencia semitectada, reticulada, verrucosa, tectada, etc. La pared del polen está constituida por dos capas: externa o **exina** y otra interna o **intina**.

**La Exina** es la capa más externa compuesta por material resistente a la acetólisis (Erdmant 1969), denominado esporopolenina, asociado a restos de primexina y a depósitos de tapetum (Southworth 1974, 1990). Su origen parece ser por polimerización oxidativa de pigmentos carotenoides y ésteres de carotenoides (Brooks y Shaw 1978; Shaw 1971). Tiene propiedades en común con la lignina y cutina (Kolattukudy 1980). La pared contiene aproximadamente un 1% de sílice (Southworth 1990). La exina se puede subdividir en:

**Ectexina**, consiste en elementos estructurados básicamente constituidos por columelas y tectum que a su vez pueden presentar ornamentaciones externas diversas. Su formación va ocurriendo por la adición de materiales procedentes del tapetum durante el estadio de microspora libre (Blackmore y Barnes 1987a).

**Endexina**, es el estrato exínico que envuelve a la intina; se caracteriza por la presencia de estructuras trilamelares denominadas en la literatura como "white-line-centred lamellae" o lamelas con una línea blanca central (Rowley y Southworth 1967). Existen grupos de plantas superiores en los que la endexina

puede estar ausente (Blackmore y Barnes 1987 a,b).

La **Intina** por su naturaleza y propiedades correspondería a la pared celular propia de una célula vegetal, de naturaleza celulósica (Kress y Stone 1983; Blackmore y Barnes 1990). Esta capa inicia su formación en el estadio de microspora vacuolada continuando a lo largo del grano bicelular (Blackmore y col. 1988; Blackmore y Barnes 1990). Su espesor es variable y según las especies se puede apreciar de uno a dos estratos diferenciados (Kress 1986). Uno más interno de naturaleza celulósica y de apariencia fibrilar, conocido como intina primaria y otro más externo que corresponde a la intina secundaria y que contiene gran cantidad de polisacáridos ácidos (Mühlethaler 1953; Sitte 1953; Bailey 1960; Kress 1986). Esta diferenciación en dos estratos suele aparecer preferencialmente a nivel de las zonas aperturales.

El polen maduro puede presentar en la superficie externa de la exina y entre sus cavidades, material de naturaleza lipoproteica procedente de la degradación del tapetum siendo denominado cubierta del polen o "polen coat" en general. Si este material se ha originado por nueva síntesis predominando en los componentes de lipídicos se conoce como "Pollenkitt", mientras que si se trata de material proteináceo procedente de la degradación del tapetum se le denomina "Trifinas" (Bhandari 1984). En general a estas cubiertas polínicas les ha sido atribuido la responsabilidad del carácter "pegajoso" del polen (Troll 1928; Phol 1930; Knoll 1930, 1936), así como de su color amarillo por contener carotenos y flavonoides. Su papel es ayudar al polen a atraer a los insectos y de que este se adhiera al cuerpo del insecto (Heslop-Harrison 1968b) además probablemente sea una buena protección contra la acción de rayos ultravioleta.

## **RESUMEN**

---

La pared del polen es la única a través de la cual puede existir alguna comunicación entre el grano y el medio que lo rodea o lóculo de la antera. Es lógico pensar que el polen debe de recibir los nutrientes necesarios para su desarrollo desde el tapetum (Knox 1984). Por tanto deben existir lugares a través de los cuales se produzca este paso. Se ha descrito la existencia de canales o microcanales (Rowley 1975, 1976; Fernández y Rodríguez-García 1990) pero estas estructuras, si están presentes, varían de unas especies a otras.

Las **regiones aperturales** pueden ser consideradas como zonas de la pared del polen través de las cuales se producirá la salida del tubo polínico durante la germinación. Estas regiones sufren modificaciones estructurales durante el período el desarrollo y maduración del grano (Fernández y Rodríguez-García 1985, 1989). El número de aperturas que puede tener un grano de polen es muy variable, encontrándose pólenes que carecen de ellas (inaperturados) mientras otros tienen numerosas aperturas (multiporados). Lo más corriente es que el polen tenga una sola apertura como ocurre en muchas monocotiledóneas, aunque son también frecuentes los pólenes que constan de tres regiones aperturales como ocurre en muchas de la dicotiledóneas. La gran variedad de tipos de aperturas en cuanto a forma y componentes que las constituyen hacen que estas regiones sean tradicionalmente consideradas como un importante dato taxonómico.

En el caso de pólenes que presenten región apertural compuesta (endo y ectoaperturas), la estructura de la apertura consiste en una diferenciación o hinchazón de la endexina denominada "oncus de la endexina" (Fernández y Rodríguez-García 1988) la cual constituye la endoapertura del polen maduro. En estas aperturas germinales del grano maduro la exina no existe o queda reducida a un casquete

u "opérculo", constituyendo la ectoapertura. A nivel de la intina se produce una hinchazón denominada "oncus de la intina" el cual se ha formado por un engrosamiento en forma de lente en la intina de la región apertural (Fernández y Rodríguez-García 1988).

Las **funciones** atribuidas a las regiones aperturales son varias, aunque la más importante y fundamental es la de permitir la germinación del polen dando lugar a la salida del tubo polínico. Parece ser el oncus de la intina el que facilita esta salida del tubo polínico.

Entre las otras funciones en las que parece que las regiones aperturales desempeñan un papel importante, merece destacar:

- Regulación de los cambios de volumen o harmomegata (Woodehouse 1935) que experimenta el grano como consecuencia de su desarrollo, así como del grado de humedad o sequedad que tiene el polen en la madurez.

Esto ocurre gracias al alto grado de flexibilidad que tienen estas zonas respecto al resto de la pared (Blackmore and Barnes 1986; Fernández y col. 1992).

- Como vías de paso de materiales procedentes del exterior permitiendo el paso de sustancias en los estadios jóvenes de desarrollo (Fernández y Rodríguez-García 1990).

- Como lugar de almacén de proteínas necesarias para la germinación (Kress 1983; Heslop-Harrison y col. 1986).

## **1.8- EL TOMATE COMO MATERIAL DE ESTUDIO**

El tomate (*Lycopersicon esculentum*, Miller) pertenece a la familia **Solanaceae**

## **RESUMEN**

---

caracterizada por ser hierbas erectas o trepadoras, arbustos o árboles con hojas alternas, frecuentemente enteras. Flores hermafroditas en general con simetría radiada. Ovario súpero, con dos carpelos de dos o más cavidades, un estilo. Anteras en un cono que rodea al estilo, que se abren por hendiduras longitudinales, no por poros. Las anteras tienen la punta estéril, prolongada aguda o estrecha. *Lycopersicum esculentum* descubierto por Miller es una planta glanduloso paludosa, de olor fuerte, anual, de hasta un metro de longitud, con hojas pinnadas, flores amarillas en ramilletes ramificados, con grandes frutos en baya carnosos y rojos. La corola es de unos dos centímetros de diámetro, con estambres imparipinnados, con folíolos grandes, ovales, irregularmente dentados, con otros folíolos menores intermedios. Fruto globular o lobulado, pero generalmente comprimido de arriba abajo, de color rojo brillante, raramente amarillo (O. Polunin 1982) .

### **1.8.1- ORÍGENES**

El nombre del tomate deriva de la palabra "Tomatl" en "Nahuatl" que es el idioma de los antiguos mexicanos.

No se conocen con exactitud los orígenes del tomate, pero la evidencia sugiere que fue en México donde apareció por primera vez. El tomate cultivado se originó en el Nuevo Mundo antes de ser llevado a Europa y Asia, siendo la primera variedad que se conoce la del tomate cereza (*Lycopersicum esculentum* var. *cesariforme*). Todas las variedades cultivadas en Europa y Asia son descendientes de las semillas traídas de México por colonizadores, frailes y comerciantes europeos del



siglo XVI.

Datos históricos indican que el tomate fue traído por Hernán Cortés en 1523, poco después de la conquista de México. Parece que la primera mención del tomate en Europa es de Pier Andres Mattioli en el 1554. Otros mencionan a Mathilous, 1554. Pero en Francia no se conoció hasta 1660 siendo su primera función la de planta ornamental.

### **1.8.2- USOS Y PROPIEDADES**

En el capítulo primero del libro quinto de "Plantas Medicinales" de Francisco Hernández (alrededor de 1580), se relata de una forma exhaustiva las diferentes variedades de tomate y de sus virtudes curativas. *"Aparte de las demás especies de solano, de las cuales hablamos al tratar de las plantas de nuestro Viejo Mundo, hay en este, otras cuyos frutos, llamados tomatl porque son redondos, están encerrados en una membrana, son de naturaleza seca y fría y participan de alguna acidez..." "... Curan, aplicados a fístulas lagrimales y los dolores de cabeza, alivian los ardores de estómago, y untados con sal resuelven las paperas. El jugo es bueno contra inflamaciones de garganta, y cura las úlceras reptantes mezclado con albayalde, aceite rosado y litargirio. Para las fístulas lagrimales se mezcla con pan; para la irritación de los niños que llaman soriasis, con aceite rosado; se agrega a los colirios en vez de agua..."*

Los principios más importantes del tomate son las vitaminas A y C; La vitamina A defiende al organismo de infecciones de vejiga y riñones. La vitamina C es

## **RESUMEN**

---

importante para el tejido conjuntivo, formación de huesos y tejido capilar, siendo esenciales en la dieta.

El tomate es uno de los alimentos más populares y de mayor consumo en el mundo. sólo fue aceptado universalmente como alimento a partir del siglo XIX. Anteriormente no era consumido, por la creencia existente de que sus frutos contenían alcaloides, al pertenecer a la familia de las Solanáceas, al igual que la *Belladonna* y *Mandrágora*, y por tanto se temía su toxicidad. Recientemente se ha comprobado que el tomate, contiene alcaloides, aunque sólo los tomates verdes, puesto que la solanina que contiene desaparece al madurar.

Florece en primavera y los frutos se dan en verano y en otoño, aunque con las nuevas técnicas de cultivo se consigue durante todo el año. En los climas templados, como Canarias, se cultivan durante todo el año y constituyen un importante artículo de comercio exterior.

La simiente de tomate resiste el paso por el tubo digestivo de las personas y además esto acrecienta las facultades germinativas de las semillas. Por ello, aparecen muchas tomateras cimarronas en lugares retirados, en desagües, junto a muros rurales o en cunetas sin tener ningún cuidado ni riego (P. Iglesias 1988).

### **1.8.3- ¿POR QUÉ EL TOMATE COMO MATERIAL DE ESTUDIO?**

Los estudios sobre polen realizados en esta especie son relativamente escasos. En un principio se realizaron estudios a nivel de microscopia óptica (Smith 1935; Rick 1984; Moens 1964; Sawhney y Bhadula 1988). Además, los estudios existentes a nivel ultraestructural, han sido realizados en otra especie, como es

*Lycopersicum peruvianum* en la que se describe el proceso de la microsporogénesis (Paccini y Cresti 1978; Pacini y Juniper 1984). A nivel ultraestructural de *Lycopersicum esculentum* sólo existen aportaciones muy específicas (Bonner 1988; Polowick y Shawney 1992; Fernández y col. 1992), pero falta un estudio completo y sistemático sobre la microsporogénesis del tomate.

Por otra parte el tomate es una planta de cultivo muy importante económicamente por lo que es deseable conocer mejor la formación y desarrollo de su polen. Este tipo de estudios también son de interés en las investigaciones realizadas con líneas que muestran esterilidad masculina, las cuales pueden ser utilizadas en la producción de semillas híbridas.



# ***Capítulo 2: Justificación y Objetivos***

## **2.1- JUSTIFICACIÓN**

El grano de polen es un material óptimo para usar en experiencias de transformación genética, debido a su fácil manipulación, el elevado número de granos y carácter haploide del mismo, así como por su capacidad de transmitir las transformaciones genéticas inducidas a las próximas generaciones.

El cultivo de anteras y granos de polen tiene una gran importancia económica debido a sus implicaciones en la mejora genética de plantas. El objetivo de los cultivos es la obtención de individuos haploides los cuales, tienen una serie de

## OBJETIVOS

---

ventajas como son: reducción del nivel de ploidia, detección de caracteres y mutaciones recesivas y obtención de individuos homocigotos diploides. Aunque las Solanáceas es una de las familias más utilizadas y con mayores probabilidades de éxito en la obtención de haploides, sobre todo en el género *Nicotiana* (Nakata y Tanaka, 1968); (Reinert y col., 1975); (Sunderland y Wicks, 1971), sin embargo escasean los intentos realizados en tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. (Grees-hoff y Doy, 1972); (Levenko y col., 1977); (Sharp y Raskin, 1972).

Para abordar con éxito el estudio morfofuncional de la inducción del embriode haploide es necesario una serie de investigaciones a nivel básico, las cuales conllevan la puesta a punto de determinadas técnicas, así como un conocimiento exhaustivo a nivel citológico del material a utilizar. Los estudios sobre el desarrollo del polen son muy numerosos, sin embargo son muchas las incógnitas que permanecen abiertas y que necesitan de una mayor investigación. Si bien es cierto que el desarrollo del polen sigue un modelo general en angiospermas, existen peculiaridades, dentro de cada especie, como resultado de la evolución, el medio ambiente y estrategias de la planta a estudiar. Estas peculiaridades deben de ser tenidas en cuenta a la hora de realizar el cultivo de anteras "in vitro". De aquí el interés del estudio del desarrollo del polen, y en nuestro caso el polen de tomate, durante su desarrollo y maduración.

**2.2- OBJETIVOS**

**1- Puesta a punto del cultivo de anteras para inducir la embriogénesis.**

**2- Organización celular del polen de tomate** basándonos en el comportamiento secuencial del núcleo y citoplasma durante el desarrollo del gametofito, desde final de la meiosis hasta la dehiscencia de la antera. Se hará mayor énfasis en las fases de desarrollo que han sido descritas como más propicias para conseguir la embriogénesis (microspora vacuolada y grano bicelular joven). Para realizar estos estudios se ha utilizado microscopía óptica y electrónica convencional complementando con técnicas citoquímicas.

**3- Determinar la presencia de microcuerpos durante la maduración del grano** (glioxisomas) y/o actividad catalasa, peroxidasa y oxidasa. Para ello se ha recurrido a técnicas citoquímicas e inmunocitoquímicas.

**4- Determinar las vías de paso de materiales** a través de la pared del grano de polen (exina e intina) mediante la utilización de elementos traza como es el Nitrato de lantano.





# ***Capítulo 3: Material y Métodos.***

## **3.1-MATERIAL**

Como material utilizamos flores de tomate *Lycopersicum esculentum* Miller, var. tívoli de las cuales extraemos las anteras. Las flores se toman de muy distintos tamaños, desde botones florales los cuales están todavía cerrados, hasta flores totalmente abiertas. De esta manera trabajamos con una amplia variedad de tamaños de anteras, desde unos 3mm hasta 8mm de longitud. Las anteras que utilizamos para nuestro trabajo abarcan estadios comprendidos entre tetradas y polen bicelular maduro.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

### **LÁMINA 1** **MATERIAL**

**a-** Flores de tomate (*Lycopersicum esculentum*).



Lámina 1



### **3.2- MÉTODOS**

#### **3.2.1- CULTIVO "IN VITRO" DE ANTERAS DE TOMATE**

Se tomaron brotes florales de tomate *Lycopersicum esculentum* var. tívoli de tamaños que varían desde 3mm, hasta flores totalmente abiertas. Los brotes se desinfectaron en etanol de 100° durante uno o dos minutos como máximo, posteriormente se lavaron con agua bidestilada y autoclavada, dando tres lavados de unos diez minutos cada uno, donde se mantienen hasta que se procede a su cultivo.

Una vez lavados estos brotes florales se realizó su disección con ayuda de una lupa binocular Zeiss Stem SR para luego ser cultivados en placas Petri con unos 15ml de medio solidificado con 8gr/l de agar. Se utilizaron dos medios de cultivo diferentes:

- DBM I y DBM II (Greeshoff y Doy 1972)
- MS (Murashige y Skoog 1962)

#### **MEDIO DE GRESSHOFF y DOY**

##### **Solución mineral A:**

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O \_\_\_\_\_ 45

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> _____	15
KCl _____	150
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> _____	100
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O _____	125
KNO <sub>3</sub> _____	500
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O _____	75
KI _____	0,375

Cantidades expresadas en mg/100ml

### **Solución mineral B:**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> _____	150
KNO <sub>3</sub> _____	500
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> _____	500
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> _____	173,5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O _____	17,5
KCl _____	32,5
KI _____	0,4

Cantidades expresadas en mg/100ml

### **Quelato de Hierro:**

FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O _____	0,0278
EDTA-Na <sub>2</sub> _____	0,0372

Cantidades expresadas en gr/5ml

---

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Solución de Vitaminas x10:

A.Nicotínico _____	1
Thiamina _____	10
Piridoxina _____	1
Myoinositol_____	100
Glycina_____	4

Cantidades expresadas en mg/10ml

### Solución de Macronutrientes x1000:

MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O _____	1120
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> _____	310
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O _____	430
Na <sub>2</sub> MOO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O_____	13
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O _____	1,3
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O _____	1,3

Cantidades expresadas en mg/100ml

### Solución de Hormonas:

	NAA	Kinetina
DBM1_____	2 _____	5
DBM2_____	2 _____	1
DBM3_____	5 _____	0,01

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

DBM2 , 2 \_\_\_\_\_ 0 , 1 \_\_\_\_\_ 0  
DBM2 , 3 \_\_\_\_\_ 0 , 1 \_\_\_\_\_ 2  
DBM2 , 4 \_\_\_\_\_ 5 \_\_\_\_\_ 2  
DBM2 , 5 \_\_\_\_\_ 8 \_\_\_\_\_ 0 , 1

Cantidades expresadas en mg/l.

### **Composición total del medio:**

Componentes	DBMI	DBMII
Sol. mineral	200 (A)ml	200(B)ml
Vitaminas	10 ml	10ml
Quelato de Hierro	5 ml	5ml
Sol. microelementos	1 ml	1 ml
Agar	8 gr	8 gr
Sacarosa	20 gr	20 gr

Volumen total de medio 1 litro, pH= 5,8-6,4

## MEDIO DE CULTIVO DE MURASHIGE y SKOOG

### **Solución de Macronutrientes:**

$\text{NH}_4\text{NO}_3$  \_\_\_\_\_ 3 , 3



---

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

KNO <sub>3</sub> _____	3,8
Cl <sub>2</sub> Ca.2H <sub>2</sub> O _____	0,88
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O _____	0,74
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> _____	0,34

Cantidades expresadas en gr/100ml

### Solución de Micronutrientes (x10):

KI _____	0,166
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> _____	1,24
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O _____	4,46
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O _____	1,72
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O _____	0,05
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O _____	0,005
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O _____	0,005

Cantidades expresadas en gr/100ml

### Solución de Hierro

FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O _____	0,0278
EDTANa <sub>2</sub> _____	0,0373

Cantidades expresadas en gr/5ml

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

### **Solución de Vitaminas:**

Myoinositol \_\_\_\_\_ 0,2  
Ac. Nicotínico \_\_\_\_\_ 0,001  
Piridoxina ClH \_\_\_\_\_ 0,001  
Thiamina ClH \_\_\_\_\_ 0,004  
Cantidades expresadas en gr/10ml

### **Composición del hormonas en el medio:**

Hormonas	MSA	MSB
NAA	2mg/l	2mg/l
Kinetina	5mg/l	1mg/l

Las hormonas utilizadas en ambos casos han sido NAA y Kinetina en las concentraciones siguientes:

NAA	Kinetina
2mg/l	1mg/l
2mg/l	5mg/l
8mg/l	5mg/l
0,1mg/l	0mg/l

El pH del medio fue ajustado a 5,8-6. los cultivo se mantuvieron a 25°C y oscuridad durante un período de ocho semanas, pasadas las cuales se cambiaron

las condiciones a 25°C y luz con fotoperíodo dieciseis horas.

Paralelamente al cultivo, se tomaron anteras para su estudio mediante microscopia óptica, con la finalidad de controlar el estadio en que se encuentran las anteras cuando se realiza el cultivo.

### **3.2.2- PROCESAMIENTO CONVENCIONAL DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN:**

El material que va a ser observado a microscopia electrónica necesita ser sometido a una serie de tratamientos previos para conseguir que las estructuras celulares se mantengan con la misma forma y características que cuando están vivas. Para ello es imprescindible determinar las condiciones óptimas de fijación e inclusión, teniendo en cuenta los diferentes parámetros que van a ser decisivos para la obtención de buenos resultados. Estos factores a tener en cuenta son: concentración del fijador, molaridad de la solución tampón, pH, temperatura, tiempo etc. En nuestro laboratorio ya han sido obtenidas previamente las pautas necesarias a seguir en el procesamiento del material objeto de este estudio, las anteras. El preparado de las muestras se realiza siguiendo una serie de pasos que podemos agrupar en las siguientes etapas:

**Fijación Química** - Para ello utilizamos una solución de **glutaraldehído** al 3%, el cual está comercializado con una riqueza del 25%. Esta solución se prepara en tampón **cacodilato** 0,025M a un pH=6,9.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

PREPARACIÓN DEL TAMPÓN CACODILATO: diluir 2,675gr de cacodilato sódico en 500 ml de agua destilada.

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN FIJADORA: diluir 3ml del glutaraldehído al 25% en 22ml de Tampón.

Se cortan las piezas del tamaño aproximado de  $1\text{mm}^2$  y se introducen en el fijador durante cuatro horas. Para eliminar el fijador, una vez pasado el tiempo correspondiente, se introducen las muestras en tampón cacodilato durante una hora dando tres lavados de aproximadamente veinte minutos cada uno.

Para mejorar la fijación anteriormente realizada (prefijación), sometemos el material a una Postfijación.

La **Postfijación** se realiza con **tetróxido de osmio ( $\text{O}_4\text{Os}$ )** al 1% en tampón cacodilato 0,025M.

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PARA LA POSTFIJACIÓN: diluir 0,1gr de tetróxido de osmio en 10ml de tampón.

Es necesario que tanto la ampolla que contiene al osmio como el recipiente donde se va a preparar la solución estén muy limpios sin ningún resto de suciedad ya que de lo contrario se facilitaría la oxidación del osmio, disminuyendo su actividad fijadora. Previamente a la disolución de este en el tampón mantenemos la ampolla, ya limpia, dentro de la estufa a unos  $60^\circ\text{C}$  durante dos o tres minutos. De esta manera el osmio pasa de estar cristalizado a estar líquido con lo que al disolverlo dentro del tampón se mezclan mejor. La solución de osmio debe resguardarse de

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

la luz, en recipiente opaco, para evitar la oxidación.

Las muestras permanecen en esta solución durante una hora, pasada la cual procedemos a un nuevo lavado en el tampón. Generalmente mantenemos las muestras lavando durante toda la noche.

En ocasiones se omite la postfijación de las muestras con osmio cuando así lo requiere el posterior tratamiento citoquímico.

**Deshidratación**- Es necesaria para eliminar el agua de los tejidos ya que la resina que posteriormente utilizaremos es hidrofóbica. Dependiendo del tipo de resina que vayamos a usar realizaremos este paso bien en alcohol (cuando las resinas utilizadas son Epón o Araldit), o bien en acetona (para las resinas Spurr o Araldit). Los tiempos para ambas son los mismos.

alcohol/acetona 30% \_\_\_\_ 1 hora

alcohol/acetona 50% \_\_\_\_ 1 hora

alcohol/acetona 70% \_\_\_\_ noche

alcohol/acetona 90% \_\_\_\_ 1 hora

alcohol/acetona 100% \_\_\_\_ 3 horas

La deshidratación se hace de esta forma gradual para que no haya cambios bruscos que puedan alterar la estructura.

El material todavía no está preparado para la inclusión, primeramente es necesario hacer unos pases intermedios en óxido de propileno. Este compuesto es un agente deshidratante muy fuerte que elimina los restos de alcohol que quedan dentro del

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

material y además es un buen disolvente de la resina. Primero damos un pase de unos cinco minutos de mezcla alcohol/óxido de propileno 1:1 de manera que el cambio no sea brusco, para después pasar a óxido puro durante treinta minutos.

**Imbibición**- De igual manera que la deshidratación también debe hacerse de forma gradual. Para ello y dependiendo de la resina, hacemos las mezclas:

EPON - óxido de propileno/Epón 1:1\_\_\_\_\_45 minutos

ARALDITE- óxido de propileno/Araldite 1:1\_\_45 minutos

SPURR- óxido de propileno/Spurr 1:1\_\_\_\_\_45 minutos (opcional)

### PREPARACIÓN DE LAS RESINAS:

#### EPON:

Mezcla A\_\_\_\_\_40 gr  
Mezcla B\_\_\_\_\_60 gr  
DMP-30 (acelerador)\_\_\_\_\_1,8 gr

Mezcla A: Epón Epikote 812\_\_\_\_\_15,5 gr  
          Anhídrido dodecenil succinato (DDSA)\_\_25 gr  
Mezcla B: Epón Epikote 812\_\_\_\_\_50 gr  
          Anhídrido Metil Nádic (MNA)\_\_\_\_\_44,5 gr

#### ARALDITE:

MY 753\_\_\_\_\_49 gr  
DDSA\_\_\_\_\_49 gr  
BDMA\_\_\_\_\_1,5 gr  
Dibutylphthalate\_\_\_\_\_2,7 gr

---

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

SPURR:

ERL 4206	2,23 gr
DER 736	1,33 gr
NSA	6,30 gr
S-1	0,13 gr

Por último mantenemos las muestras en resina pura durante un período de veinticuatro o cuarenta y ocho horas, dentro del frigorífico.

**Inclusión**- las muestras de dimensiones muy pequeñas (de 1 a 2mm), se incluyen en resina la cual al polimerizar nos permite tener un material de mayor dureza y de mayor tamaño lo cual facilita su manipulación en el tallado y corte. Se realiza en cápsulas de gelatina o bien en moldes de silicona. Antes de la inclusión sometemos las muestras a una temperatura de 37°C durante dos horas. Introducimos las piezas en las cápsulas debidamente etiquetadas, las orientamos dentro de estas, finalmente rellenamos toda la cápsula de resina y mantenemos las piezas ya incluidas en estufa a 60°C durante cuarenta y ocho horas para que la resina polimerize.

De todas las resinas utilizadas, la que menos problemas ha presentado es el Epón, en cuanto ha facilidad de corte y resistencia a los electrones.

**Precauciones**: Dado el alto riesgo que presentan la mayoría de los reactivos utilizados en la preparación de muestras para microscopia electrónica, se aconseja tomar las medidas necesarias como son: trabajar siempre bajo campana extractora de gases, utilización de guantes y mascarilla y procurar que haya una buena ven-

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

tilación en el laboratorio. Por otra parte es importante recoger los residuos y almacenarlos adecuadamente para ser eliminados como sustancias nocivas y no biodegradables que son.

### 3.2.3- TALLADO DE LA PIEZA, CORTE, RECOGIDA DE LAS SECCIONES Y TINCIÓN

Una vez polimerizada la resina procedemos al **tallado** de la pieza para facilitar la realización de las secciones. Este consiste en la formación de una pirámide cuya base tiene la forma de un trapecio y contiene la muestra, en nuestro caso la antera. Los **cortes** se realizaron con un ultramicrotómo "Ultracut E" Reichert Jung. Para ello se utilizaron cuchillas de vidrio obtenidas con un ángulo de 45°, sobre las que se prepara una pequeña balsa de agua. Ocasionalmente también se utilizó cuchilla de diamante. Los cortes obtenidos quedan flotando sobre la balsa de donde son **recogidos** por contacto con la rejilla. Las rejillas son de cobre y generalmente de 400 orificios de malla, aunque en ocasiones se realizan técnicas específicas que necesiten rejillas de características especiales (oro, platino o níquel) y con otro tamaño de malla . Los cortes realizados suelen ser de un grosor de 60-80nm y de color plateado.

La **tinción** de las rejillas para incrementar el contraste de los cortes, se hace con acetato de uranilo y citrato de plomo, según describe Reynold (1963). En una placa de porcelana y con cuidado de mantener total oscuridad ponemos las rejillas sobre una gota de acetato de uranilo al 5% en agua destilada. Mantenemos la



## MATERIAL Y MÉTODOS

rejilla en esta solución durante veinticinco minutos. Posteriormente lavamos durante cinco minutos en agua destilada, la cual cambiamos varias veces. Una vez secas las rejillas procedemos a la segunda fase de esta tinción. Esta se debe realizar en un ambiente alcalino para evitar la presencia de  $\text{CO}_2$  el cual provoca la precipitación del plomo. Para ello ponemos las rejillas sobre unas gotas de citrato de plomo dentro de una caja de Petri y rodeadas de lentejas de sosa. Mantenemos los cortes en esta solución durante un período que puede variar entre cinco y diez minutos dependiendo de la edad de la solución, necesitando más tiempo conforme es más vieja. Las rejillas se vuelven a lavar durante cinco minutos con agua destilada.

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE CITRATO DE PLOMO: en 25ml de agua bidestilada disolver

$(\text{NO}_3)_2\text{Pb}$  (nitrato de plomo) \_\_\_\_\_ 1,33 gr

Citrato trisódico + 2  $\text{H}_2\text{O}$  \_\_\_\_\_ 1,67 gr

Agitar fuertemente durante un minuto y dejar reposar durante media hora. Añadir 8 ml de NaOH 1N.

Completar hasta 50 ml con agua bidestilada.

### 3.2.4- ESTUDIO DE CORTES AL MICROSCOPIO ÓPTICO Y MICROSCOPIO ELECTRÓNICO

A primera vista se determinó el grado de desarrollo de la antera según el tamaño de la misma. Pero para conocer exactamente el estadio de desarrollo del grano de polen, se procedió a su observación de cortes semifinos de 1 micra de espesor.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

Para esta observación se utilizó como colorante azul de metileno. Se utilizó un fotomicroscopio óptico Zeiss Standard equipado con una cámara modelo M35 y un exposímetro MC-63.

Las rejillas con cortes ultrafinos se han observado en un microscopio electrónico de transmisión ZEISS modelo EM 10C.

### **3.2.5- DETERMINACIÓN DE POLISACÁRIDOS**

#### **3.2.5.1- TEST DEL ÁCIDO PERIÓDICO-TIOSEMICARBACIDA-PROTEINATO DE PLATA (Thiery)**

El test de Thiery (1967) es un procedimiento ya clásico en microscopia electrónica para la determinación de polisacáridos en especímenes biológicos. Se trata de una adaptación de la reacción de Schiff para microscopia óptica. Con ella se produce el paso de los radicales alcohólicos (uniones 1,2-glicol existentes dentro de las moléculas de los azúcares) a radicales aldehídos libres mediante oxidación utilizando el ácido periódico. Los grupos aldehídos reaccionan con la tiosemicarbácida, la cual se puede visualizar haciéndola reaccionar con una sal de elevado peso molecular como es el proteinato de plata, resultando como producto de la reacción un precipitado electrodenso indicativo de la presencia de azúcares. La ventaja de esta reacción es que se hace sobre secciones ultrafinas ya recogidas en las rejillas, siendo así un procedimiento más fácil y rápido que cuando la reacción

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

se realiza en bloque. Tiene poco ruido de fondo por lo que se puede considerar como una reacción bastante específica. Sin embargo tiene el inconveniente de que no permite distinguir diferentes tipos de polisacáridos entre sí.

Para realizar esta técnica usamos muestras sometidas a un procesamiento convencional para microscopia electrónica, como la anteriormente citada, salvo que en este caso la fijación se realiza sólo con glutaraldehído (en el caso de que la muestra elegida hubiese sido postfijada, el osmio se elimina incubando las rejillas con los cortes en una solución de  $H_2O_2$ ).

Una vez obtenidas las secciones se recogen en rejillas que no sean de cobre y las sometemos al siguiente protocolo:

- 1- Incubación de la rejilla sobre una gota de ácido periódico al 1% durante aproximadamente veinte a treinta minutos.
- 2- Lavado en agua bidestilada mantenida en agitación durante cinco minutos.
- 3- Mantener las rejillas sobre una gota de la solución de tiosemicarbazida al 1% en ácido acético al 10% durante 30 minutos.
- 4- Lavamos en diferentes soluciones:
  - a) ácido acético al 10% durante cinco minutos
  - b) agua bidestilada cinco minutos.

Ambos lavados se hacen en agitación.

- 5- Las rejillas se incuban sobre una gota de proteinato de plata al 1% en agua destilada durante treinta minutos. Este último paso se realiza totalmente en oscuridad para evitar la oxidación de la solución de plata por la luz.
- 6- Finalmente lavamos en agua bidestilada y en agitación.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

**Control:** omitir la solución de tiosemicarbazida o la incubación con ácido periódico.

### **3.2.5.2- TÉCNICA DEL ÁCIDO FOSFOTÚNGSTICO PARA LA LOCALIZACIÓN DE GLICOPROTEINAS Y POLISACÁRIDOS ÁCIDOS**

Esta técnica ha sido utilizada por numerosos autores tanto en tejido animal (Pease 1966, 1970; Rambourg 1971; Marinozzi 1968), como en tejidos vegetales (Roland y col. 1973). Las muestras han sido procesadas de forma convencional (sin postfijación) e incluidas en Epón. Se mantienen las rejillas durante dos horas sobre una gota de la solución acuosa de ácido fosfotúngstico al 5% con pH=7 para ser finalmente lavadas en agua. Se pueden utilizar rejillas de cobre

### **3.2.6- TINCIÓN REGRESIVA DEL EDTA (ácido Etilen-diamino-tetracético) PARA DETERMINACIÓN DE RIBONUCLEOPROTEINAS.**

Utilizando esta tinción (Bernhard 1969) se tiñen de forma preferencial las ribonucleoproteínas, siendo aplicable en cortes que van a ser observados al microscopio electrónico. Para llevarla a cabo, las muestras son fijadas y procesadas siguiendo los métodos convencionales, siendo la fijación sólo en glutaraldehído al 3%. En la tinción habitual introducimos un paso nuevo manteniendo las rejillas en una solución de EDTA. Los cortes son recogidos en rejillas de cobre y posterior-

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

mente se procesan de la manera siguiente:

- 1- Solución de acetato de uranilo al 5% durante quince minutos.
- 2- Lavado en agua bidestilada en agitación durante dos o tres minutos
- 3- Tinción con una solución 0,2M de EDTA durante períodos que van de cinco a cuarenta y cinco minutos (en nuestro material el tiempo óptimo es de diez a quince minutos).
- 4- Lavado, de nuevo, en agua bidestilada.
- 5- Tinción con citrato de plomo durante cinco minutos.
- 6- Lavado en agua bidestilada y en agitación durante dos o tres minutos.
- 7- Dejar secar la rejillas antes de su observación.

### PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE EDTA 0,2M

Añadimos 0,93 gr de EDTA a 10ml de agua bidestilada. Agitamos la solución, a la cual vamos constantemente midiendo el pH. Añadimos gota a gota solución de NaOH 1N de manera muy lenta hasta que el pH es aproximadamente 6,5. Agitamos durante unos cinco minutos de manera que la solución se homogenice totalmente. Poco a poco añadimos gotas de la solución de sosa hasta que el pH es de 7. Este paso es muy delicado por lo que hay que añadir la sosa en cantidades muy pequeñas puesto que fácilmente el pH puede sufrir un cambio brusco.

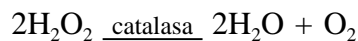
## MATERIAL Y MÉTODOS

---

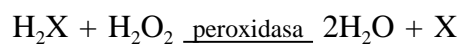
### 3.2.7- LOCALIZACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PEROXIDASA Y CATALASA.

#### 3.2.7.1- TINCIÓN CITOQUÍMICA CON 3, 3'-DIAMINOBENZIDINA (DAB)

En general, las catalasas y peroxidasas son enzimas responsables de la catálisis del peróxido de hidrógeno hasta agua. Las catalasas actúan produciendo la catálisis del peróxido de hidrógeno hasta agua y oxígeno molecular sin la necesidad de otros donadores de electrones.



Las peroxidasas catalizan la misma reacción pero para ello necesitan utilizar otros donadores ( $\text{H}_2\text{X}$ ) de electrones diferentes al agua oxigenada.



En estas reacciones citoquímicas el substrato DAB es oxidado en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Una vez la DAB ha sido oxidada y al unirse al tetróxido de osmio forma un precipitado denso a los electrones fácilmente visible a microscopia electrónica. Mediante la técnica de la 3,3'-diaminobenzidina (Müller y Beckman 1978) se quiere demostrar si existe actividad catalásica y/o peroxidasa en el citoplasma de los granos de polen maduro. El material es solamente prefijado en glutaraldehído

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

al 3% en tampón fosfato 50mM pH=6,8 durante dos horas. Eliminamos el exceso de glutaraldehído por medio de lavados con el mismo tampón.

A partir de este momento las muestras seguirán tres procesamientos diferentes según sean:

Muestras problema- incubación con DAB más  $H_2O_2$

Control de peroxidasas (I)- incubación en medio con DAB pero sin  $H_2O_2$ .

Control de catalasa (II)- añadir al medio de incubación (DAB más  $H_2O_2$ ) un inhibidor de la catalasa: 3-amino-1,2,4-triazol,(AT).

1- Las muestras son primeramente lavadas con tampón fosfato 50mM pH=6,8 durante treinta minutos.

2- **Preincubamos** el material de manera que:

a- muestras problema y control I) son mantenidas en una solución de DAB en tampón tris-ClH 50mM pH=9. A temperatura ambiente y durante una hora

b- muestras control II) son mantenidas en DAB en tampón tris-ClH 50mM pH=9 con 50mM de AT. Temperatura ambiente y durante una hora.

3- **Incubación:**

a- problema: dos horas a 37°C en solución de DAB más  $H_2O_2$  al 0,1% en tampón tris-ClH, pH=9

b- Control I) dos horas a 37°C en solución de DAB en tampón tris-ClH, pH=9.

c- Control II) dos horas a 37°C en solución de DAB más  $H_2O_2$  al 0,1% más AT 50mM en tampón tris-ClH, pH=9.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

4- Las muestras son lavadas en tampón fosfato 50mM durante media hora a temperatura ambiente.

5- Postfijación con tetróxido de osmio al 1% en tampón fosfato 50mM.

Continuamos con el procedimiento convencional de preparación de muestras para microscopia electrónica. La inclusión se realizó en Epón.

### **3.2.7.2- TÉCNICAS DEL CERIO $Cl_3Ce$**

Estas técnicas han sido anteriormente utilizadas en tejido animal (Arnold, G. y col. 1979, 1980; Angermüller y col. 1986a,b). Realizamos esta citoquímica con objeto de comprobar si las enzimas oxidasas y catalasas se localizan en los mismos lugares. Las enzimas estudiadas han sido:

- $\alpha$ OH-oxidasa
- D-amino oxidasa
- Xantina oxidasa.

#### **1- Fijación:**

- $\alpha$ OH oxidasa y D-aminoxidasa: cuatro horas en glutaraldehído 3% en tampón cacodilato 0,1 M pH=7,4 con 0,25% de  $Cl_2Ca$  y 1% de Sacarosa.

- Xantina oxidasa: glutaraldehído 2,5% en Pipes 0,1M pH=7,4 con 2% de sacarosa durante dos horas.

#### **2- Lavado:**

en el mismo tampón utilizado en la fijación durante tres períodos de veinte minutos cada uno.



### 3- **Preincubación:**

-  $\alpha$ OH oxidasa y D-amino oxidasa: treinta minutos a 37°C en la solución formada por: 0,1mM amino triazol (AT) más 5mM CeCl<sub>3</sub> en tampón tris maleato 0,1M pH=7.

- Xantina oxidasa: treinta minutos a 37°C en tampón Pipes 0,1M pH=7,8 más 3mM de CeCl<sub>3</sub> y 100mM de NaN<sub>3</sub>.

### 4- **Incubación:**

-  $\alpha$ OH oxidasa: la misma solución anterior pero en este caso le hemos añadido como sustrato ácido valérico 50mM ó ácido glicólico 50mM. Se realiza a una temperatura de 37°C y durante el tiempo de una hora.

- D-amino oxidasa: a la solución de 0,1mM AT más 5mM CeCl<sub>3</sub> con 50mM de D-Prolina en tampón tris maleato 0,1M pH=7,5 durante una hora a 37°C.

- Xantina oxidasa: una hora a 37°C en una solución igual a la anterior pero con adición del sustrato (xantina) en una concentración de 0,1mM.

### 5- **Lavados:**

tampón cacodilato 0,1M pH=6 durante veinte minutos para eliminar los restos de Ce(OH)<sub>3</sub>.

-tampón cacodilato 0,1M pH=7,4 durante veinte minutos (noche).

### 6- **Postfijación e inclusión:**

según los procedimientos convencionales.

### **Controles:**

- $\alpha$ OH oxidasa: se incuban en un medio sin sustrato (ácido valérico, ácido glicólico).

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

-D-amino oxidasa: no son sometidas a la incubación con D-prolina (sustrato).

- Xantina oxidasa: incubación sin sustrato (Xantina).

### **3.2.7.3- INMUNOLocalIZACIÓN DE PEROXIDASAS**

Con objeto de comprobar la presencia de enzimas peroxidásas en el grano de polen, hemos recurrido a técnicas inmunocitoquímicas. Al no disponer de anticuerpos obtenidos por nosotros mismos, que sería lo más recomendable, hemos recurrido a utilizar anticuerpos comerciales. sólo hemos podido contar con un anticuerpo antiperoxidasa, no siendo posible la inmunolocalización de catalasas.

Peroxidasa: Utilizamos un anticuerpo policlonal comercial antiperoxidasa (Sigma).

El antisuero ha sido desarrollado en cabra usando peroxidasa de rábano como inmunógeno. El marcado con oro se realizó con un segundo anticuerpo desarrollado en conejo contra inmunoglobulina de cabra y que se encuentra unido a partículas de oro coloidal de tamaño de 10nm.

Para evitar en lo más posible el marcado inespecífico, utilizamos albúmina de suero bovino (BSA) en concentraciones de 0,1%; 0,2%; 1%, diluida en frío en tampón PBS (Fosfato Buffer Salino) con 0,2% de Tween 20 (PBST).

El protocolo seguido consta de los siguientes pasos:

1- Primeramente mantenemos las rejillas durante un minuto en agua bidestilada y filtrada con la finalidad de que se humedezcan.

2- **Preincubación** durante una hora a temperatura ambiente en PBST pH=7,4 con 0,1% BSA.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

3- **Incubación** con el primer anticuerpo (antiperoxidasa), diluido en tampón PBST con 0,1% de BSA, durante una hora a 37°C. Las diluciones utilizadas han sido : 1:1; 1:200; 1:1000; 1:2000. La concentración inicial del anticuerpo puro es de 37,6 mg/ml.

4- **Lavar** a temperatura ambiente con objeto de eliminar los restos de anticuerpo que puedan existir en la rejilla. Para ello utilizamos tres soluciones de tampón PBS con concentraciones crecientes de BSA:

a- lavado de treinta minutos en tampón PBS pH=7,4

b- Tres lavados de quince minutos en tampón PBS

con 0,2% de BSA.

c- Dos lavados de cinco minutos en tampón PBS pH=7,4 con 1% de BSA.

5- **Incubación con el segundo anticuerpo** marcado con oro coloidal. Este anticuerpo se diluye igualmente en PBST con 1% de BSA. Las diluciones probadas son: 1/10; 1/9; 1/50. La incubación se realiza durante una hora a una temperatura de 37°C.

6- **Lavar** para arrastrar todos los restos que quedan de este segundo anticuerpo. Los lavados se realizan con el mismo tampón PBS con distintas concentraciones de BSA:

a- Seis lavados de cinco minutos en PBST pH=7,4

con 0,2% de BSA

b- Seis lavados de cinco minutos en PBS pH=7,4

c- Un lavado de cinco minutos en agua bidestilada y filtrada.

7- **Contrastar** las rejillas con acetato de uranilo al 5% durante veinte minutos y con citrato de plomo cinco minutos.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

Esta técnica se realiza sobre cortes recogidos en rejillas de Níquel.

### **Controles:**

- 1- Para controlar la especificidad del primer anticuerpo se sustituye este por suero preinmune.
- 2- Para controlar la especificidad del segundo anticuerpo se omite la incubación con el primer anticuerpo y se mantienen en tampón PBST con 0,1% de BSA.
- 3- La comprobación de la existencia de marcaje en otros tejidos de la antera nos puede dar idea del grado de especificidad del primer anticuerpo.

PREPARACIÓN DEL TAMPÓN PBS: a 900 ml de agua bidestilada y filtrada añadir:

- 1,85 gr de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,43 gr de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 7,2 gr de  $\text{ClNa}$
- Disolver mediante agitación. Ajustar  $\text{pH}=7,4$  con  $\text{ClH}$  1N ó  $\text{NaOH}$  1N. Enrasar hasta 1000ml.

### **3.2.8- ESTUDIO DE ELEMENTOS INORGÁNICOS EN LA PARED DEL POLEN**

#### **3.2.8.1- TÉCNICA DEL PIROANTIMONIATO POTÁSICO**

Esta técnica es utilizada para la detección de cationes inorgánicos del tipo de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$  y cationes orgánicos como es el  $-\text{NH}_3$  (Clark y Ackerman 1971). El

---

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

resultado es la aparición de un precipitado en la zona donde se encuentra alguno de estos cationes. Es una técnica genérica ya que no nos sirve para identificar la naturaleza de los diferentes tipos de cationes existentes, siendo necesario recurrir al microanálisis de rayos-X para identificar los elementos presentes en la muestra.

**Fijación** durante dos horas en una solución de piroantimoniato-Osmio al 1%.

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN FIJADORA:

tomar 10ml de una solución de piroantimoniato potásico al 5% en agua (0,1M) calentar hasta ebullición para que se disuelva. Añadir agua hasta restaurar el volumen inicial de la solución de piroantimoniato. Tomar 10ml de una solución de tetróxido de osmio al 2% en agua. Mezclar ambos volúmenes. Ajustar pH=7,5.

**Lavado** de las muestras en una solución de sacarosa al 6% dando tres pases de veinte minutos.

**Deshidratación** en series de alcoholes.

**Imbibición e inclusión en resina** siguiendo el método convencional. Inclusión en EPON.

### **3.2.8.2- PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROANÁLISIS DE RAYOS X AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO**

Para esta técnica utilizamos material fijado de dos formas diferentes:

-**Fijación química** con glutaraldehído al 3% y manteniendo posteriormente

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

las piezas en tampón hasta que vayan a ser utilizadas.

-**Fijación Física** por introducción del material vegetal directamente en nitrógeno líquido.

El material fijado por métodos químicos y mantenido en tampón cacodilato hasta un día antes de su observación, en el que se procede a su deshidratación. La deshidratación se realiza con series graduales de acetonas (30%, 50%, 70%, 90%) durante un tiempo de treinta minutos cada una. Posteriormente se mantiene durante una hora en acetona pura.

Una vez terminada la deshidratación, las muestras se pasan por acetato de amilo durante un tiempo que puede variar desde diez minutos hasta un día, aunque normalmente se mantuvo durante media hora. Para finalizar el proceso el material es sometido al punto crítico (procedimiento en el que el material se mantiene en una atmósfera de CO<sub>2</sub> con una presión y temperatura adecuadas para que el CO<sub>2</sub> esté en estado líquido. Con este paso realizamos la extracción de los restos de agua que quedan en el tejido).

Las muestras fijadas por métodos físicos son adheridos al portamuestras de carbón mediante grafito coloidal y posteriormente sometidas durante cuarenta y ocho horas a una desecación en frío o "freeze-dryer" (cuyo fundamento es el mismo que el del punto crítico).

Finalmente las muestras son metalizadas con una fina capa de oro.

El análisis se realizó con un microscopio electrónico de barrido PHILIPS 505 dotado de un analizador de energía dispersiva de Rayos X, utilizando una tensión de 18Kv.

### **3.2.9- PASO DE MATERIAL A TRAVÉS DE PAREDES CELULARES**

#### **3.2.9.1- TÉCNICA DEL NITRATO DE LANTANO COMO ELEMENTO TRAZA**

Esta técnica fue utilizada por Revel y Karnovsky para detectar superficies celulares y posibles vías de paso de sustancias hacia el interior de la célula. Para ello se añade al fijador un elemento traza como es el nitrato de lantano el cual debido a su elevado peso molecular aparece como un precipitado electrodensito. El protocolo a seguir es:

**Fijación** en una solución de glutaraldehído 3% con 1% de nitrato de lantano en tampón cacodilato 0,025M, pH=6,8, durante cuatro horas.

**Lavado** en tampón cacodilato 0,025M dando tres pases de veinte minutos cada uno.

**Postfijación** en una solución de tetróxido de osmio al 1% más 1% de nitrato de lantano en tampón cacodilato 0,025M, pH=6,9, durante dos horas.

**Lavado** en el mismo tampón durante tres pases de veinte minutos cada uno.

**Deshidratación** en series de alcoholes siguiendo el método convencional.

**Imbibición e Inclusión** en resina Epón siguiendo igualmente el método convencional.

PREPARACIÓN DEL FIJADOR:

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

Tomar 1ml de gutaraldehido 25% y añadir 9ml de tampón cacodilato 0,025M. A estos 10ml agregar 0,1 gr de nitrato de lantano.

### PREPARACIÓN DEL POSTFIJADOR:

Tomar 0,1gr de tetróxido de osmio añadir 10ml de tampón tenemos así una solución de tetróxido de osmio al 1%. A esta solución añadir 0,1gr de nitrato de lantano.

### **3.2.9.2- INCORPORACIÓN DEL LANTANO AL MEDIO CULTIVO DE GRANOS DE POLEN.**

En el caso de polen maduro, se pensó en incorporar el elemento traza en un medio de cultivo apropiado. El material utilizado para esta experiencia fueron anteras de tomate *Lycopersicon esculentum* de un tamaño aproximado de 8mm. Esta anteras contenían polen en el estadio de polen bicelular maduro.

Como medio de cultivo se utilizaron dos medios diferentes:

- MR26 (Benito Moreno y col. 1988)
- GK (Benito Moreno y col. 1988)

### **MEDIO MR26**

- Macroelementos del medio Murashige y Skoog\_\_\_\_10ml
- Microelementos del medio Murashige y Skoog\_\_\_\_100µl
- Glutamina \_\_\_\_\_44mg



## MATERIAL Y MÉTODOS

- Inositol \_\_\_\_\_ 10mg
- Agua de coco \_\_\_\_\_ 2ml
- Lactoalbúmina hidrosalato \_\_\_\_\_ 100mg
- Sacarosa \_\_\_\_\_ 17,12gr

El volumen final es de 100ml, pH=7.

nota: la composición de macro y micro elementos de Murashige y Skoog se encuentra en el apartado de cultivo "in vitro" de anteras.

### MEDIO GK

- $H_3BO_3$  \_\_\_\_\_ 200
- $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  \_\_\_\_\_ 300
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  \_\_\_\_\_ 200
- $KNO_3$  \_\_\_\_\_ 100
- Sacarosa \_\_\_\_\_ 1000

Las cantidades están expresadas en mg/l, pH=5,9.

Una vez preparado el medio donde se va a realizar el cultivo, se añadió el nitrato de lantano (antes de medir el pH) en una concentración del 1%.

Las anteras fueron diseccionadas de la flor y cortadas en varias partes. Se cultivaron aproximadamente 10 anteras por cada 2ml de medio. Una vez que las anteras se encontraban en el medio fueron aplastadas con ayuda de una varilla de vidrio de manera que el polen quede suelto. Posteriormente fueron centrifugadas

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

a 4000rpm durante dos minutos y separamos los restos de antera quedando sólo el polen suelto.

El tiempo que se mantuvo el polen en cultivo fue variable, siendo de una, dos, tres, cuatro y dieciocho horas. Se mantuvieron a 25°C y en oscuridad.

Una vez transcurrido el tiempo de cultivo el polen fue centrifugado, eliminamos el sobrenadante y añadimos glutaraldehído al 3% en tampón cacodilato 0,025M, pH=6,9. El polen se fijó durante cuatro horas. Posteriormente el material fue incluido en agar para continuar con la postfijación, deshidratación e inclusión en EPON.

**Control:** se realizaron cultivos de polen con los mismos tiempos pero en un medio que **no** contenía nitrato de lantano.

El material fue observado primeramente sin ningún tipo de tinción y más tarde con tinción uranilo-plomo.

## ***Capítulo 4: Resultados***

### **4.1- CULTIVO DE ANTERAS *in vitro***

En experiencias realizadas con objeto de poner a punto la metodología para la obtención de haploides se realizaron experiencias con anteras de tomate *Lycopersicum esculentum* Miller.

A la hora de realizar un cultivo hay que tener en cuenta una serie de factores, como pueden ser: genotipo, variedad y especie del donador además de las condiciones de crecimiento del individuo donador (temperatura, luz).

Los medios utilizados fueron dos: DBM y MS. Las concentraciones óptimas de hormonas fueron: 2mg/l NAA y 5 ó 1mg/l de kinetina.

Las anteras seleccionadas para el cultivo fueron variables en tamaño y estadio.

## **RESULTADOS**

---

Como es sabido, existe una relación entre tamaño y estadio de desarrollo de la microspora. Aquellos brotes menores de 4mm contenían anteras de unos 2mm y en estadios de CMP. Las anteras de brotes mayores de 6mm y de flores abiertas se encontraban en estadio de grano de polen. El tamaño y estadio óptimo en el que nosotros hemos conseguido resultados ha sido el de anteras de 3-4mm las cuales contenían microsporas. Estos resultados se obtuvieron, después de una semana en cultivo, pudiéndose observar las primeras diferencias: las anteras sufren un cambio de color volviéndose más claras. Al cabo de cuatro o cinco días, las anteras se hinchan (Lam. 3a) aumentando de tamaño hasta que la pared de la antera se rompe del todo y deja al descubierto una masa blanquecina que corresponde al callo (Lam. 3b). El resto de la antera se vuelve de un color marrón y acaba muriendo, mientras que el callo continúa creciendo (Lam. 3c). En algunas ocasiones la estructura (o callo) formada ha sido diferente a las demás, observándose en la antera una masa de apariencia arrosetada (Lam. 3d), resultado de la agrupación de estructuras o masas globulares. Estas estructuras globosas han sido separadas entre sí y se han cultivado aisladas con objeto de inducir diferenciación. Las condiciones de cultivo fueron de luz y a 25°C, reduciendo la concentración de hormonas, de 2mg/l a 0,1mg/l de NAA y no se añadió kinetina. El resultado final no fue el esperado, puesto que se produjo la muerte del tejido (callo) antes de que se presentara algún cambio aparente.

Por otro lado, también intentamos inducir diferenciación a partir de los callos iniciales y de apariencia amorfa. Una vez transcurrido un período de ocho semanas, los hemos cambiado de medio, el cual tiene los mismos componentes

minerales solo que hemos reducido la dosis de hormonas de 1mg/l a 0,1mg/l de NAA y hemos eliminado la kinetina. Paralelamente se cambiaron las condiciones del cultivo siendo estas de 25°C y luz con un fotoperíodo de 16 horas. Como resultado de este cambio observamos un aumento de tamaño del callo y lo más patente ha sido un cambio de color: al principio el callo se vuelve marrón oscuro para luego empezar a hacerse más claro (Lam. 3e), hasta que finalmente empezaron a aparecer zonas de color verde.

Podemos concluir que hemos obtenido callos utilizando ambos medios, pero sin llegar a conseguir embrioides. Sin embargo los callos obtenidos con el medio MS (Lam. 3f) se han desarrollado más y mejor que los obtenidos con el medio DBM. Durante un año se llevaron a cabo estas experiencias, sin llegar a conseguir ningún resultado positivo en la obtención de embrioides, por lo que nos pareció oportuno dirigir nuestro esfuerzo a profundizar en el conocimiento de las características celulares del polen durante su formación.

### **4.2- ESTUDIO DE LA ORGANIZACIÓN CELULAR DEL GRANO DE POLEN DURANTE SU FORMACIÓN**

#### **4.2.1- CARACTERES GENERALES**

La floración del tomate, en las condiciones naturales de nuestra región, abarca desde el mes de Junio hasta finales de Septiembre. Incluso si la temperatura no es

## **RESULTADOS**

---

demasiado baja, podemos encontrar fácilmente flores en los meses de Octubre-  
Noviembre. El tamaño del botón floral varía mucho durante su desarrollo. Los  
estadios de tetradas se localizan en brotes de 3 mm, los cuales contienen anteras  
de unos 2 mm de longitud, mientras que el polen maduro se encuentra en brotes  
de 7-8 mm, incluso llegando a alcanzar hasta 1 cm, con lo que las anteras ya son  
de un tamaño considerable.

Dentro de la misma inflorescencia no hay sincronía en cuanto al grado de  
desarrollo de las flores, de manera que en una misma inflorescencia podemos  
encontrar brotes de estadios diferentes. Incluso dentro de una misma flor tampoco  
se puede hablar de sincronía, aunque esta sí existe dentro de una misma antera.  
El estadio de tetradas, al igual que el polen binucleado medio son difíciles de  
encontrar lo cual nos sugiere que deben darse en un tiempo relativamente corto.  
Por el contrario son más fáciles de conseguir y por tanto de mayor duración, los  
estadios de polen bicelular con almidón y maduro. Por otra parte al ser el tomate  
una planta de polinización zoófila, el polen permanece íntimamente adherido a la  
antera hasta que es trasladado por el animal, por lo que siempre encontramos  
polen dentro de las anteras en mayor o menor cantidad. Esta fuerte adherencia que  
muestra el polen hace que sea difícil de obtener aislado.

### **4.2.2- FASES EN LAS QUE SE DIVIDE**

Como resultado de nuestros estudios hemos dividido el desarrollo y maduración del

grano de polen, en dos partes principales: **Microspora** y **Grano de polen**.

Las **Microsporas** son las células haploides procedentes de la división meiótica sufrida por las células madres del polen (CMP) diploides. Durante este período estas microsporas se preparan a través de una larga interfase para la división asimétrica que dará lugar al grano de polen propiamente dicho (Lam. 4a, b, c).

Para facilitar su estudio subdividimos este período en varios estadios:

- **Tetradas**
- **Microspora joven recién liberada**
- **Microspora media**
- **Microspora vacuolada**

**Grano de polen:** es el resultado de la mitosis asimétrica sufrida por la microspora. Durante su desarrollo tienen lugar diferentes cambios, todos ellos encaminados a su maduración (Lam. 4d, e, f), de manera que podemos distinguir:

- **Grano Bicelular joven**
- **Grano Bicelular medio**
- **Grano Bicelular maduro**

#### **4.2.2.1- TETRADAS**

Una vez terminada la meiosis, las cuatro microsporas resultantes se mantienen agrupadas por la pared de calosa formando una **Tetrada** (Lam. 5a). En secciones

## **RESULTADOS**

---

de tetradas del tomate, al igual que ocurre en el resto de las dicotiledóneas con división meiótica simultánea, sólo nos es posible observar tres de las cuatro microsporas, ya que siempre hay una situada en otro plano. En esta fase ya se inicia la formación de la pared del grano, perfilándose los elementos estructurales de la exina.

### **Citoplasma**

La joven microspora de una tetrada presenta un citoplasma propio de una célula poco diferenciada. El citoplasma contiene orgánulos poco diferenciados y presenta una población ribosómica relativamente baja si la comparamos con estadios más avanzados (Lam. 5b). Los **ribosomas** pueden agruparse formando polisomas preferencialmente junto al plasmalema (Lam. 6b). Esto ocurre de manera notable en las primeras fases de la formación de exina. También se observan bandas de **microtúbulos** muy cercanos al núcleo (Lam. 6b).

Los **Plastos** son fácilmente reconocibles por su forma ameboide y estroma muy denso, aunque no presentan ninguna estructura propia de plastidios diferenciados. Es frecuente la presencia de gránulos de material muy denso a los electrones en el estroma (Lam. 6a,b).

Las **Mitocondrias** de secciones redondeadas y tamaño muy inferior al de los plastos, presentan crestas largas y delgadas muy bien definidas (Lam. 6c). Es de destacar que ciertas mitocondrias muestran signos de degradación desapareciendo sus crestas y mostrando de forma gradual zonas más claras en su matriz (Lam. 6b, c).



El sistema de membrana, constituido por retículo y dictiosomas está escasamente representado. El **retículo endoplásmico (RE)** se encuentra en forma de cisternas muy cortas con ribosomas adosados a sus membranas. Los **dictiosomas**, poco numerosos, presentan de cuatro a cinco cisternas cortas y muy delgadas, con pocas vesículas en sus extremos, lo que indica una baja actividad (Lam. 6a).

También se observan **vesículas** de tamaño análogo al de las mitocondrias y de contenido translúcido a los electrones, con inclusiones de material denso en su interior (Lam. 6a, b, c).

### **Pared**

Al inicio de este estadio, el plasmalema de la microspora aparece en contacto directo con la pared de calosa. Conforme avanza la tetrada observamos los primeros depósitos de la primexina entre el plasmalema y la pared de calosa (Lam. 7b). Se trata de una capa muy delgada en la que se deposita un material denso (Lam. 7b, c, d) de aspecto y densidad similares al que observamos inmerso en la pared de calosa (Lam. 7b, d). Nos ha llamado la atención en esta fase la acumulación periférica de polisomas que forman a modo de una banda paralela al plasmalema (Lam. 7b, c, d). Estos polirribosomas determinan el lugar donde, en disposición perpendicular al plasmalema, se levantarán las procolumelas (probáculas). En este estadio es cuando se delimitan las zonas de la pared en donde más tarde se localizarán las regiones aperturales, las cuales se sitúan justamente en aquellas zonas en las que falta la primexina (Lam. 7c). También en este período quedan definidos las características estructurales de la exina del polen de

## **RESULTADOS**

---

tomate: procolumelas de una altura extremadamente pequeña, y el tectum que forma una continua y delgada capa dispuesta sobre las columelas y en contacto directo con la pared de calosa.

### **Núcleo**

Presenta las características de un núcleo interfásico con una o dos masas nucleolares (Lam. 6a). La cromatina se encuentra parcialmente condensada formando pequeñas masas densas localizadas preferencialmente en la periferia del núcleo (Lam. 8a). En el citoplasma adyacente al núcleo observamos masas de material fibrilogramular denso de aspecto morfológico similar al que presenta cierto material nuclear (Lam. 8a). A veces se observa una estrecha relación entre este material y la cubierta nuclear. La presencia de poros en la cubierta nuclear es evidente (Lam. 8a).

El **nucleolo** muestra características propias de una baja actividad. Está constituido predominantemente por una masa de componente fibrilar denso (CFD) y con pocos centros fibrilares (CF), que pueden estar asociados a vacuola, ausencia de componente granular (CG). La región organizadora nucleolar (NOR) es muy patente y relacionada estrechamente con la masa nucleolar (Lam. 6a; 8a, b). También el nucleolo puede presentar una estructura típica en forma de anillo con una gran vacuola central, que tiene gránulos en su interior (Lam. 8a, b).

El nucleolo se encuentra desplazado lateralmente dentro del núcleo, pudiendo estar relacionado con la cubierta nucleolar a través de la región organizadora nucleolar (Lam. 6a).

#### **4.2.2.2- MICROSPORA JOVEN RECIÉN LIBERADA**

Este período comienza con la liberación de las microsporas en el lóculo de la antera una vez que la pared de calosa ha desaparecido. La estructura de la exina ya se encuentra perfectamente consolidada (Lam. 9a)

##### **Citoplasma**

Prácticamente no se observan diferencias entre el citoplasma de la joven microspora libre en el lóculo con respecto al de tetradas, en cuanto a población ribosómica, diferenciación y distribución de organelas se refiere (Lam. 9a, b). Dejan de observarse las bandas de **microtúbulos** así como la distribución periférica de los **ribosomas**. El **retículo endoplásmico rugoso (REr)** incrementa ligeramente en cuanto al número y longitud de las cisternas, que con frecuencia pueden estar asociadas a los **plastos** (Lam. 9b, c). Merece la pena destacar el desarrollo que observamos del aparato de **Golgi** tanto en número de cisternas como en número de dictiosomas. También se aprecia el inicio de su actividad secretora, reflejada en la presencia de pequeñas vesículas en los extremos de los dictiosomas.

##### **Pared**

La exina de la microspora recién liberada consta de los elementos básicos de la ectexina: **columelas** cortas, que originan arcadas de dimensiones muy reducidas y **tectum** casi continuo con pequeñas interrupciones que comunican las arcadas

## **RESULTADOS**

---

con el exterior. En la parte externa del tectum ya se observan elementos ornamentales de forma globular o **gránulos supratectales** (Lam. 10a,b; 9a). A lo largo de este período se completa la estructura de la exina con la formación de la **endexina** (Lam. 10b). No existe **capa basal** de manera que las báculas se encuentran desde el primer momento insertadas y en contacto directo con la endexina. Tal y como se observa al microscopio electrónico de barrido (MEB) el grano de polen de tomate presenta tres **regiones aperturales** de tipo colpo (definida como apertura de forma alargada, con una longitud al menos el doble que su anchura). La apertura se encuentra constreñida en su zona ecuatorial por una estructura o "puente" de ectexina (Lam. 1a). Teniendo en cuenta estas características al realizar secciones del grano de polen de tomate podremos encontrar dos tipos diferentes de imagen:

a) Cuando la sección de la apertura es totalmente meridional (atravesando el puente de ectexina) la exina aparece como una zona más abultada. La endexina se engruesa considerablemente mostrando forma de lente con estructuras lamelares esparcidas en su interior y denominada **oncus de la exina** (Lam. 10a). Este oncus se encuentra cubierto por ectexina, observándose con claridad los elementos estructurales de la exina (Lam. 10a).

b) Cuando la sección se realiza más tangencial, atravesando la apertura solamente a nivel del colpo (sin pasar por el puente de ectexina de la zona ecuatorial) (Lam. 9a). En este caso la exina aparece más delgada careciendo de ectexina, mientras que la endexina tiene mayor grosor que las zonas interaperturales. Dejan de observarse los elementos estructurales de la exina (Lam. 9a).

### **Núcleo**

La cromatina presenta un mayor grado de descondensación que en tetradas (Lam. 9a). Continúa observándose pequeñas aglomeraciones de material, de características semejantes a las del material nuclear, situadas en el citoplasma adyacente al núcleo, en contacto con la cubierta nuclear (Lam. 9b).

El **nucleolo** presenta un aspecto diferente al del estadio anterior, teniendo una morfología más laxa. Sigue constituido mayoritariamente por componente fibrilar denso (CFD) y algo de componente granular (CG). La gran vacuola que se observaba en tetradas ha desaparecido y ha dado lugar a numerosas vacuolas periféricas de menor tamaño (Lam. 9b, 10c). Estas vacuolas suelen estar asociadas a centros fibrilares (CF), que ahora son más numerosos (Lam. 10c).

### **4.2.2.3- MICROSPORA MEDIA**

En este estadio se detecta un ligero incremento de la actividad citoplásmica y nuclear, así como una marcada diferenciación entre las dos capas de la exina: ectexina y endexina (Lam. 11a). Todos estos cambios quedan reflejados en los siguientes apartados:

### **Citoplasma**

Se observa una mayor densidad citoplásmica consecuencia de un ligero aumento de **ribosomas** y orgánulos celulares. El aparato de **Golgi** muestra una mayor actividad reflejada en el número de dictiosomas, de cisternas (llegando a tener

## **RESULTADOS**

---

hasta siete cisternas) y en la mayor secreción de vesículas (Lam. 11b). También comienza a observarse por el citoplasma algunos **cuerpos osmiófilos** probablemente de naturaleza lipídica (Lam. 11a). Las **mitocondrias** aumentan ligeramente de tamaño y presentan una forma más ovoide con crestas algo más hinchadas (Lam. 11b, c).

En este citoplasma, existen **compartimentos** con un tamaño comprendido entre vacuolas y vesículas (Lam. 11b, 12a) y que pueden presentar material fibrilar e inclusiones densas. Se encuentran por todo el citoplasma, pero preferentemente muy cercanos al plasmalema sugiriendo un vertido de su contenido hacia el exterior (Lam. 12d). Por otra parte debajo de las regiones aperturales, entre el plasmalema y la exina se encuentran unos espacios periplásmicos (Lam. 11a, 12d) de contenido semejante al de las "vesículas-vacuolas" las cuales, en ocasiones se observan fundiendo con el plasmalema (Lam. 12d). Aparentemente se podría pensar que son lugares de retracción del plasmalema, pero la persistente localización de estos espacios debajo de las regiones aperturales, nos hace pensar que mas bien se trate de depósitos incipientes que contribuyen al desarrollo de la matriz de la región apertural a nivel de la intina.

### **Pared**

La exina en este período termina de consolidarse, distinguiéndose ahora muy bien la **ectexina** de la **endexina**, debido a que presentan diferente afinidad en cuanto a su capacidad de tinción: la endexina aparece más densa que la ectexina (Lam. 11a; 12b, c). Estas características tintoriales nos permiten apreciar como las

columelas se insertan directamente en la endexina (Lam. 12b, c) confirmándonos lo que ya intuíamos en el estadio más joven: la ausencia de una capa basal que sirva para unir a las columelas entre sí. En la parte mas externa de la endexina se aprecian unas **estructuras lamelares** o "white line" semejantes a las que encontramos dentro del oncus de la exina de la joven microspora (Lam. 12c). Las columelas alcanzan un desarrollo, que aparentemente no cambia en estadios más avanzados, siendo de dimensiones reducidas sobre todo en cuanto a su longitud. El **tectum** aumenta considerablemente en grosor, haciéndose casi el doble que en el estadio joven. A simple vista es continuo (Lam. 12a), pero después de una atenta observación se detectan pequeñas interrupciones o **microcanales** que comunican el diminuto espacio de las **arcadas** con el exterior (Lam. 12b). Dentro de las arcadas se aprecia un material fibrilar (Lam. 12a).

Las diferencias de tinción entre endexina y ectexina se ponen de manifiesto mediante la técnica del PTA (Lam. 29a, b). La ectexina no cambia, mientras la endexina aparece muy teñida. También es evidente la continuidad entre endexina y columelas, confirmando así la ausencia de capa basal (Lam. 29b). El material fibrilar que se encuentra entre las arcadas también muestra una mayor densidad electrónica debido a una mayor tinción, como consecuencia de la reacción con el PTA (Lam. 29b). De igual manera se tiñen los gránulos suprategmiales que constituyen la ornamentación de la exina (Lam. 29a, b), mostrando una apariencia y tinción similar a materiales que se encuentran en el lóculo de la antera y que están en relación con los restos de tapetum (Lam. 29a). Todo ello nos indica la **naturaleza polisacáridica de endexina, ornamentación y material de las**

## **RESULTADOS**

---

### **arcadas.**

En la **región apertural**, el oncus de la exina, a partir de ahora pierde su forma típica de lente aunque continua la presencia de estructuras lamelares. Debajo se encuentra una región transparente a los electrones de forma también lenticular que probablemente corresponde al inicio del **oncus de la intina** (Lam. 12d).

### **Núcleo**

Este compartimento se hace más grande, ocupando un mayor volumen celular. Se aprecia un ligero aumento del grado de condensación de la cromatina (Lam. 13a). El **nucleolo** es más difícil de localizar, probablemente debido al aumento de tamaño nuclear que hace que disminuya la probabilidad de tener al nucleolo en la sección que observamos. Este nucleolo presenta signos de gran actividad estando constituido por componente fibrilar denso (CFD) y componente granular (CG) entremezclados y un elevado número de centros fibrilares (CF) mas pequeños y asociados o no a vacuolas, las cuales también son menos frecuentes (Lam. 13b).

#### **4.2.2.4- MICROSPORA VACUOLADA**

Esta etapa lleva consigo la formación de una gran vacuola que llega a ocupar una tercera parte del citoplasma de la microspora (Lam. 14a), lo cual contribuye a un incremento rápido del volumen celular y a una distribución polarizada de sus componentes. La correcta identificación de esta fase inicialmente puede representar



cierto grado de dificultad, ya que dependiendo del nivel al que hayamos realizado la sección podremos ver la presencia o no de vacuola. Sin embargo una vez que se profundiza en su estudio y adquirimos esta dificultad desaparece, ya que existen otros parámetros, que nos aportan datos sobre el estadio de desarrollo del grano, como son grado de diferenciación citoplásmica o el desarrollo de la pared celular especialmente a nivel de las aperturas.

### Citoplasma

La densidad **ribosómica** aumenta notablemente lo que hace difícil reconocer a primera vista la presencia de otros orgánulos (Lam. 14a). Las cisternas de **REr** son considerablemente más largas que en fases más tempranas y generalmente se encuentran independientes unas de otras, aunque ocasionalmente están próximas entre sí, formando grupos de tres o cuatro (Lam. 14c). El **aparato de Golgi** disminuye de forma espectacular.

Se encuentran pequeñas **vacuolas** que posiblemente funden entre si, ya que al final de este estadio solo observamos una gran vacuola, la cual ocupa gran parte del citoplasma y desplaza al núcleo lateralmente. La vacuola puede contener material fibrilar en su interior (Lam. 14a), el cual con la tinción de PTA aparece teñido indicando su naturaleza polisacáridica (Lam. 29c). Mediante inmunolocalización de peroxidasa se ha comprobado la presencia de esta enzima en el interior de la vacuola en relación con este material fibrilar (Lam. 38). La existencia de cationes en la célula puede ser detectada mediante la técnica del piroantimoniato gracias a la cual observamos un precipitado denso en relación con el tonoplasto (Lam.

## **RESULTADOS**

---

31c). Hacia el final de este período se observan los primeros gránulos de **almidón** en los plastos y aumenta el número de **cuerpos osmiófilos**. Las **mitocondrias** son de mayor tamaño haciéndose más alargadas y adoptan una disposición curiosa rodeando al núcleo (Lam. 14b)

### **Pared**

La pared a nivel de exina no experimenta grandes cambios. La **intina** comienza su formación en las regiones interaperturales observándose, entre el plasmalema y la endexina, una capa transparente a los electrones con material fibrilar en su interior (Lam. 15b). En las **zonas aperturales** continua desarrollándose el **oncus de la intina** por las transformaciones que sufre el espacio periplásmico, situado debajo de las regiones aperturales, dando lugar a una estructura en forma de lente que comienza a "rellenarse" de material fibrilar (Lam. 15a).

### **Núcleo**

A lo largo de este estadio la **cromatina** experimenta una nueva descondensación (Lam. 16a) para volver a condensarse finalmente antes de que tenga lugar la división (Lam. 16c).

El **nucleolo** muestra un aspecto "trabecular" (Lam. 16b) debido a la presencia de una mayor cantidad de componente granular (CG) ya que está entremezclado con el componente fibrilar denso (CFD). Ya no se observa ninguna vacuola y los centros fibrilares (CF) son muy pequeños. En los momentos finales de esta fase el nucleolo disminuye de tamaño y presenta un aspecto homogéneo sin vacuolas

ni centros fibrilares (CF) y se encuentra de nuevo constituido mayoritariamente por componente fibrilar denso (CFD).

En ocasiones se observa un cuerpo nuclear de aspecto similar al nucleolo, pero mucho más pequeño y localizado en las proximidades del nucleolo o incluso en estrecha relación con el (Lam. 16b, c).

#### **4.2.2.5- GRANO BICELULAR JOVEN**

Después de la mitosis asimétrica de la microspora, las dos células recién formadas difieren en tamaño y contenido. Aunque a primera vista el citoplasma del grano parece homogéneo es fácil de distinguir la existencia de dos células gracias al tabique que las separa (Lam. 17a). La célula generativa se localiza en un extremo del grano y presenta inicialmente forma lenticular. Su pared es continua con la intina de la pared del grano (Lam. 18b), teniendo una naturaleza muy similar como se demuestra con los test realizados de PTA y Thiery, ya que ambos dan positivos a nivel de paredes (Lam. 29d; 30a, b, c, d). Mediante estas tinciones se prueba la presencia de componentes polisacáridicos en la pared generativa y en la intina.

#### **Citoplasmadel grano**

La características citoplásmicas del grano son muy similares a las de la microspora vacuolada. Los **ribosomas** se agrupan formando polirribosomas (Lam. 18b). La gran diferencia entre los citoplasma de la célula vegetativa y generativa es la

## **RESULTADOS**

---

ausencia de **plastidios** y **vacuolas** en la célula generativa. Se nota un ligero incremento de granos de **almidón** en la célula vegetativa (Lam. 17a; 18b). La **vacuola** todavía presente, se va reabsorbiendo de forma gradual y termina por desaparecer (Lam. 18a).

### **Pared**

La única característica nueva que presenta la pared en este estadio se localiza a nivel de la región apertural, puesto que se observan **tubulaciones** dentro del oncus de la intina. Estas estructuras tubulares se originan por invaginaciones o "dedos de guante" procedentes del citoplasma (Lam. 19a, b). Las membranas de estas tubulaciones dan positivas a la tinción del PTA (Lam. 30b) mientras la matriz del oncus da reacción positiva a la técnica de Thiery (Lam. 30c, e). El **oncus de la exina** continua mostrando el aspecto lenticular de estadios anteriores, extendiéndose sobre el **oncus de la intina** (Lam. 19a, b).

### **Núcleo**

Los núcleos vegetativo y generativo presentan características diferentes desde el principio, las cuales se van haciendo más marcadas a lo largo de la maduración. El núcleo vegetativo se localiza en una posición central dentro del grano y tiene una forma redondeada (Lam. 17a), mientras el generativo se va adaptando a la forma que en cada momento presenta la célula generativa y que en esta fase es lenticular (Lam. 17a, 18b). Su tamaño es relativamente grande si se tienen en cuenta el volumen total de la célula generativa.

La cromatina en ambos núcleos presenta un patrón diferente, estando bastante descondensada y solo con pequeñas masas densas en la periferia del núcleo vegetativo (Lam. 17a; 20b; 27a, c), mientras que en el núcleo generativo el grado de condensación es ligeramente mayor, formando masas de más tamaño adosadas a la cubierta nuclear (Lam. 17a; 18b; 20a).

Las masas de cromatina y el material ribonucleoproteico fibrilo-granular, esparcido por el nucleoplasma, presentan las mismas propiedades de tinción con uranilo-plomo (Lam. 27a). Por ello es difícil de distinguir si se trata de material ribonucleoproteico o de cromatina sin recurrir a la citoquímica. Como primera aproximación utilizamos la tinción regresiva de EDTA (Bernard 1969) con la que se tiñe de forma preferencial el material ribonucleoproteico. Gracias a esta técnica nos es posible reconocer que son pocas las masas densas decoloradas correspondientes a masas de cromatina, mientras que es abundante el material fibrilo-granular, de naturaleza ribonucleoproteica, que se tiñe en esta fase en el nucleoplasma, además del nucleolo (Lam. 27b,c).

Los nucleolos también muestran desde el principio una actividad diferente, reflejada en su tamaño, componentes y en el número y organización de centros fibrilares. El nucleolo vegetativo tiene muchos y pequeños centros fibrilares (Lam. 20b), mientras que el nucleolo generativo solo muestra uno unido al organizador nucleolar (NOR) (Lam. 20a). También tienen en común la disposición segregada de sus componentes granular y fibrilar (Lam. 27b, c), aunque la cantidad de componente granular es mayor en el nucleolo vegetativo que en el generativo.

Utilizando la técnica del piroantimoniato potásico se forma un precipitado grueso

## **RESULTADOS**

---

en el componente fibrilar de ambos nucleolos, indicativo de la presencia de cationes inorgánicos como son  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ , (Lam. 31d).

### **4.2.2.6.- POLEN BICELULAR MEDIO**

Este período se caracteriza por la forma esférica de la célula generativa, la cual adquiere esta forma a medida que avanza en su desarrollo. La pared de esta célula generativa se va estrangulando hasta terminar independizándose de la intina, quedando la célula inmersa y completamente rodeada por el citoplasma vegetativo. Este estadio es fácil de identificar por la elevada cantidad de sustancias de reserva (almidón y cuerpos lipídicos) que presenta el citoplasma del grano. En cambio el citoplasma generativo no presenta variaciones respecto al estadio más joven (Lam. 21a).

#### **Citoplasma del grano**

El citoplasma tiene una elevada densidad a los electrones debido a la gran cantidad de **ribosomas** y orgánulos celulares en el presentes. Para visualizar las membranas de los diferentes compartimientos se hace necesario utilizar muestras fijadas sólo con glutaraldehído. Con la doble fijación glutaraldehído-osmio es difícil detectar dictiosomas, mitocondrias y otras membranas citoplásmicas. Cuando no tienen tetróxido de osmio, las membranas no se tiñen y resaltan mas sus perfiles translúcidos a los electrones en un citoplasma que presenta un elevado contraste.

**Plastos** y mitocondrias experimentan un notable cambio en número y en estructura. A partir de ahora podemos hablar de **amiloplastos** debido a la gran cantidad de almidón que se detecta en ellos (Lam. 21a,b,d). Cuando sometemos este material a las tinciones de PTA y Thiery, el almidón muestra una fuerte reactividad apareciendo densamente teñido. Sin embargo es posible encontrar granos de almidón que no se tiñen por igual, debido a que esta sustancia de reserva no es homogénea, presentando diferentes grados de síntesis o degradación de los azúcares que la constituyen. Las **mitocondrias** son más numerosas y de una menor longitud, presentando una forma ovoide y sus crestas son largas, llegando a alcanzar una longitud igual al diámetro de la organela (Lam. 21c). Los grupos de **REr** se hacen más frecuentes aumentando el número de cisternas que los integran y llamando la atención su localización alrededor de la célula generativa (Lam. 22d). El **aparato de Golgi** vuelve a ser visible observándose dictiosomas en número de cinco o seis y numerosas vesículas muy diminutas en sus proximidades (Lam. 21c). También aumentan los **cuerpos osmiófilos** de manera notable.

Es interesante destacar la polaridad que se observa en la distribución de los amiloplastos y cuerpos lipídicos. Posiblemente esta polarización, también ocurre con otras organelas pero pasa desapercibida debido a sus características menos llamativas. Debido a esta polarización y dependiendo del nivel en el que se haya realizado la sección, la imagen que obtenemos es variable en cuanto a la relación existente entre almidón y cuerpos osmiófilos (Lam. 21 a,d).

## **RESULTADOS**

---

### **Pared**

La pared del grano se puede decir que ya está totalmente formada, con las tres capas perfectamente definidas: **ectexina**, **endexina** e **intina** (Lam. 22a). La intina muestra una fuerte reacción con la técnica del PTA (Lam. 29e). La ornamentación externa de la exina es menos marcada que en estadios jóvenes (Lam. 22a), convirtiéndose los gránulos suprategales en pequeños picos. Esto es debido a la sedimentación sobre la pared de nuevo material que probablemente proceda del tapetum.

Mediante la técnica del piroantimoniato encontramos dos tipos diferentes de precipitado, uno fino y otro grueso, tanto en la superficie de la exina como en las arcadas (Lam. 31a), y en la región apertural a nivel del oncus de la exina (Lam. 31b). Los diferentes tipos de precipitado responden a la presencia de distintos tipos de cationes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ ).

Para conocer la naturaleza de estos cationes se recurrió al microanálisis de rayos X. Gracias a esta técnica nos ha sido posible aproximarnos a la naturaleza de los cationes inorgánicos existentes en la pared del polen. Los elementos detectados son P, S, Cl, K, Ca. En un principio se intentó diferenciar entre la zona apertural y la interapertural. Sin embargo las diferencias encontradas, entre los elementos detectados, no eran consistentes, ya que había diferencias incluso dentro de una misma región. Por ello se ha considerado la pared como un todo y se realizaron medidas al azar sin diferenciar zonas entre sí. Como resultado podemos indicar que el P es el elemento más abundante seguido por el S y el Ca. Los otros dos elementos (Cl, K) se encuentran en cantidades bastante pequeñas y muy similares



entre sí. Merece destacar las diferencias encontradas según el método de fijación utilizado, las cuales son más significativas en el caso del K y Ca (Esquema IV), aunque hay que tener en cuenta que la fijación química produce una adición de elementos sobre las cantidades ya existentes.

### Núcleo

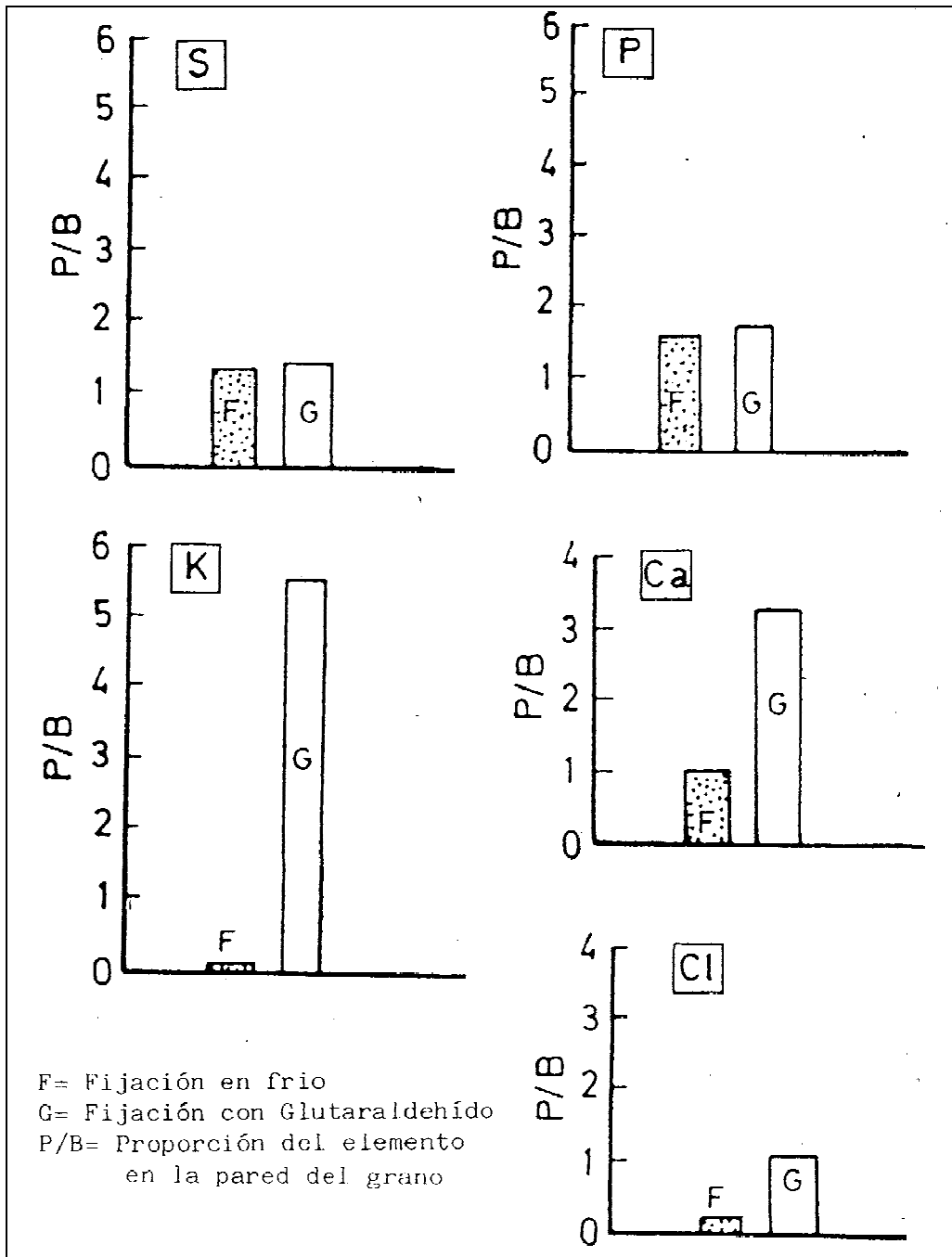
El **núcleo vegetativo** llega a alcanzar el mayor grado de descondensación de la cromatina, no observándose prácticamente masas de cromatina (Lam. 22b; 28a). El nucleoplasma tiene una elevada cantidad de material fibrilgranular encontrándose también, gránulos densos y agrupados dentro del nucleolo (Lam. 22b).

El **nucleolo** de gran volumen presentando centros fibrilares pequeños homogéneos y con el componente granular parcialmente (CG) en la periferia, índice de cierto grado de segregación (Lam. 22b,c). No es frecuente, pero, puede tener una vacuola de pequeño tamaño y central (Lam. 22c).

El **núcleo generativo** va perdiendo su forma redondeada y va haciéndose paulatinamente más ovoide a medida que lo hace la célula. La condensación de la cromatina se va extendiendo, desde la periferia hacia dentro (Lam. 22d; 28d). En los primeros momentos de este periodo el nucleolo se va reduciendo de tamaño pasando a ser una pequeña masa constituida sólo por material fibrilar. Posteriormente este nucleolo llega a desaparecer.

Mediante la técnica del EDTA se verifica el alto grado de condensación de la cromatina en la célula generativa, frente a la prácticamente descondensación de la cromatina del núcleo vegetativo (Lam. 28a, b).

## RESULTADOS



**ESQUEMA IV:** Microanálisis de rayos-X- Observar la diferencias entre ambos tipos de fijación.

#### **4.2.2.7- POLEN BICELULAR MADURO**

En este estadio el grano de polen se puede considerar maduro y preparado para poder germinar, siempre que se encuentre con el medio apropiado y las condiciones óptimas de germinación. Justo antes de la dehiscencia de las anteras, la región apertural por donde va a germinar el tubo polínico se abulta notablemente. El citoplasma del grano cuenta con la infraestructura necesaria para el rápido crecimiento del tubo polínico y la célula generativa está lista para dividirse y dar lugar a las dos células gaméticas (Lam. 23a). En este período la célula generativa tiene forma muy alargada y una pared celular altamente lobulada (Lam. 24a). Se localiza muy cerca de la apertura por donde saldrá a través del tubo polínico.

#### **Citoplasma**

La densidad de orgánulos en el citoplasma de la célula vegetativa continua siendo muy notable. Los **cuerpos osmiófilos** o lipídicos son muy abundantes y se encuentran distribuidos por todo el citoplasma. Estos cuerpos aparecen como glóbulos densos a los electrones cuando se trata de piezas con osmio, sin embargo cuando el material ha sido fijado solamente con glutaraldehído, se muestran translúcidos a los electrones (Lam. 23e). Generalmente se encuentran rodeados por una, a veces dos, cisternas de RER (Lam. 23e). En la tinción con piroantimoniato se observa la presencia de precipitado fino claramente localizado a nivel de los cuerpos

## **RESULTADOS**

---

osmiófilos (Lam. 31e). En un estadio más avanzado de la madurez del grano disminuye el número de cuerpos osmiófilos y el citoplasma se encuentra ocupado por gran cantidad de **vesículas** con formas y tamaños variables. (Lam. 23a). En ocasiones estas vesículas pueden contener material diverso en su interior, a veces de naturaleza fibrilar. Las **mitocondrias** alcanzan su máxima representación en este período, encontrándose esparcidas por todo el citoplasma, siendo más notable su concentración a nivel de las aperturas. Sus caracteres morfológicos son análogos a los ya mencionados en el estadio anterior (Lam. 23b). En muchas de ellas se detecta en su matriz zonas más claras (Lam. 23d), que incluso llegan a ocupar toda la mitocondria pudiendo transformarse en vesículas. Se reconoce el origen mitocondrial de estas vesículas por su tamaño y forma, por contener restos de crestas en su interior (Lam. 23d, 24a) e incluso a veces, por poder observarse doble membrana.

Otra característica importante a tener en cuenta al hablar de polen maduro es la ausencia de almidón en los **plastos** (Lam. 23b), produciéndose por tanto una desdiferenciación de los mismos. Estos ahora son más difíciles de identificar al perder su carácter más llamativo como es el almidón. Son de gran tamaño, ovoides y con un estroma homogéneo.

El **REr** adquiere unas dimensiones y distribución espectaculares (Lam. 23a; 24a, b) siendo de señalar la elevada tinción que presentan sus ribosomas. Las cisternas de retículo rugoso proliferan enormemente y forman agrupaciones que cuentan con un número elevado de cisternas (Lam. 24b) las cuales suelen estar en estrecha relación con los cuerpos lipídicos (Lam. 23e). Además es fácil de observar como

grupos de cisternas de RE continúan localizándose alrededor de la célula generativa (Lam. 23b). Progresivamente las cisternas de van dilatando. En este caso ya no suelen ser tan largas sino que se fragmentan dando vesículas en sus extremos (Lam. 24b). También encontramos cisternas de RER en la periferia del citoplasma, dispuestas de forma paralela al plasmalema. En este caso se pierden los ribosomas de la membrana adyacente al plasmalema (Lam. 25a). El **aparato de Golgi** continua siendo muy activo, aunque a primera vista pasa desapercibido debido al gran número de orgánulos del citoplasma y a la pequeña dimensión de dictiosomas y vesículas, las cuales son especialmente diminutas (Lam. 25b).

### Pared

Como ya se ha indicado, la pared del grano ya quedó consolidada previamente. En cambio la **región apertural** es ahora cuando se puede decir que su estructura está completa y preparada para la germinación. Se observa una protuberancia del **oncus de la intina** cuya superficie externa carece de exina (ectexina y endexina) (Lam. 26a, b). Dentro del oncus de la intina se encuentra tubulaciones dilatadas llenas de un material denso. Las tubulaciones mayoritariamente localizadas en el ápice, ya no tienen contacto con el plasmalema quedando separadas de este por una capa de material de la intina (Lam. 26a).

### Núcleo

Lo más notable del **núcleo vegetativo** es la pérdida de su forma esférica pasando a tener un aspecto irregular. Por ello en una misma sección es posible encontrar

## **RESULTADOS**

---

dos compartimentos nucleares como consecuencia del alto grado de lobulación (Lam. 25d). De nuevo se observan masas de cromatina condensada en la periferia y en contacto con la cubierta nuclear y que progresivamente se extiende por todo el núcleo. El nucleoplasma presenta una matriz grisácea densidad electrónica semejante a la del núcleo vegetativo (Lam. 25c). Son frecuente abundantes las agrupaciones de material fibrilo-granular en este nucleoplasma. El nucleolo llega a desaparecer, observándose raramente un pequeño cuerpo nucleolar constituido por el componente fibrilar denso (CFD).

El **núcleo generativo** tiene la misma forma alargada de la célula generativa. En los cortes aparece más frecuentemente con forma ovoide o esférica debido a que existe una mayor probabilidad de encontrar cortes transversales que longitudinales. El núcleo presenta la máxima condensación de la cromatina ocupando un volumen análogo al resto del nucleoplasma, el cual presenta una matriz grisácea muy homogénea, completamente diferente a la de un núcleo activo (Lam. 25d).

El material ribonucleoproteico en el nucleolo se ha puesto de manifiesto mediante el uso de la tinción con EDTA (Lam. 28a, b, c, d).

### **4.3- PASO DE MATERIALES A TRAVÉS DE LA PARED DEL POLEN**

La pared del polen maduro, como ya se ha indicado, presenta unas características especiales que protegen y aíslan al grano del exterior. Sin embargo el grano, tanto cuando todavía se encuentra dentro de la antera como tras la dehiscencia de la

antera, toma sustancias y agua del medio que le rodea. La pared aparentemente forma una barrera sólida que impide el paso de sustancias. Con objeto de conocer si realmente existen lugares de paso a través de ella, se ha utilizado nitrato de lantano como elemento traza que nos permita localizar las posibles rutas de comunicación entre el grano y su entorno.

Para ello se ha utilizado polen aun dentro de la antera y polen suelto que se ha mantenido en diferentes medios de cultivo (medio para germinación y medio para maduración).

En el primer caso, se fijó la antera con una solución fijadora que contenía nitrato de lantano. En el segundo caso el nitrato de lantano se incorporó al medio de cultivo y al cabo de un cierto tiempo se fijó el polen (se tomaron muestras después de diferentes tiempos en los medios de cultivo).

En ambos casos se detecta precipitado de lantano, tanto a nivel de la pared como en el citoplasma, lo que indica que efectivamente el paso de sustancias desde el exterior hacia el grano es una realidad. Nuestro estudio se centró en granos en los que la pared ya estaba totalmente desarrollada. Por ello se han considerado dos estadios: polen bicelular medio y polen maduro.

En el **polen bicelular medio**, encontramos un fino precipitado inmerso en el material de la exina, las arcadas y en la intina (Lam. 32a, b) las cuales aparecen totalmente negras por el precipitado. También aparece en los microcanales o "gaps" de la ectexina, además de observarse por el citoplasma dentro de pequeñas vesículas las cuáles se encuentran llenas de este depósito denso. En las cercanías de la pared se puede ver como estas pequeñas vesículas están incluso en contacto

## **RESULTADOS**

---

con la intina (Lam. 32b). En la región apertural es interesante la localización del precipitado en las tubulaciones del oncus de la intina pero no en su matriz (Lam. 32c, d).

En el **polen maduro** el esquema de los resultados cambia ligeramente ya que en este estadio no se observa precipitado en la región apertural, salvo en la periferia (Lam. 33d; 34a). Las tubulaciones aparecen más dilatadas y llenas de material denso a los electrones (Lam. 34c) pero libres de precipitado (Lam. 33d; 34a). En cambio en la intina adyacente a la apertura si está llena de precipitado. En el resto de la intina también hay precipitado pero en menor cantidad (Lam. 33a, c; 34b). La distribución del precipitado por toda la pared es desigual (Lam. 33c). El citoplasma que se caracteriza por una alta vesiculación, presenta depósitos densos dentro de algunas vesículas (Lam. 33b).

Cuando el lantano se incorporó al medio de cultivo (Lam. 34a, b ,c), se observa un esquema análogo al que acabamos de exponer, pero existe una relación directa entre el tiempo que los granos están en cultivo y la cantidad de precipitado que aparece en ellos.

### **4.4- MICROCUERPOS: ACTIVIDAD CATALASA, PEROXIDASA Y OXIDASA.**

La elevada cantidad de sustancias de reserva en el grano de polen, las cuales se van metabolizando a lo largo de la maduración, nos hace pensar en la existencia



de una gran actividad enzimática. A nivel celular peroxidasas y catalasas se localizan en pequeños compartimentos redondeados con una matriz homogénea y de características estructurales poco llamativas y que de una manera generalizada se les conoce como microcuerpos.

Con objeto de identificar la presencia de estos orgánulos en el polen y debido a que según nuestros resultados ultraestructurales no se han encontrado orgánulos que respondan a estas características morfológicas, se ha recurrido a técnicas citoquímicas e inmunocitoquímicas para la posible localización de catalasas y peroxidasas.

### **4.4.1- CITOQUÍMICA**

#### **4.4.1.1- TÉCNICA DE LA 3,3'DIAMINOBENZIDINA (DAB)**

Cuando las muestras problema eran incubadas con DAB mas  $H_2O_2$  se observa, tanto en cortes teñidos como sin teñir, un precipitado muy denso a los electrones (negro), localizado tanto en los cuerpos osmiófilos como en el citoplasma periférico entre RER que los rodea (Lam. 35a, b). Las crestas mitocondriales también se tiñen con esta reacción (Lam. 35c).

Como control se utilizó para la incubación el mismo medio, pero bien con ausencia de  $H_2O_2$ , o bien añadiendo 3-amino-1,2,4-triazol (AT), un fuerte inhibidor

## **RESULTADOS**

---

de la actividad catalásica (Margoliash y Novogrodsky 1958; Reicheig y Evans 1963).

Cuando las muestras control se incuban sólo con DAB pero sin  $H_2O_2$  permanece un ligero precipitado en los glóbulos osmiófilos, pero donde las masas de precipitado son más evidentes es en la periferia de estos glóbulos en estrecho contacto con las cisternas de RE que los rodean (Lam. 35f).

Si se incorpora AT al medio de incubación completo (con DAB más  $H_2O_2$ ), encontramos que el precipitado desaparece en la periferia de los cuerpos osmiófilos, pero no en su interior (Lam. 35e).

### **4.4.1.2- TÉCNICAS DEL CERIO PARA DETECTAR DIFERENTES OXIDASAS**

De las diferentes técnicas citoquímicas utilizadas para la localización de enzimas oxidasas ( OH-oxidasa; D-aminoxidasa; Xantina oxidasa) los resultados han sido positivos tan sólo en el caso de la xantina, siendo similares a los obtenidos con la DAB, apareciendo precipitado a nivel de los cuerpos osmiófilos (Lam. 35d). En las otras dos reacciones ( OH-oxidasa; D-aminoxidasa) la causa de que los resultados no sean los esperados puede ser, debido a la dificultad del cerio para penetrar a través de las paredes de la célula.

**4.4.2- INMUNOCITOQUÍMICA: ANTIPEROXIDASA**

Estas experiencias se han realizado principalmente en el estadio de polen maduro. Sin embargo se han tomado otros estadios más jóvenes, como es el de microspora vacuolada, con el objeto de utilizarlos tanto como controles como de problema. Los resultados obtenidos de la inmunolocalización de peroxidasa mediante la utilización de un anticuerpo policlonal antiperoxidasa (ver Material y Métodos) nos muestran un marcado a nivel de vacuolas en la microspora vacuolada y de vesículas en el polen maduro (Lam. 36a, b). Estos compartimentos contienen material fibrilar en mayor o menor cantidad, depositándose los granos de oro preferencialmente en este material de las vacuolas (Lam. 37a, b; 38a, b).

En mitocondrias y sobre todo en aquellas que muestran signos de degradación también se observa marcado (Lam. 37b). En cambio el resto del citoplasma y núcleo aparece libre de granos de oro. Al contrario de lo que cabía esperar, según los resultados obtenidos con la DAB, los cuerpos osmiófilos y cisternas de RE se encuentran totalmente limpios de marcaje (Lam. 37a, b). En este caso dejan de ser osmiófilos debido a que se ha fijado sólo con glutaraldehído, pero se reconoce que se trata de estos cuerpos por el tamaño, forma redondeada y cisternas de RER que los rodean (Lam. 37b).

Los controles aparecen libres de marcado (Lam. 37c; 38b).



# *Láminas*

## **LÁMINAS**

---

### **ABREVIACIONES UTILIZADAS EN LAS LAMINAS:**

A: Arcada

Ap: Apertura

Ba: Báculo o columela

Ca: Calosa

CF: Centro fibrilar

CFD: Componente fibrilar denso

CG: Componente granular

CG: Célula generativa

CV: Célula vegetativa

Cr: Cromatina

D: Dictiosoma

En: Endexina

Ex: Exina

In: Intina

L: Cuerpo osmiófilo o lipídico

La: Estructuras lamelares

M: Mitocondria

N: Núcleo

Nu: Nucleolo

NG: Núcleo generativo

NOR: Región organizadora nucleolar

NV: Núcleo vegetativo

OE: Oncus de la exina

OI: Oncus de la Intina

P: Plastidio

RE: Retículo endoplásmico

T: Tectum

Ta: Tapetum

V: Vacuola

Vs: Vesículas

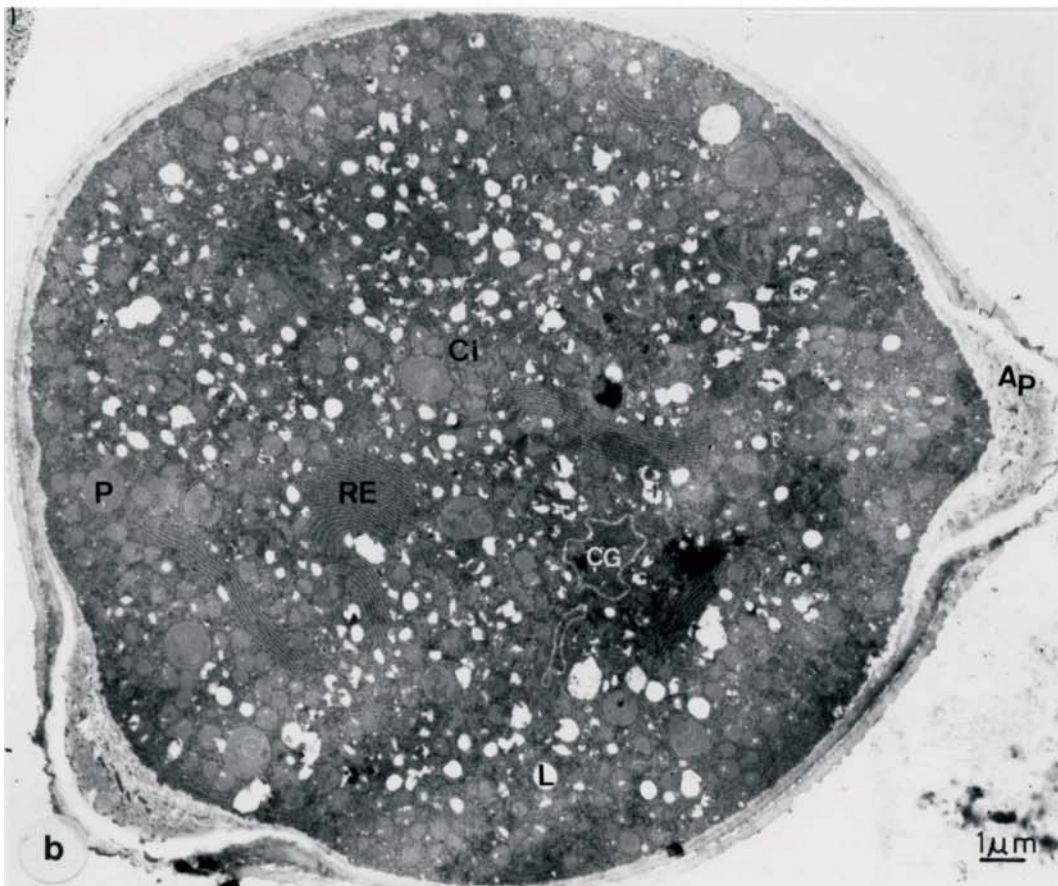
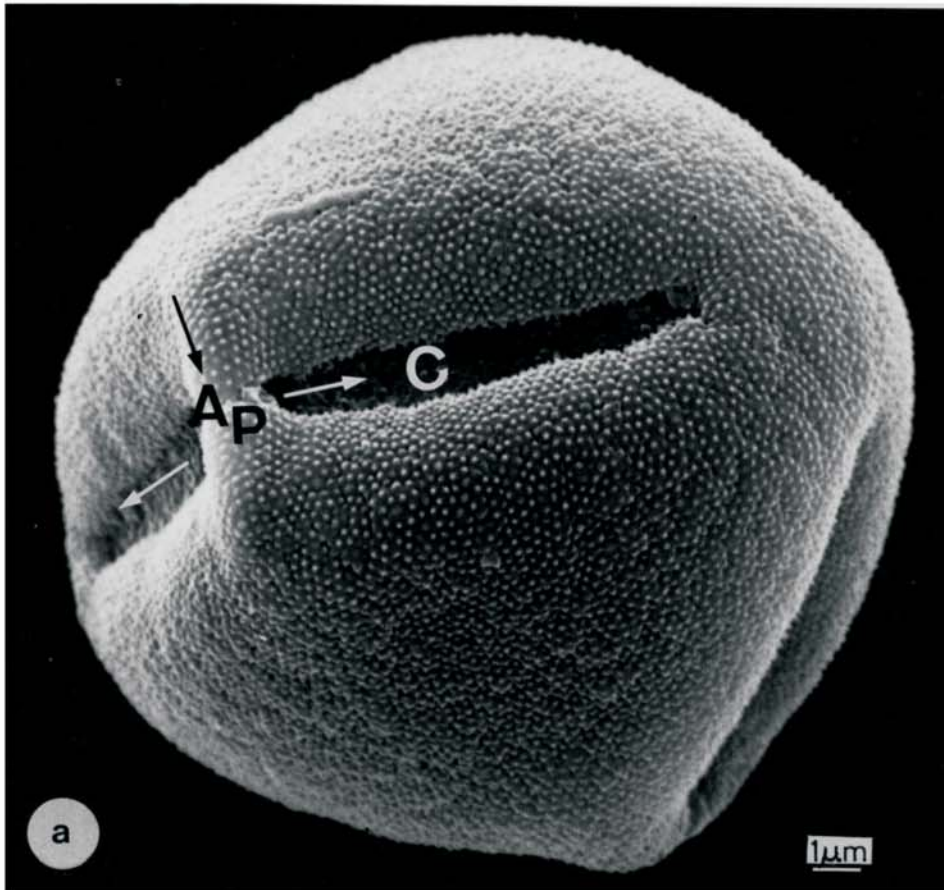
**LAMINA 2**

**POLEN DE TOMATE**

**a-** Polen de tomate, observado al MEB, mostrando dos de las tres aperturas (Ap) de tipo colpo (C) interrumpidas por un puente de ectexina (flecha negra).

**b-** Sección de un grano de polen maduro de tomate con dos de sus regiones aperturales (Ap) observada al MET.





**LAMINA 3**

**CULTIVO *in vitro* DE ANTERAS**

Diferentes fases del desarrollo de callos procedentes del cultivo "in vitro" de anteras, mantenidas en oscuridad:

**a-** Antera después de dos semanas en cultivo mostrando zonas hinchadas (flechas)

**b-** El callo comienza a ser visible por rotura de la pared de la antera (flecha).

**c-** El callo aumenta de tamaño después de 30 días de cultivo (flecha).

**d-** Callo formado por la asociación de pequeñas masas de forma globular (flecha).

**e-** Callos después de varios meses en cultivo mostrando un tamaño considerable.

Obsérvese la existencias de zonas de diferente color (asteriscos).

**f-** Placa Petri con cuatro callos de diferente aspecto tamaño y color. Uno de ellos presenta signos de contaminación (flecha).

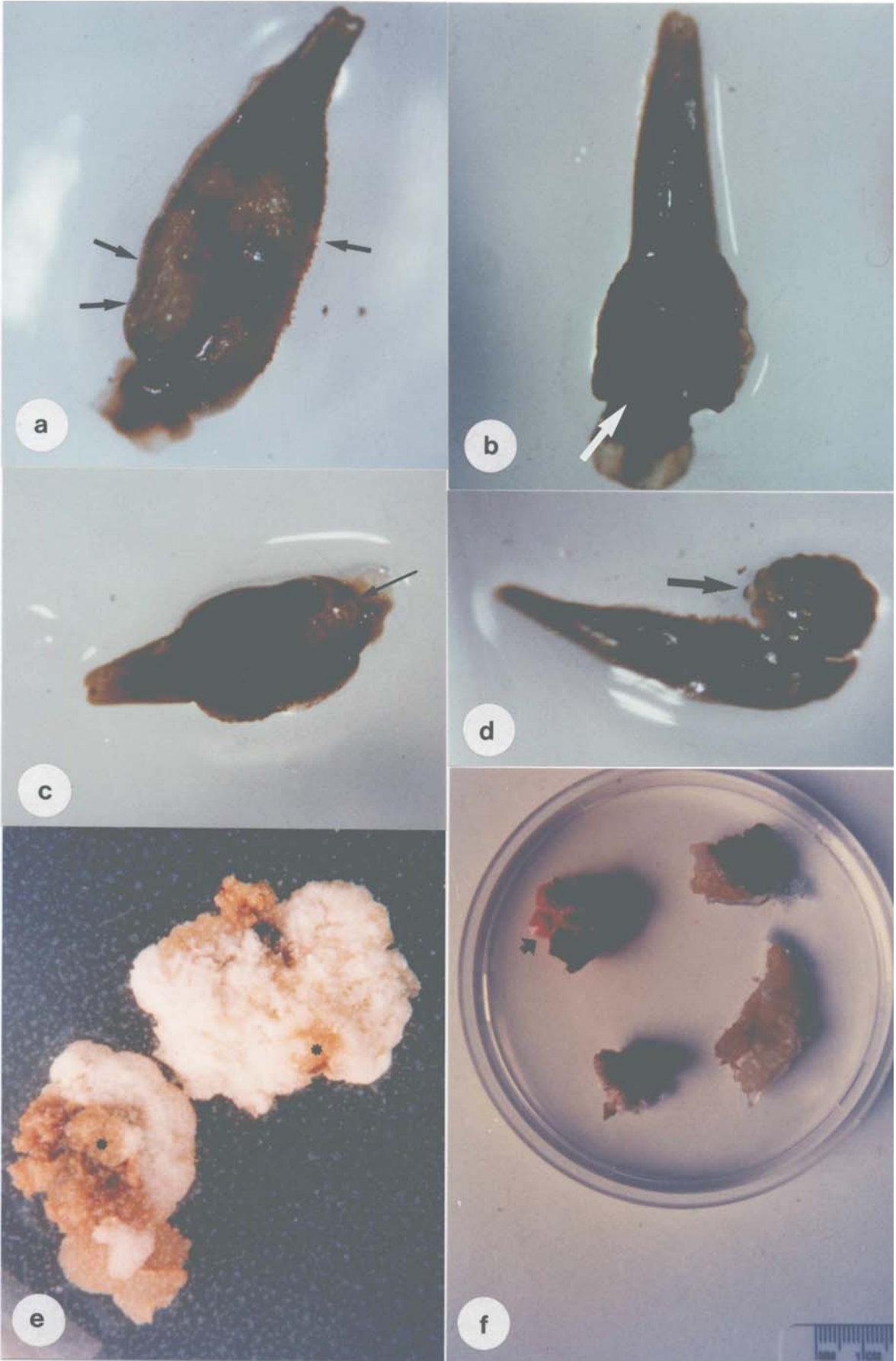


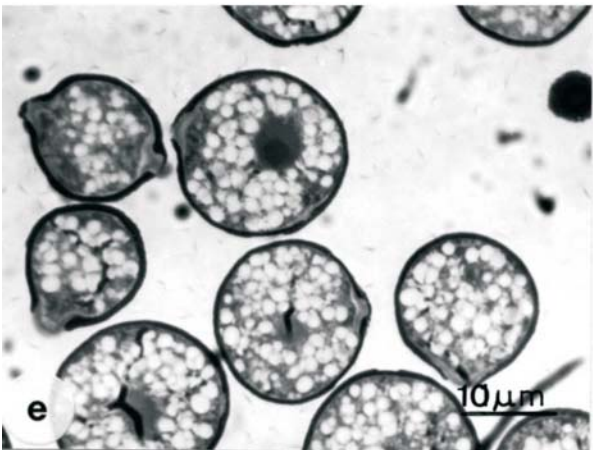
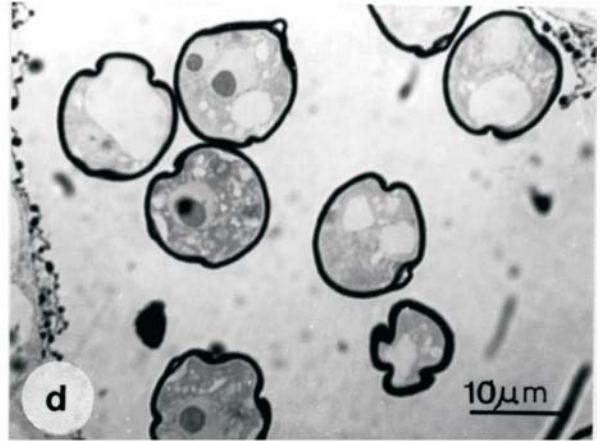
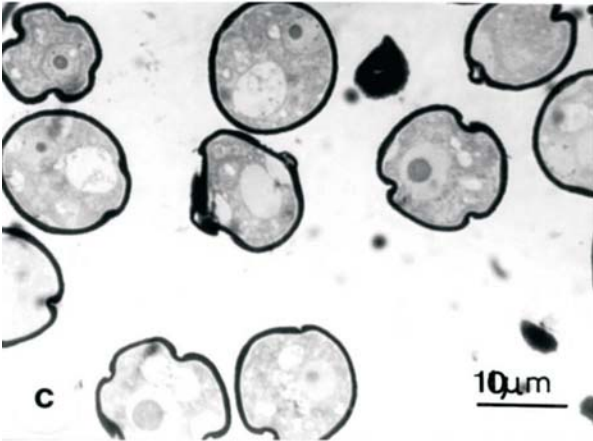
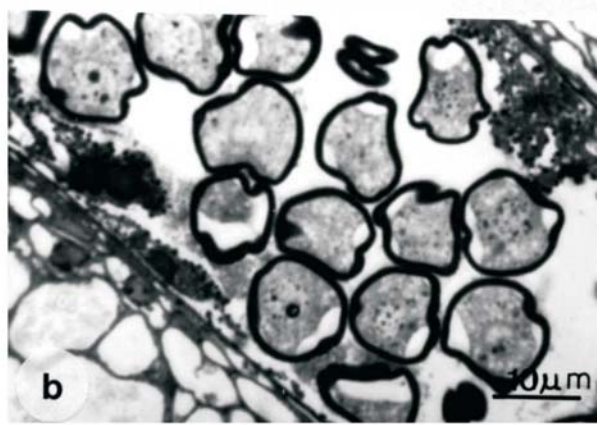
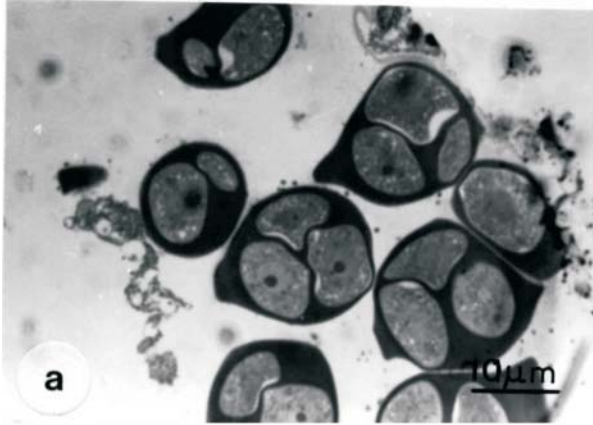
Lámina 3

**LAMINA 4**

**OBSERVACIÓN DE SECCIONES AL MICROSCOPIO ÓPTICO**

Cortes semifinos de 1  $\mu\text{m}$  de espesor teñidos con azul de metileno y observados al microscopio óptico en campo claro:

- a-** Tetradas
- b-** Microspora media
- c-** Microspora vacuolada
- d-** Polen binucleado joven
- e-** Polen medio
- f-** Polen maduro.

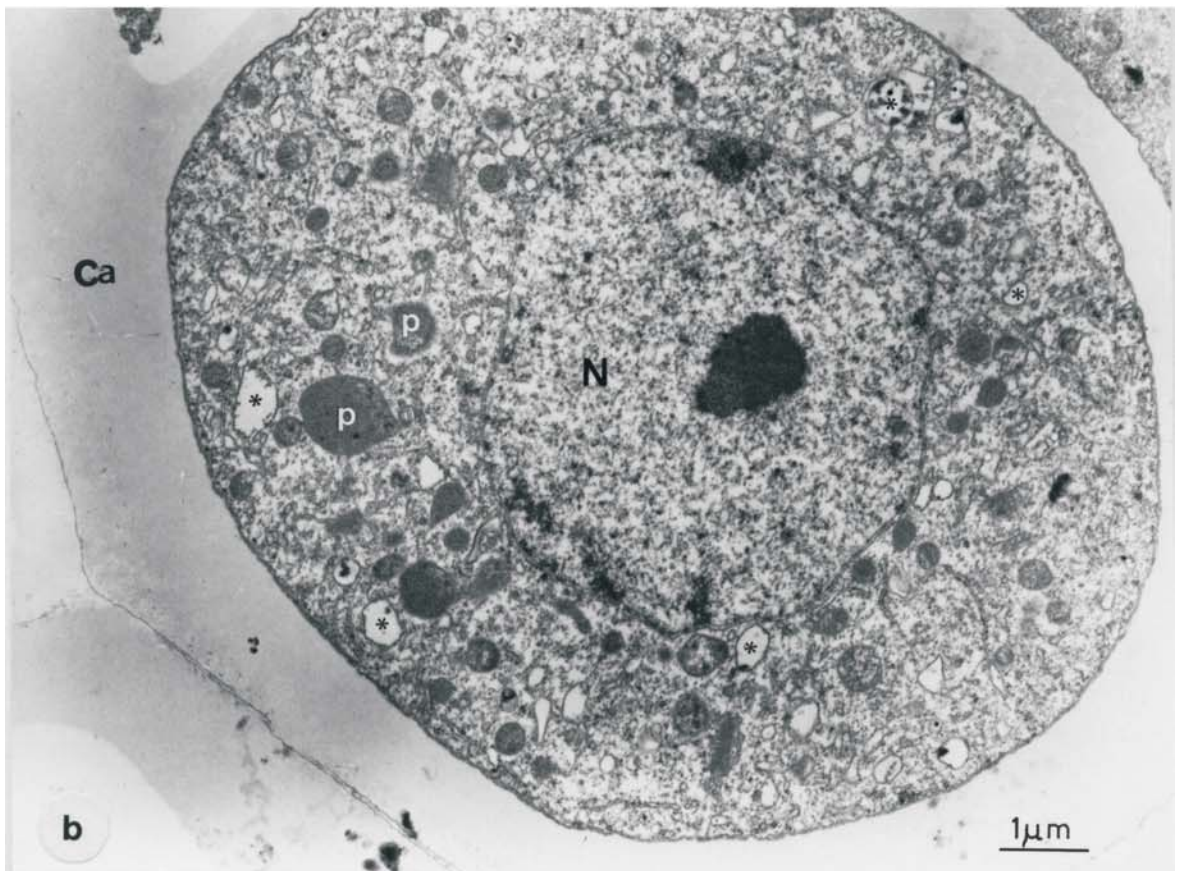


**LAMINA 5**

**TETRADA**

**a-** Vista general de una tetrada muy joven. Obsérvese la pared especial de calosa (Ca) rodeando a tres microsporas de una tetrada.

**b-** Joven microspora en la que la pared de calosa (Ca) se encuentra en contacto directo con el plasmalema. Citoplasma con orgánulos poco diferenciados.



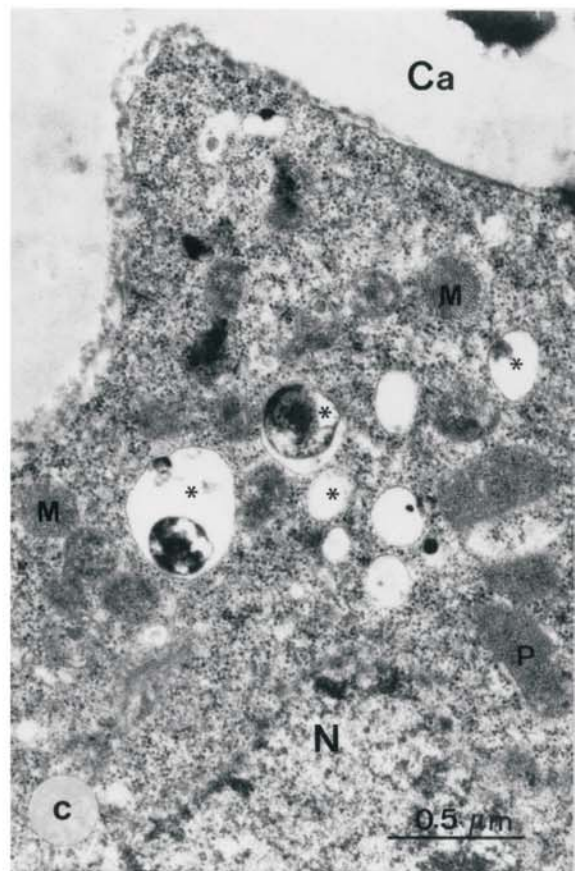
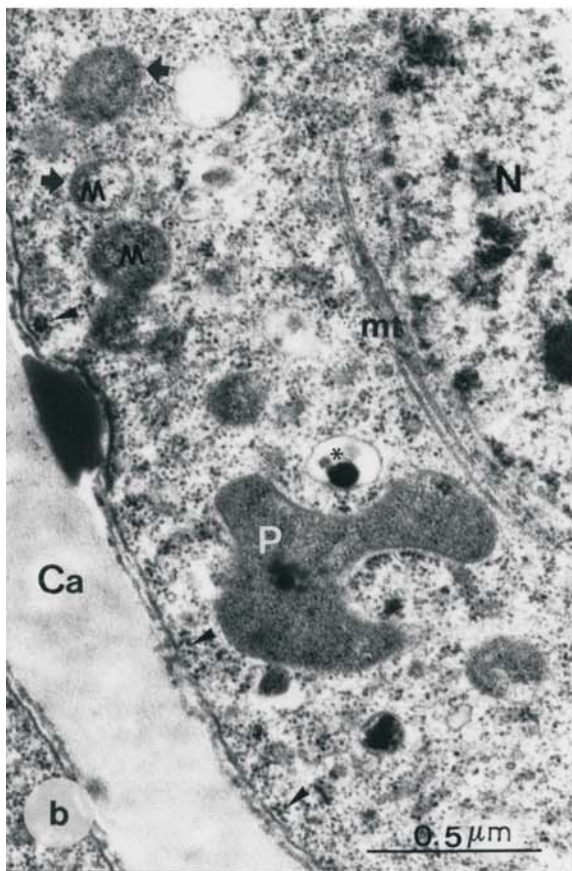
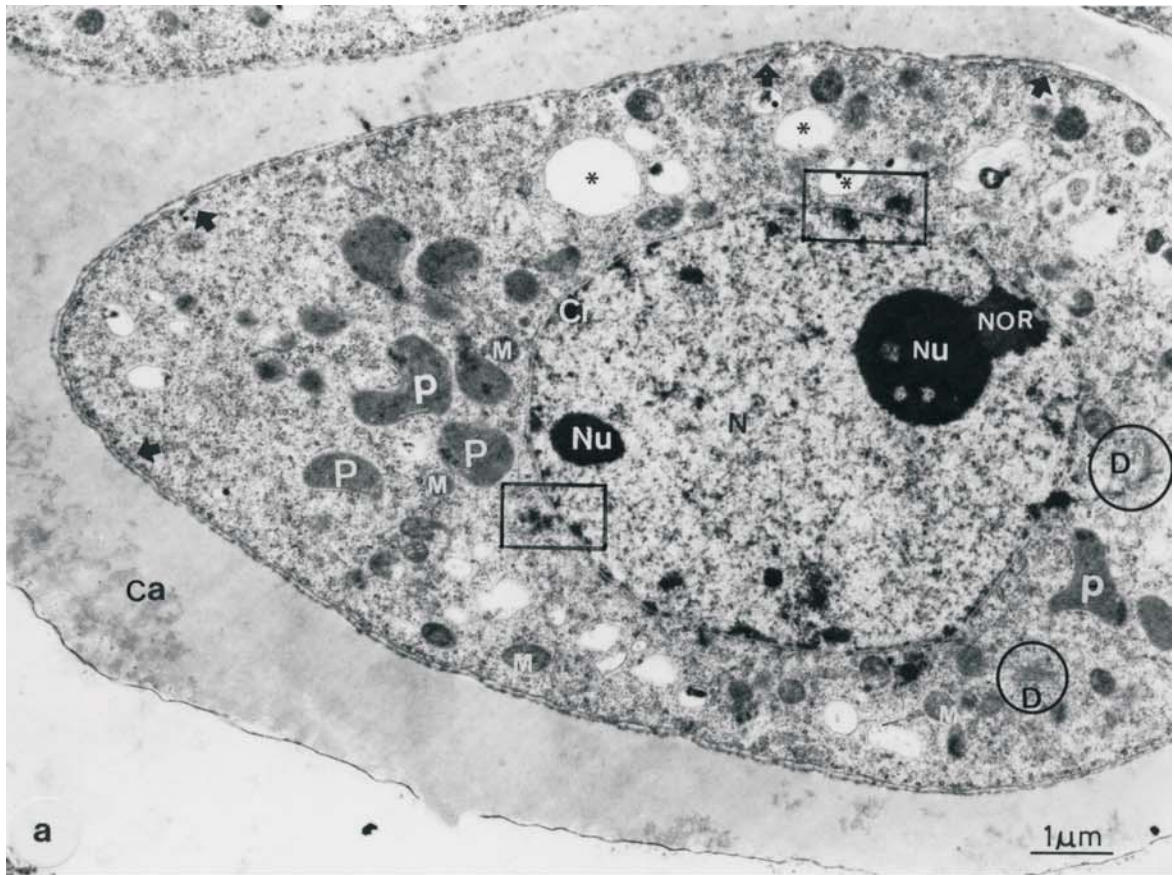
### LAMINA 6

#### **TETRADAS**

**a-** Aspecto general de una microspora joven. Citoplasma poco denso en ribosomas, los cuales forman una banda de polisomas justo debajo del plasmalema (flechas). Los plastos (P) y mitocondrias (M) se diferencian entre si por la forma y tamaño. Se observan dictiosomas (D, círculo). El núcleo presenta la cromatina descondensada salvo pequeñas masas densas en la periferia (Cr). Obsérvese la existencia de dos masas nucleolares (Nu) situadas en la periferia, una de ellas unida al organizador nucleolar (NOR) a través del cual se relaciona con la cubierta nuclear.

**b, c-** Detalle del citoplasma. Plastidios (P) en forma ameboide. Mitocondrias (M) algunas con signos de degradación. Vesículas (asteriscos) de igual tamaño que las mitocondrias y a veces con inclusiones de material denso en su interior. Haz de microtúbulos (mt) adyacentes al núcleo.



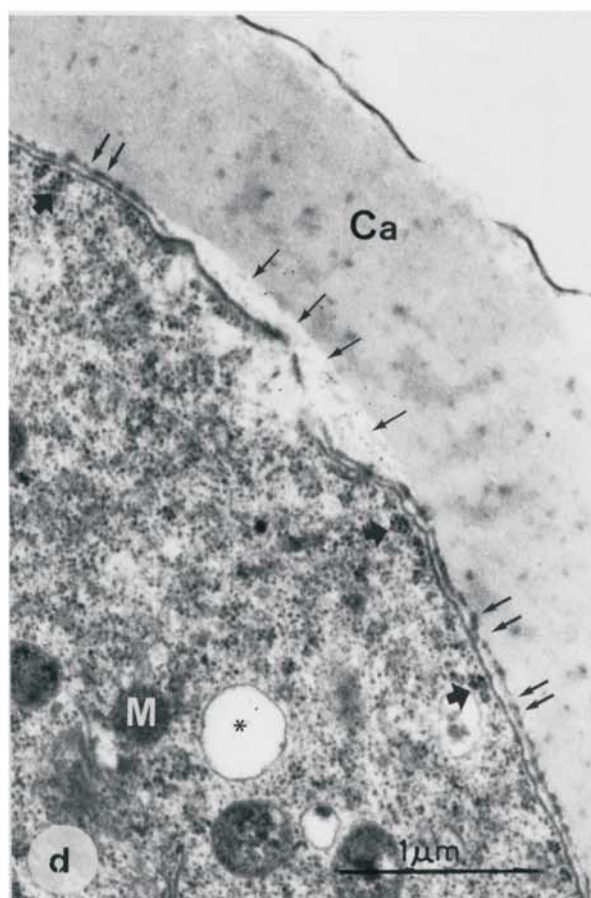
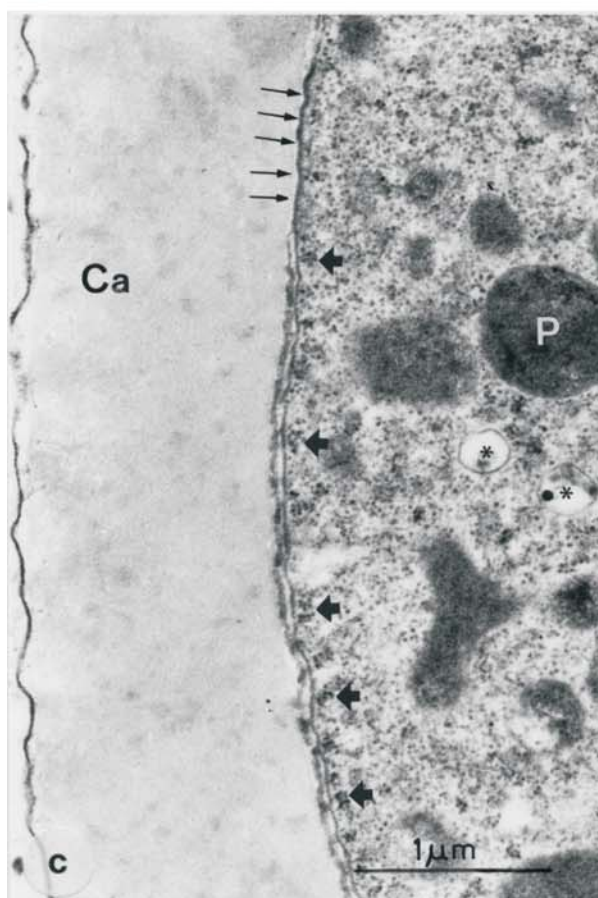
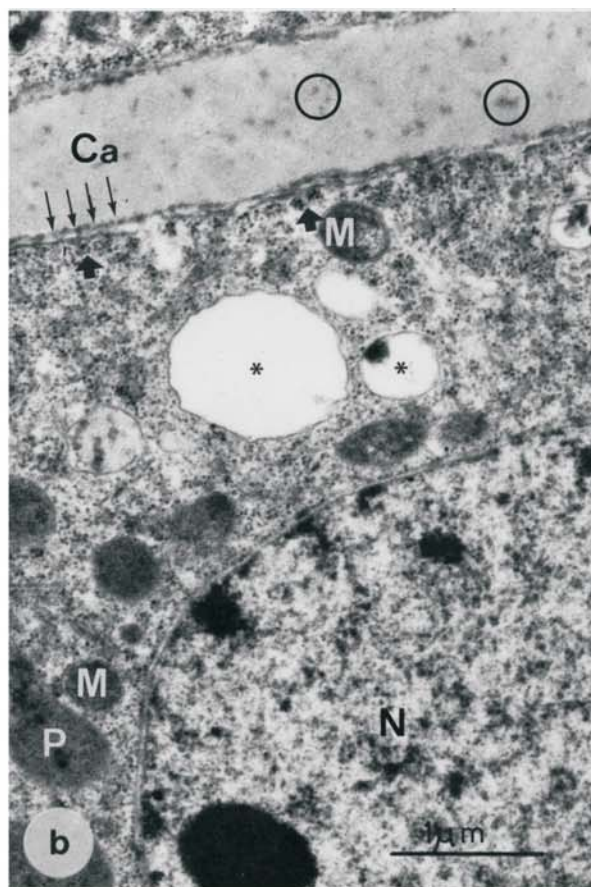
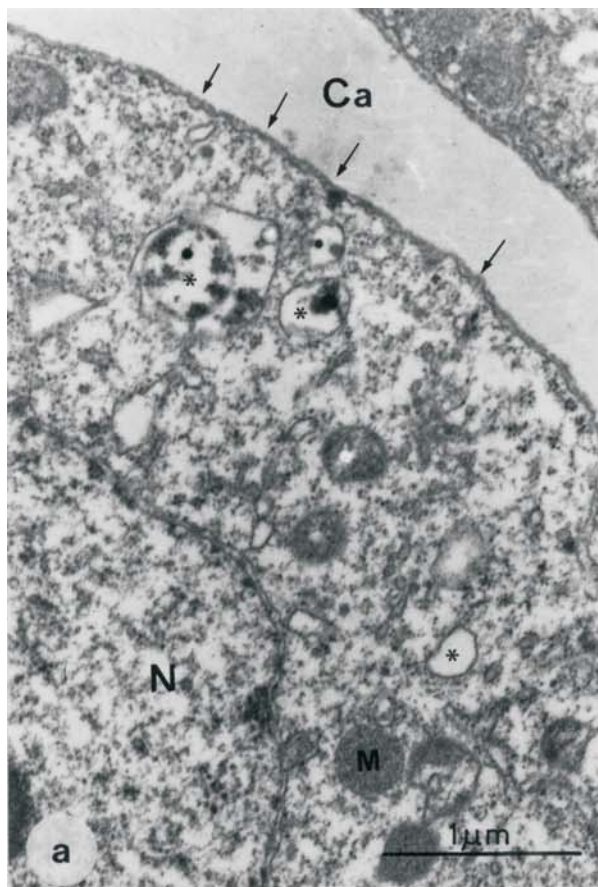


**LAMINA 7**

**TETRADAS**

**a, b-** Inicios de la formación de la pared del polen. Obsérvese la presencia de una delgada primexina y del material que constituye los primeros indicios de las columelas y tectum (flechas delgadas). La calosa presenta inclusiones densas (círculos). Se observan polisomas esparcidos regularmente a lo largo del plasmalema (flechas gruesas).

**c y d-** Regiones del plasmalema más gruesas en donde faltan los elementos de la exina estructurada (agrupación de flechas delgadas). En estas zonas se van a desarrollar las aperturas. Polisomas justo debajo del resto del plasmalema (flechas gruesas).

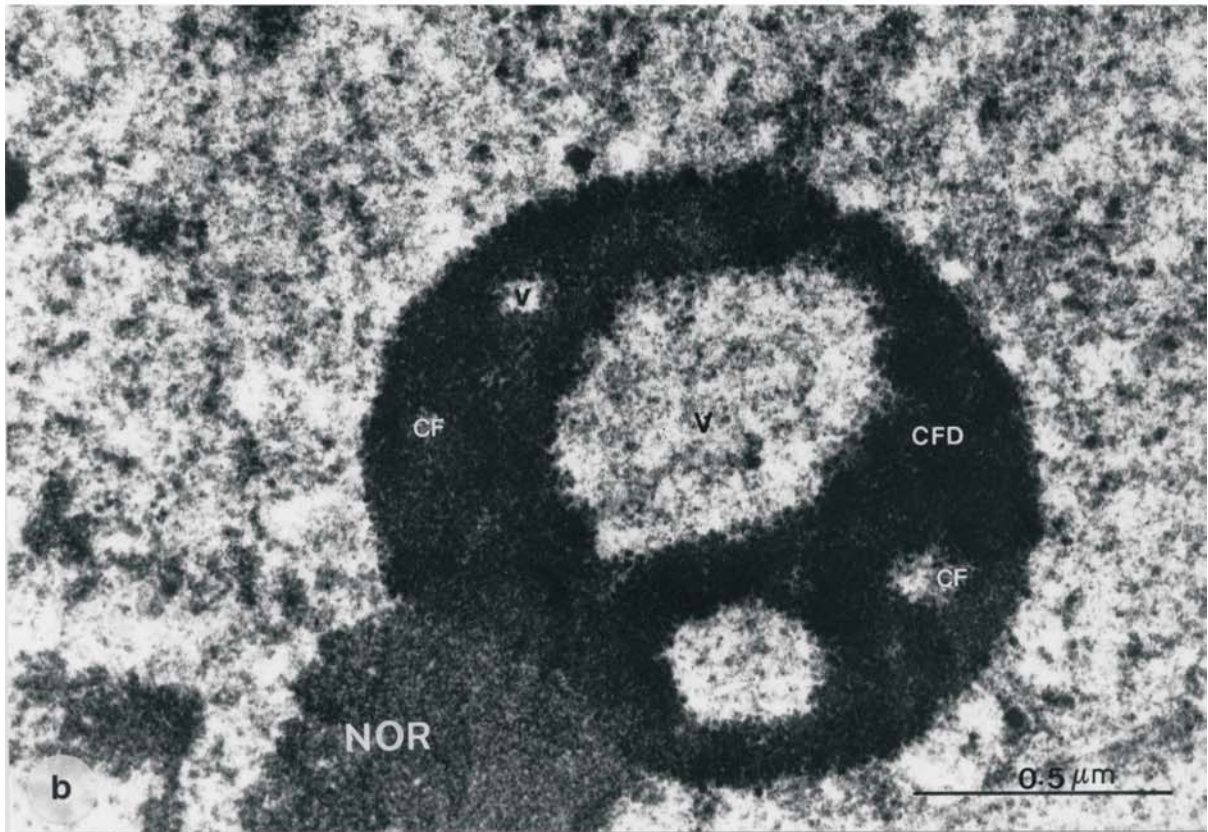
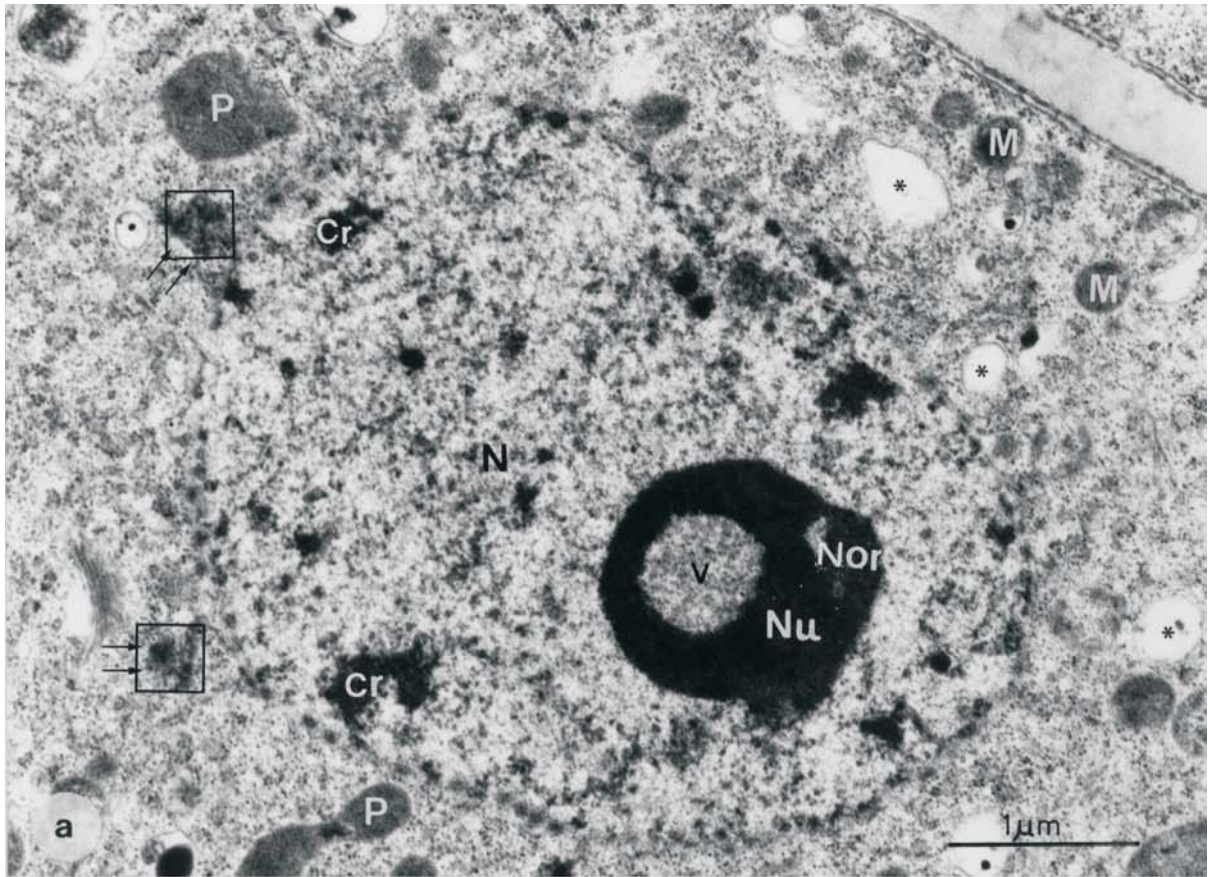


**LAMINA 8**

**TETRADAS**

**a-** Núcleo de la microspora de una tetradra con la cromatina (Cr) parcialmente condensada. Obsérvese en el citoplasma la presencia de pequeñas masas irregulares de material denso, con morfología similar al material nuclear y muy cercanas al nucleoplasma (recuadros). Nucleolo (Nu) en anillo con una vacuola central (V) y adosado a una masa del cromosoma organizador nucleolar (NOR). La cubierta nuclear esta llena de poros.

**b-** Nucleolo unido a la cromatina del organizador nucleolar (NOR) y constituido solamente por componente fibrilar denso (CFD) muy compacto. Tiene forma de anillo con una gran vacuola central (V) que contiene material granular. Algunos centros fibrilares (CF) asociados a vacuolas.



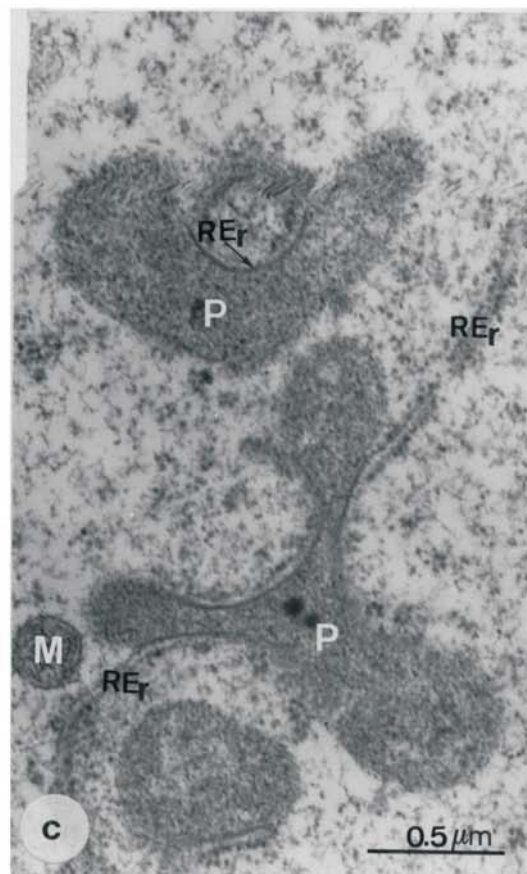
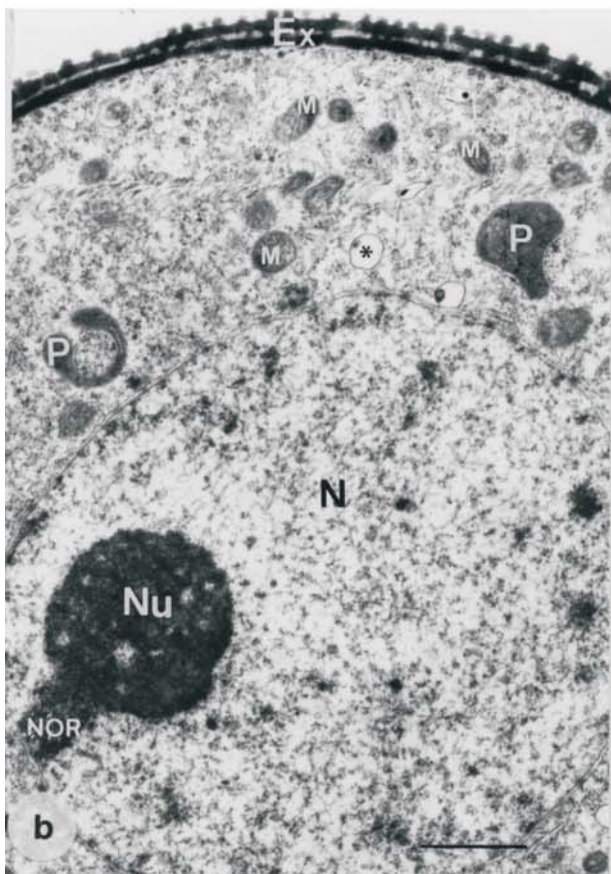
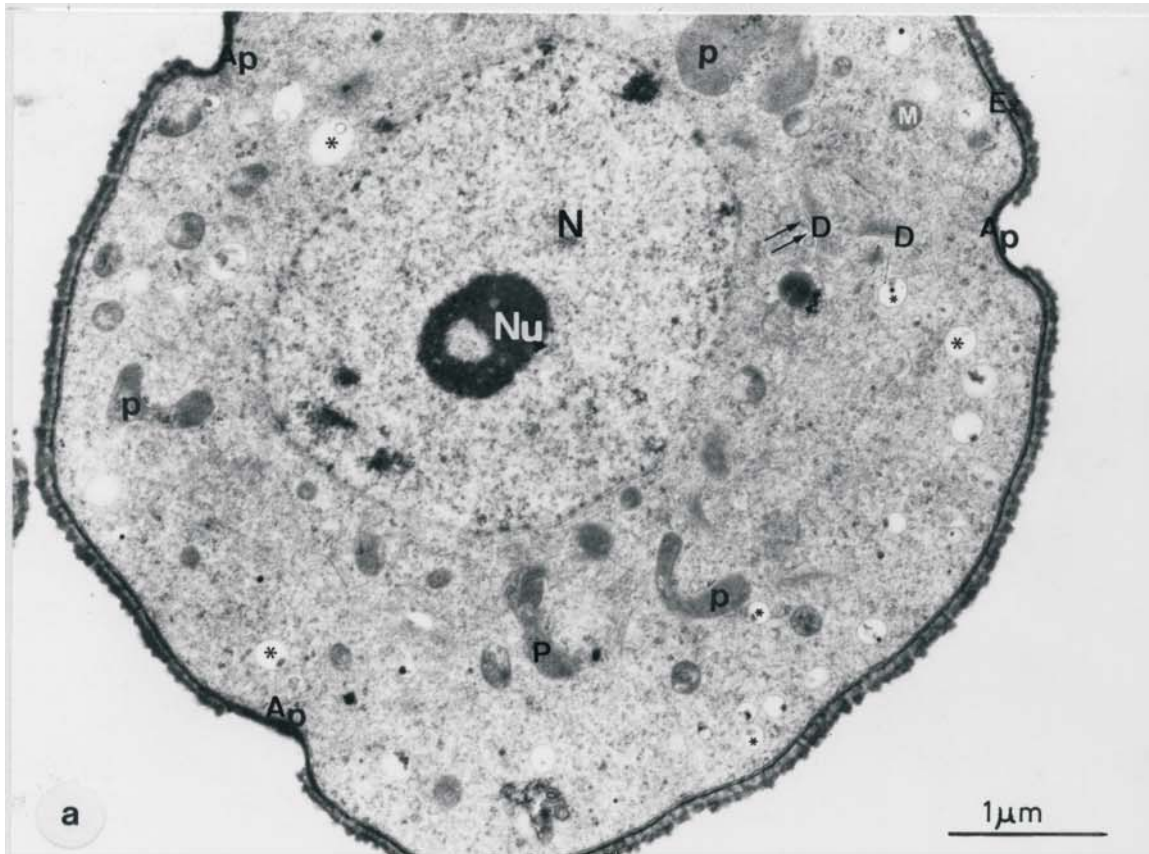
**LAMINA 9**

**MICROSPORA RECIÉN LIBERADA**

**a\_** Microspora joven libre en el lóculo con una la exina (Ex) bien definida estructurada. Se observan las tres regiones aperturales (Ap) bien diferenciadas por la ausencia de ectexina.

**b-** Citoplasma pobre en ribosomas, plastidios (P) ameboides poco diferenciados y mitocondrias ovoides (M) fácilmente distinguibles por su menor tamaño. El sistema de membranas es escaso. El núcleo tiene cromatina ligeramente más descondensada que en un estadio más joven. El nucleolo (Nu) menos compacto se encuentra desplazado lateralmente y unido al NOR.

**c-** Detalle de plastos ameboides (P) que presentan una estrecha relación con cisternas de retículo (RE).



**LAMINA 10**

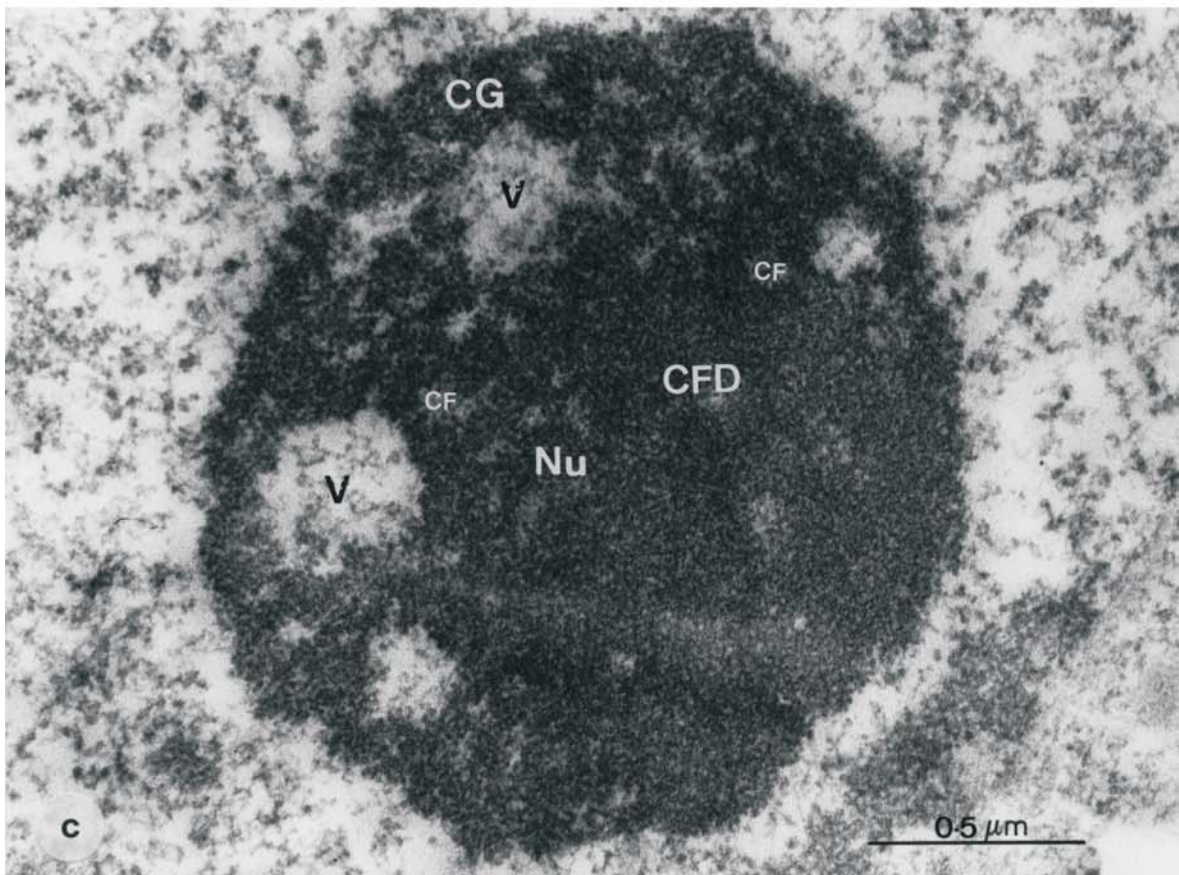
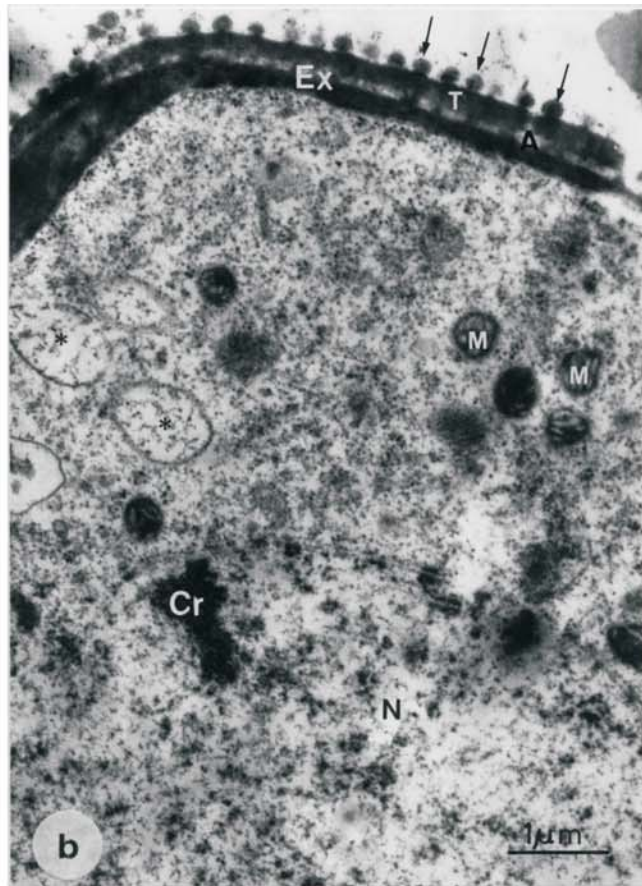
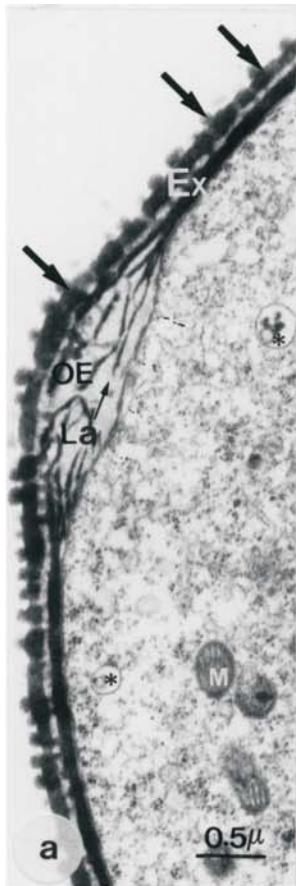
**MICROSPORA RECIÉN LIBERADA**

**a-** Región apertural en la que se observa el oncus de la exina (OE) en forma de lente. Nótese como la endexina se interrumpe en esta región y sus estructuras lamelares (La) se esparcen en la matriz del oncus. Gránulos suprategmiales (flechas).

**b-** Exina (Ex) con todos los elementos estructurales bien desarrollados. Endexina y ectexina tienen la misma densidad electrónica. Columelas muy cortas, arcadas (A) pequeñas, tectum (T) continuo y ornamentación constituida por pequeños gránulos suprategmiales (flechas).

**c-** Masa nucleolar (Nu) constituida por el componente fibrilar denso (CFD) y algo componente granular (CG). En la periferia hay espacios vacuolares rodeados por el componente granular (CG). Obsérvese la existencia de varios centros fibrilares (CF) asociados con vacuolas.





**LAMINA 11**

**MICROSPORA MEDIA**

**a-** Vista general de una microspora media. La ectexina (Ec) más gruesa y ligeramente menos densa a los electrones que la endexina (En). En la región apertural (Ap) en donde la ectexina está interrumpida, se aprecia un engrosamiento de la endexina (En). Entre el plasmalema y la pared, cercanas a la región apertural se observan tres grandes espacios periplásmicos (triángulo) translúcidos a los electrones. En el citoplasma se inicia la presencia de cuerpos osmiófilos (L).

**d-** Acumulación de dictiosomas (D) de cinco a siete cisternas segregando vesículas en sus extremos.

**c-** Vista parcial del citoplasma con algunas cisternas aisladas y cortas de retículo, mitocondrias ovoides (M) y "vesículas-vacuolas" (estrellas) de contenido semejante a los espacios periplásmicos (triángulos).

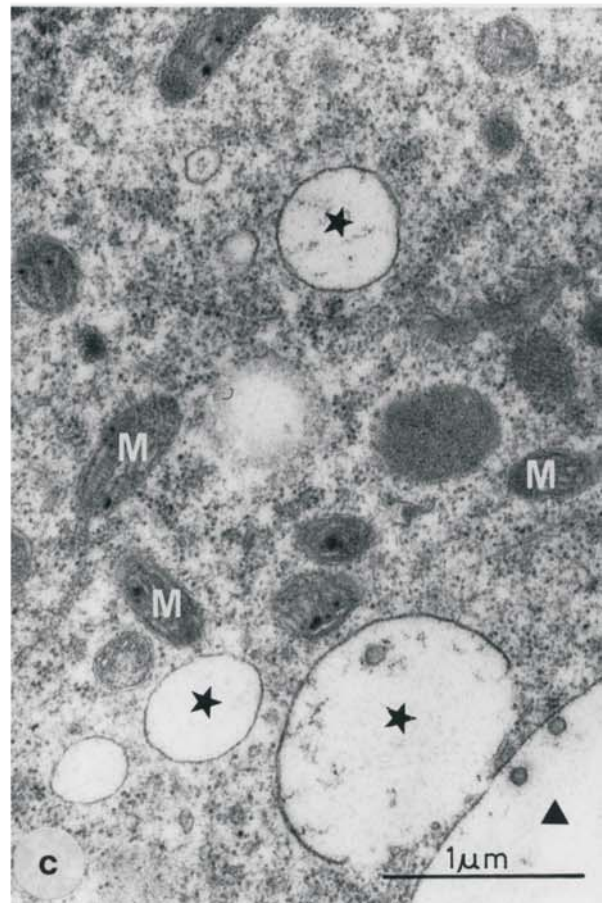
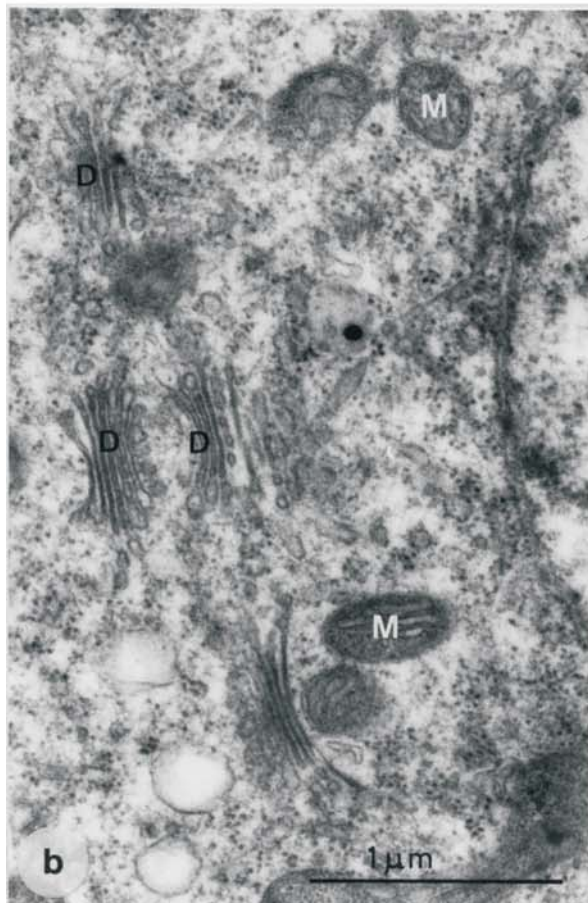
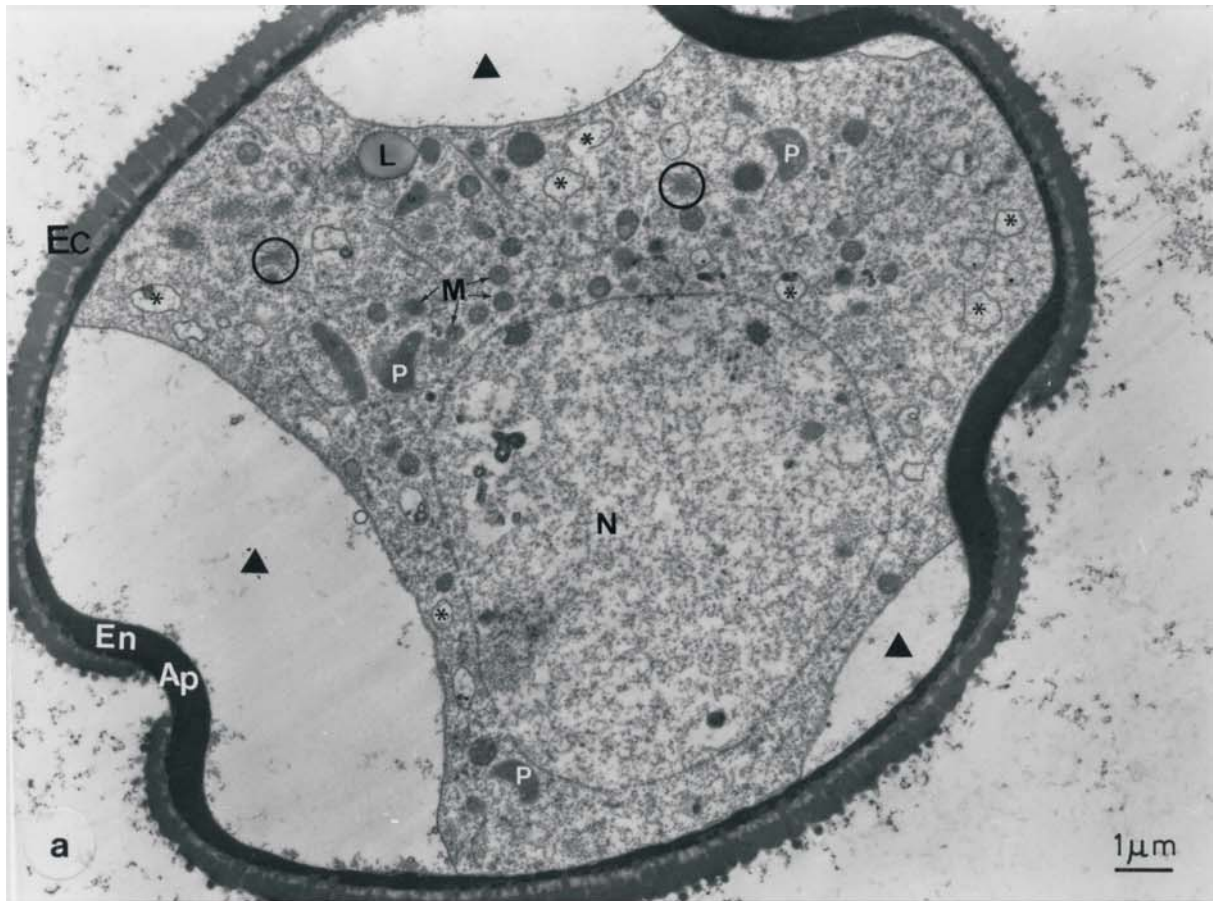


Lámina 11

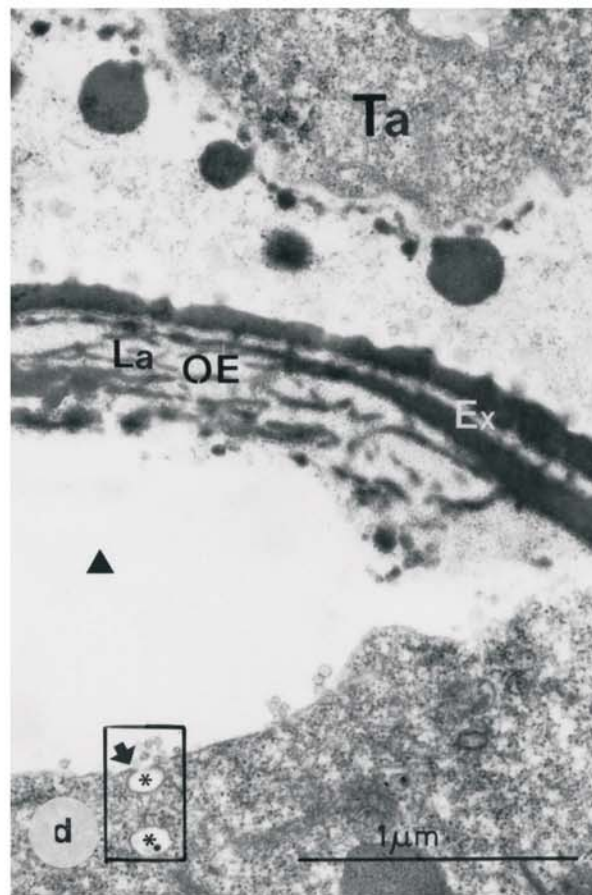
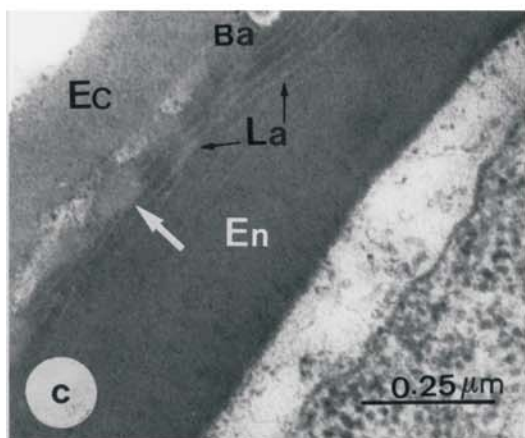
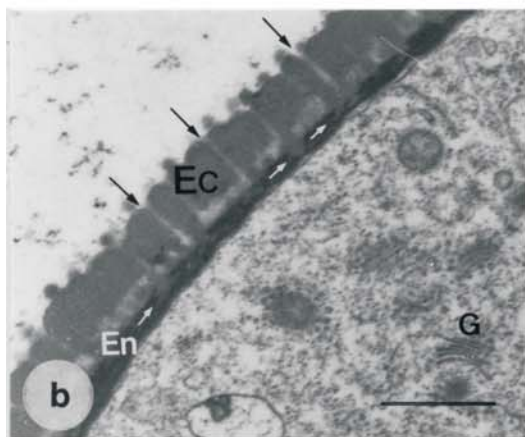
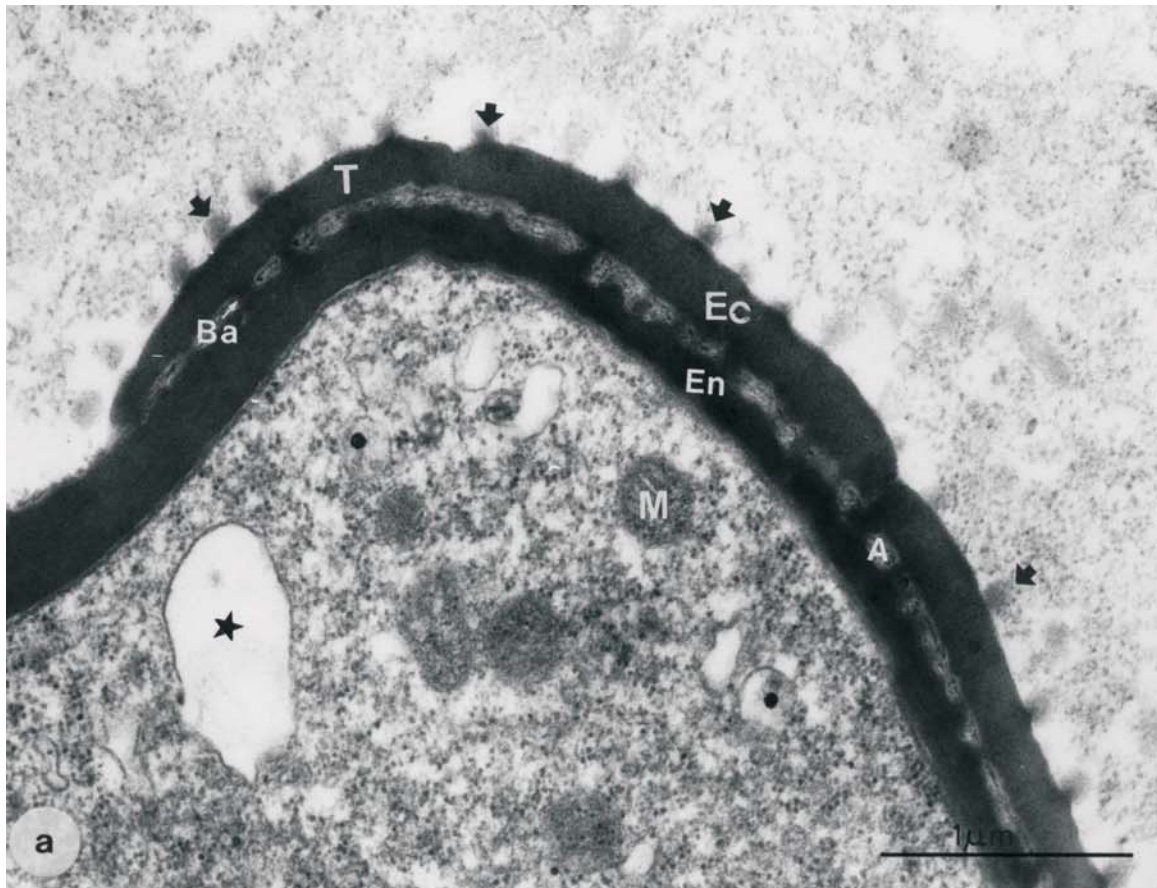
**LAMINA 12**

**MICROSPORA MEDIA**

**a-** Detalle de la exina en la que los gránulos supratectales están más difuminados (flechas) por engrosamiento del tectum (T). La endexina (En) presenta un grosor similar a la exina. En las arcadas (A) se puede apreciar material fibrilar.

**b y c-** Detalle de la exina en la que se aprecia como las columelas se introducen directamente (flechas blancas) en la endexina (En) al no existir capa basal. El tectum de la ectexina está interrumpido por microcanales (flechas) que comunican el espacio de las arcadas con el exterior. Estructuras lamelares presentes en la parte más externa de la endexina (En).

**d-** Región apertural con espacio periplásmico (triángulo) translúcido a los electrones y en forma de lente situado debajo del oncus de la exina (OE). Vesículas citoplásmicas (asteriscos) fundiendo con el plasmalema (flecha) y poniendo en contacto su contenido con el de la matriz del espacio periplásmico.

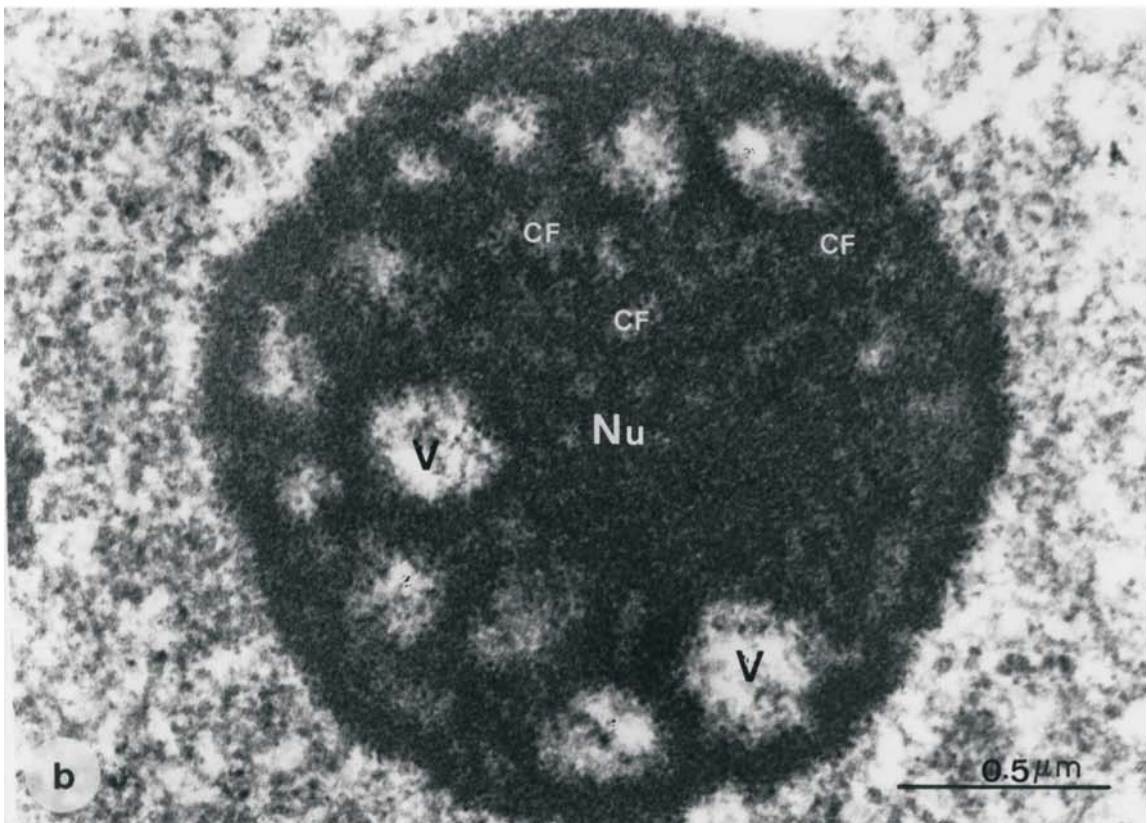
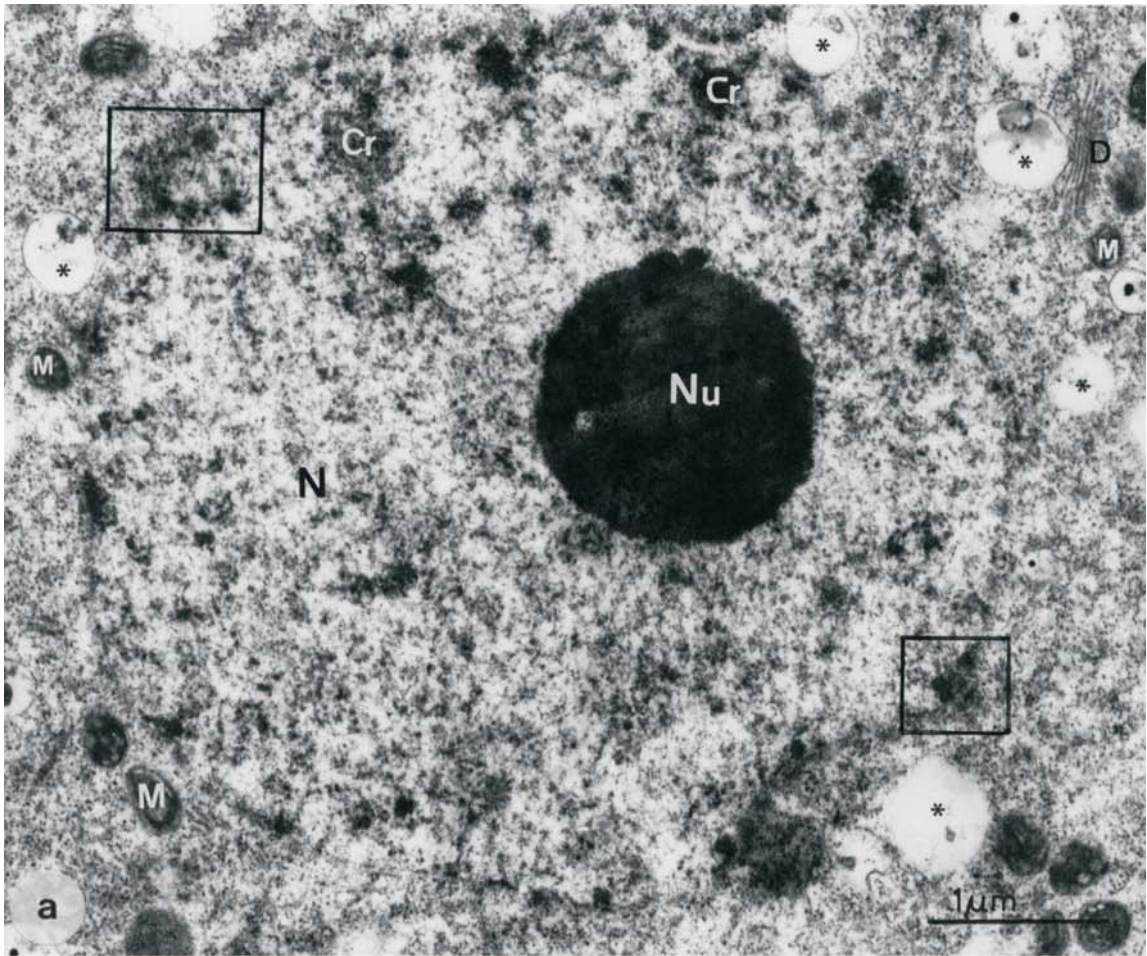


**LAMINA 13**

**MICROSPORA MEDIA**

**a-** Núcleo de microspora media en el que se aprecia un incremento del material condensado por todo el nucleoplasma. la cubierta nuclear presenta poros nucleares. Obsérvese la presencia de masas de material fibrilar denso a ambos lados de la cubierta nuclear (recuadros). Nucleolo (Nu) muy compacto.

**b-** Nucleolo con los componentes fibrilar denso y granular entremezclados. Presencia de centros fibrilares por toda la masa nucleolar pudiendo estar asociados a vacuolas, situadas generalmente en la periferia nucleolar.



**LAMINA 14**

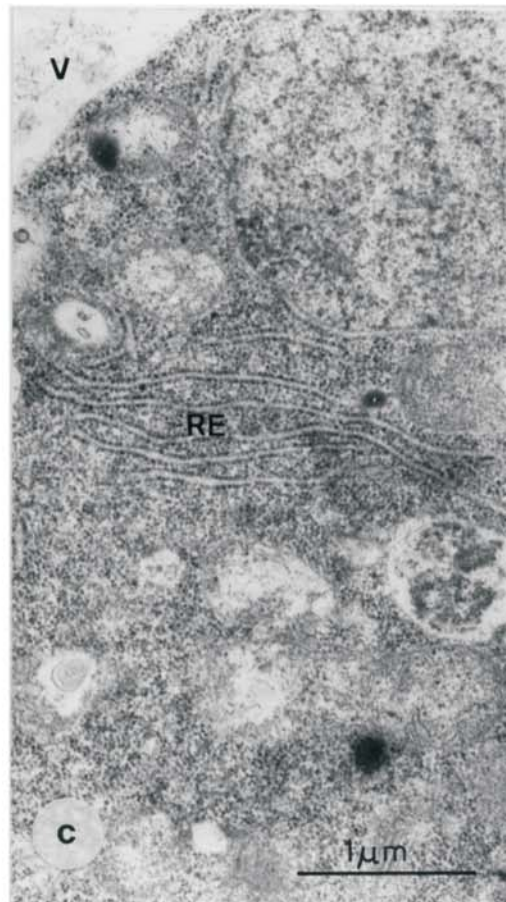
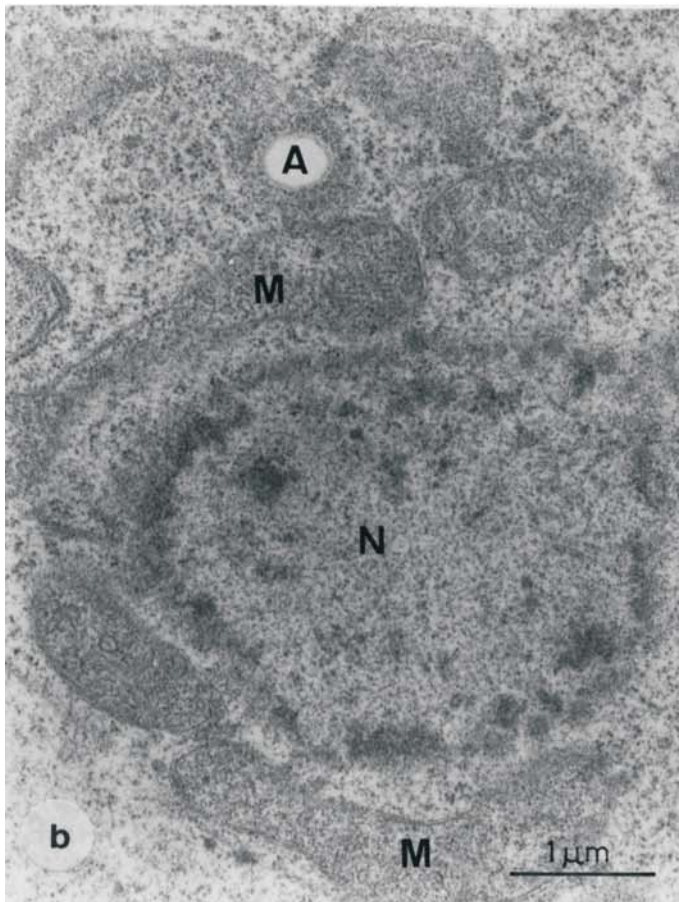
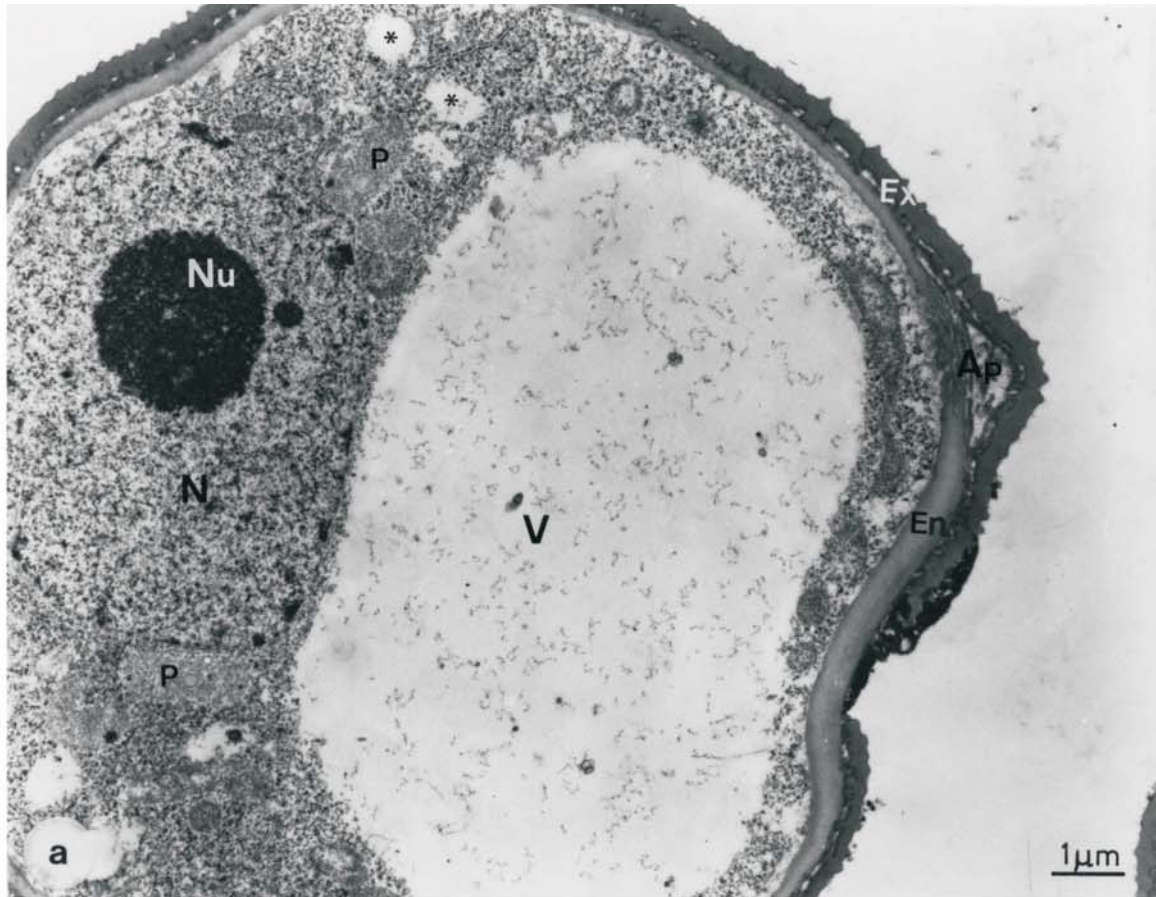
**MICROSPORA VACUOLADA**

**a-** Microspora vacuolada con un citoplasma denso en ribosomas. Una gran vacuola (V) ocupando gran parte del citoplasma y que contiene material fibrilar. El núcleo se encuentra desplazado hacia un lateral del grano, en dirección opuesta a una de las aperturas (Ap).

**b-** Mitocondrias (M) alargadas y de gran tamaño dispuestas alrededor del núcleo (N). Se observan los primeros indicios de almidón (A) dentro de un plasto.

**c-** Grupo de cisternas largas de retículo endoplásmico rugoso (REr).



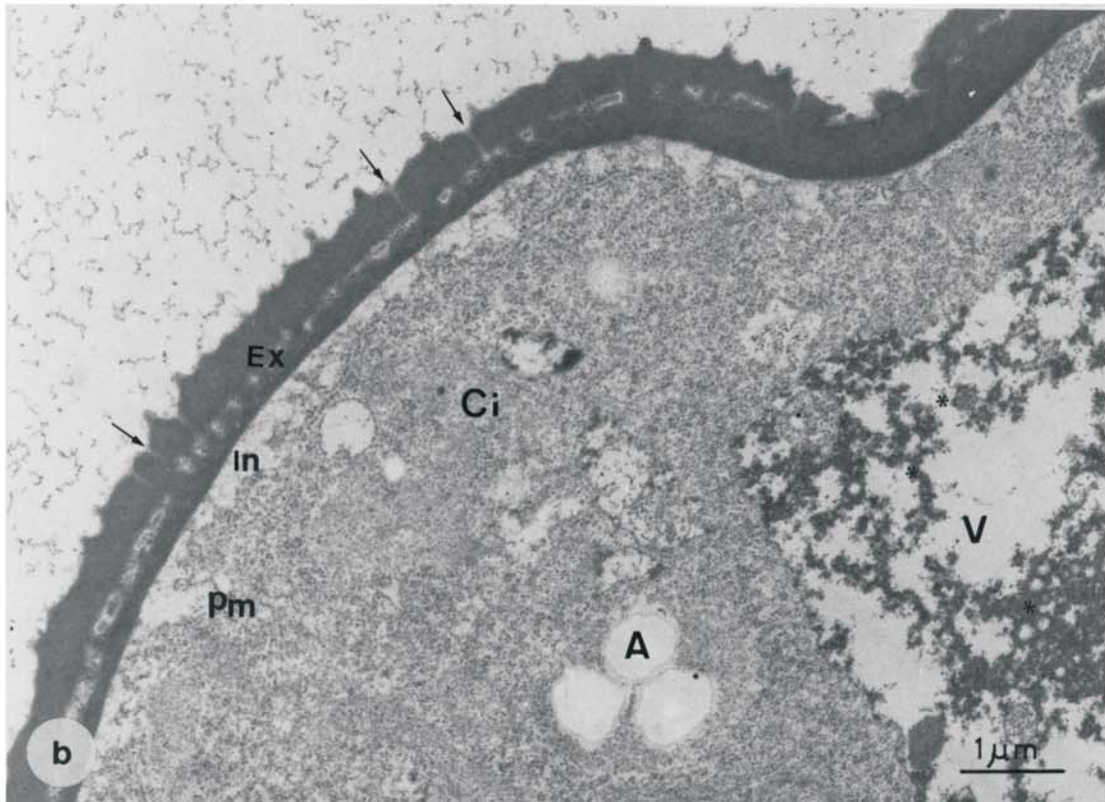
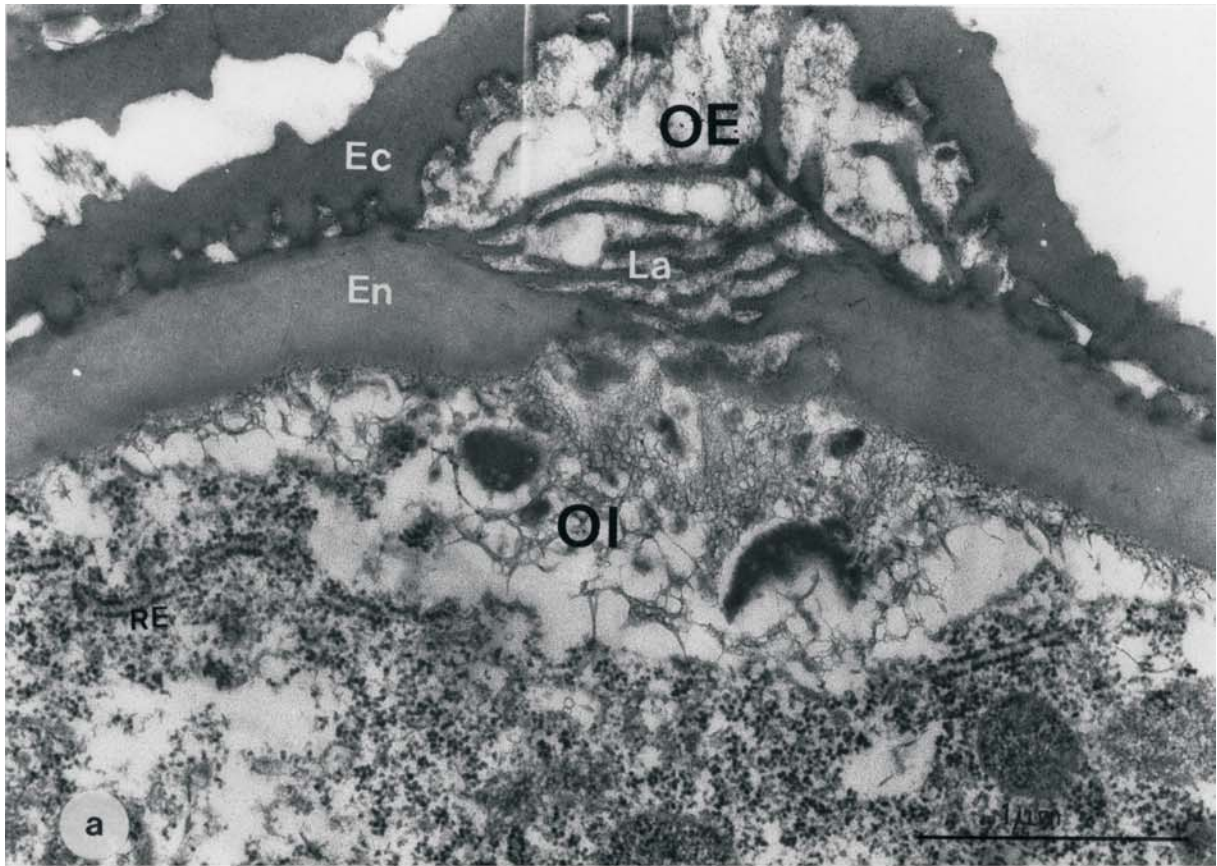


**LAMINA 15**

**MICROSPORA VACUOLADA**

**a-** Región apertural costituida por el oncus de la intina (OI) en forma de lente debajo del oncus de la exina (OE) el cual, a su vez, aparece recubierto por la ectexina (EC). La endexina (En) se interrumpe en la región apertural quedando visibles sus estructuras lamelares (La).

**b-** Citoplasma rico en ribosomas con algunos granos de almidón (A). Plasmalema (Pm) muy ondulado, dejando un espacio debajo de la exina donde se está formando la intina (In). La vacuola (V) presenta abundante material fibrogranular.

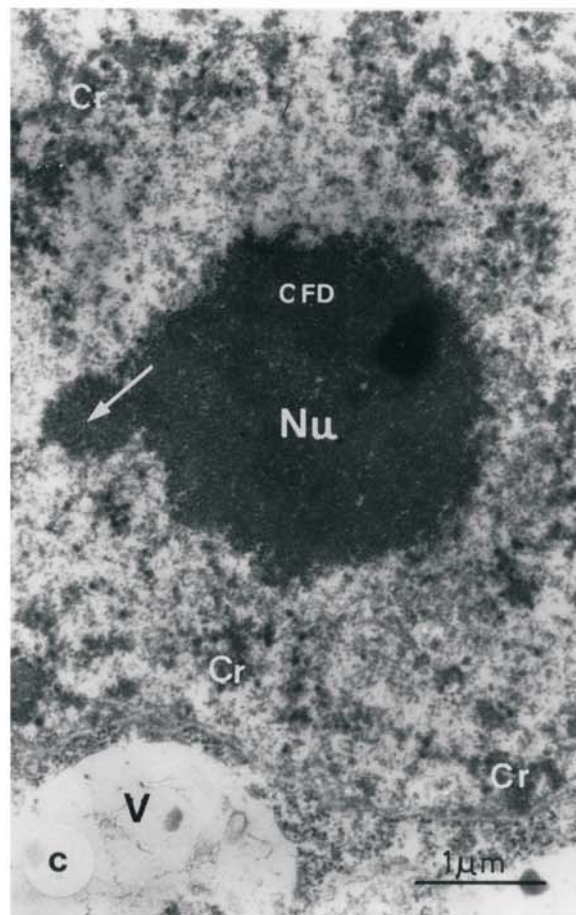
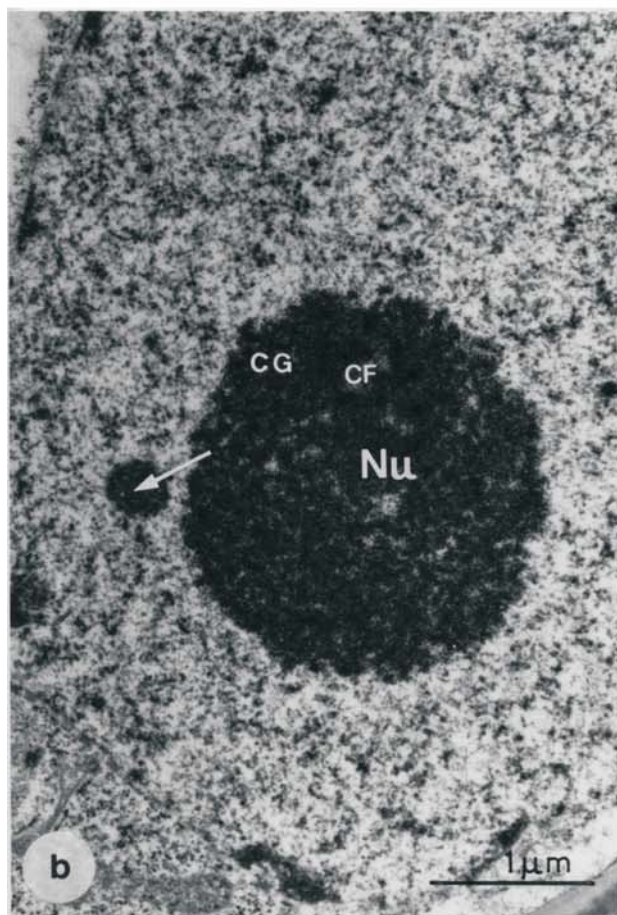
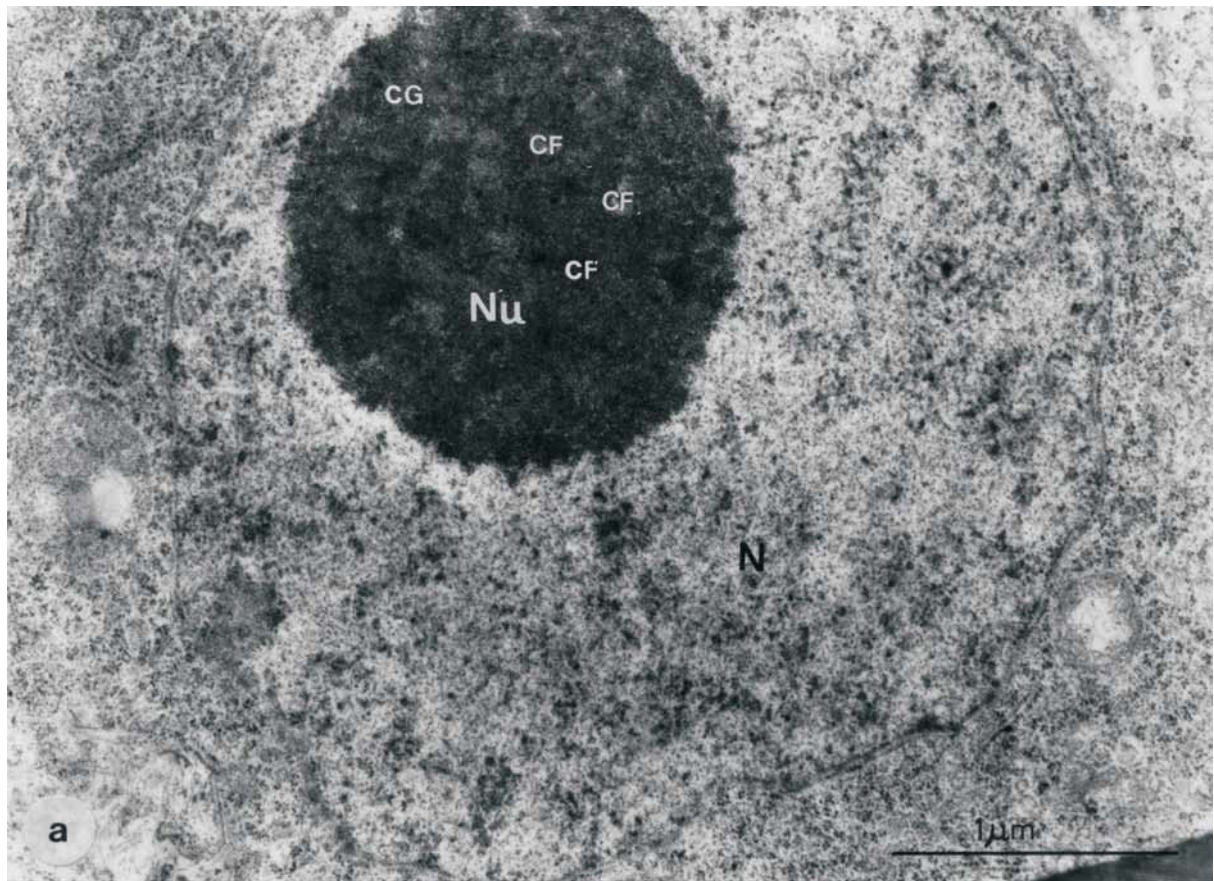


**LAMINA 16**

**MICROSPORA VACUOLADA**

**a, b-** Núcleos (N) de microspora vacuolada presentando la cromatina descondensada. Nucleolo (Nu) bien organizado con numerosos y pequeños centros fibrilares (CF) y los componentes fibrilar denso (CFD) y granular (CG) entremezclados.

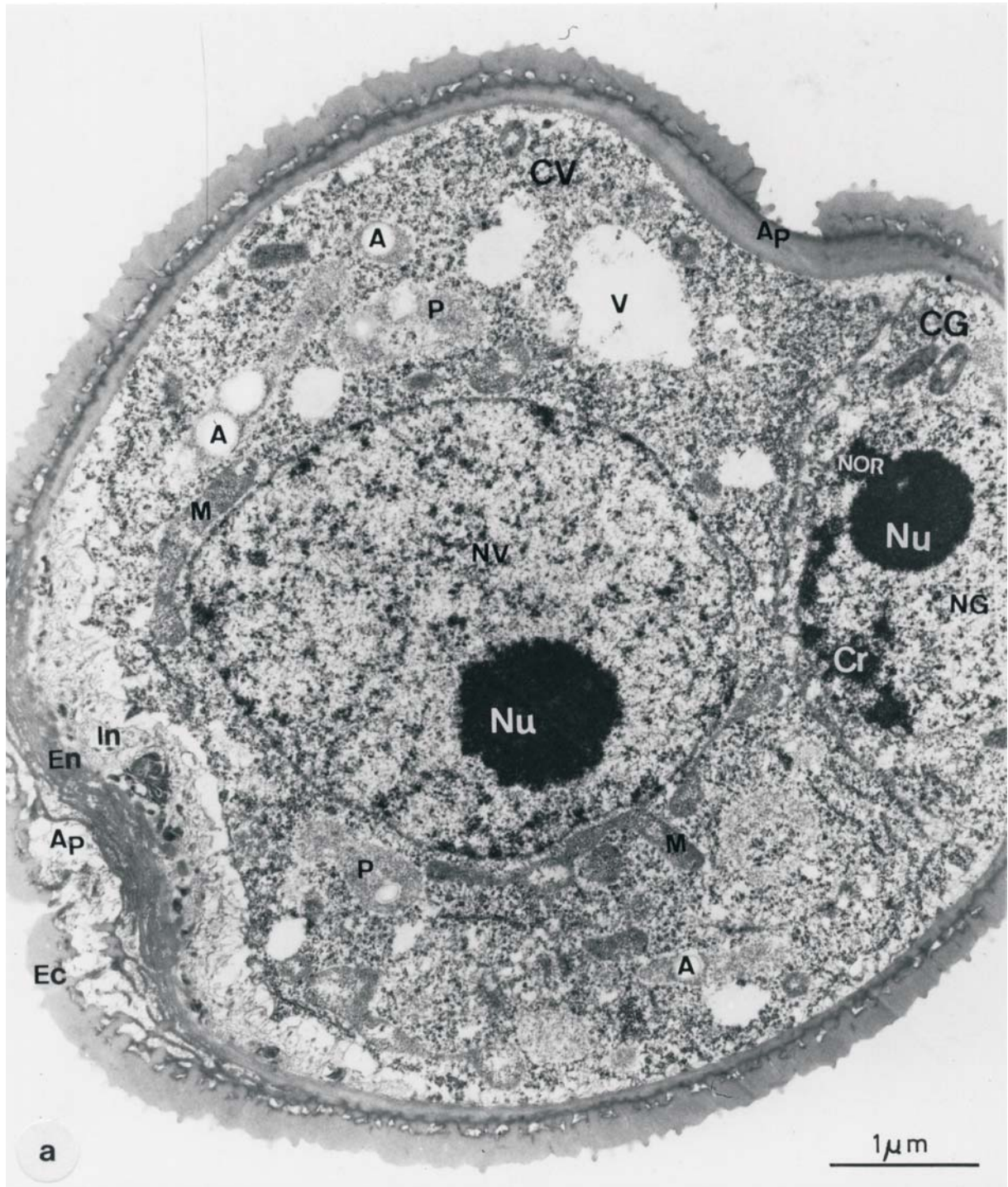
**c-** Núcleo en un estadio más avanzado de una microspora vacuolada, en el que se observa la cromatina ligeramente más condensada (Cr). El nucleolo es más compacto y predomina el componente fibrilar denso. Cuerpo nuclear pequeño (flecha) en las cercanías del nucleolo.



**LAMINA 17**

**GRANO BICELULAR JOVEN**

**a-** Vista general de un polen bicelular joven. Citoplasma vegetativo con elevada densidad de orgánulos y ribosomas. Núcleo vegetativo y generativo presentan una descondensación de la cromatina similar. Los nucleolos de ambos núcleos presentan una polarización, que se refleja tanto en su posición excéntrica, como en la mayor acumulación de masas de cromatina condensada en el extremo próximo al nucleolo.



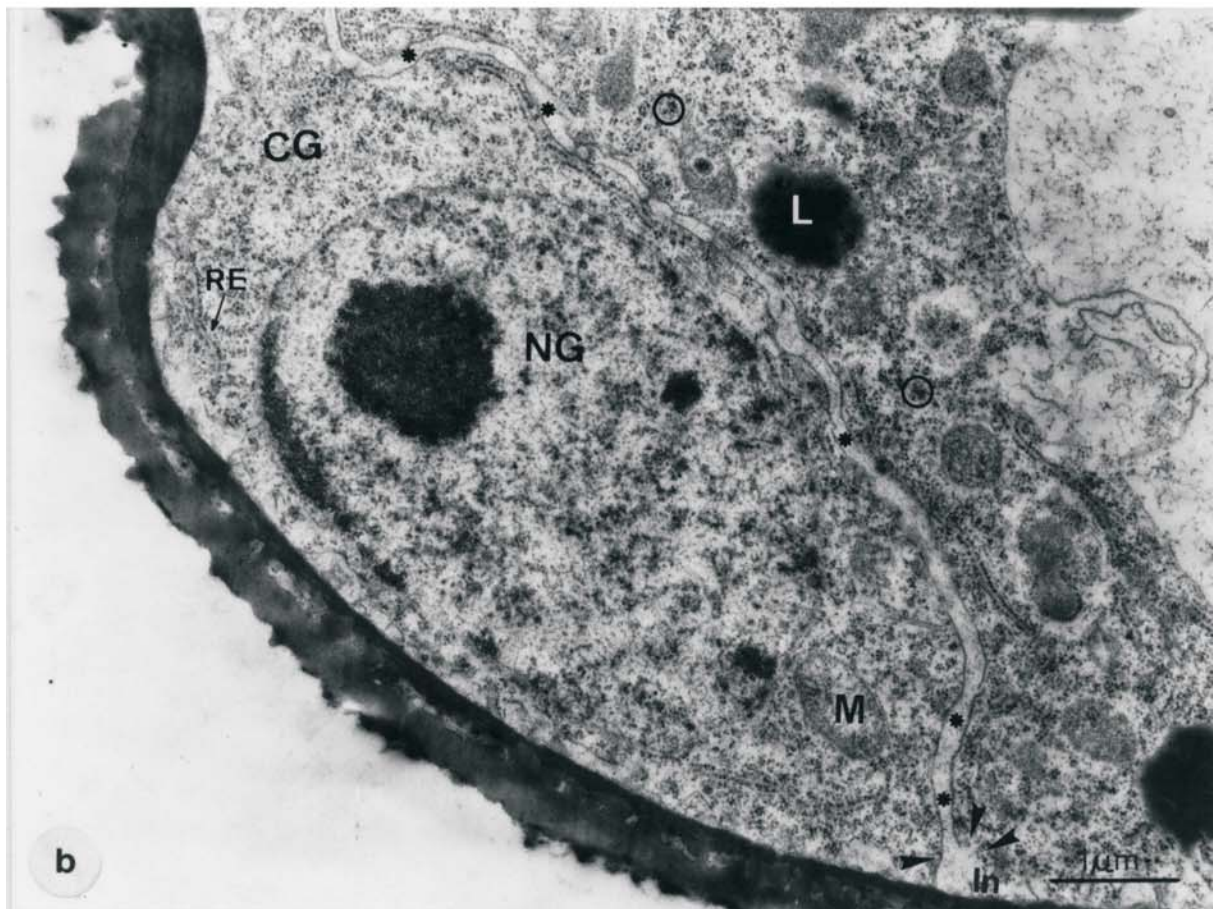
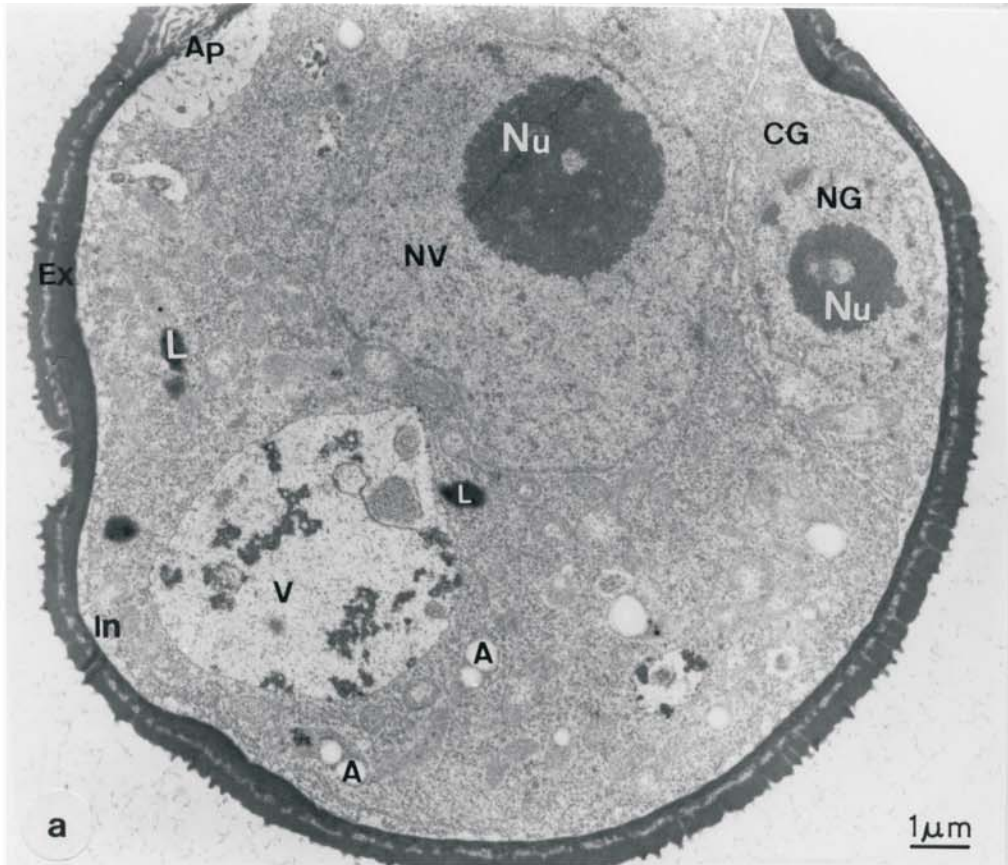
**LAMINA 18**

**GRANO BICELULAR JOVEN**

**a-** Grano bicelular joven. Citoplasma vegetativo con una vacuola (V) que presenta material fibrilo-granular en su interior. El núcleo generativo (NG) presenta la cromatina ligeramente más condensada en la periferia que el vegetativo (NV), la cual está prácticamente descondensada. Ambos nucleolos, con un volumen proporcional al del núcleo donde se encuentran, presentan vacuola central. Sin embargo el nucleolo generativo responde más a una estructura en anillo en contacto con el NOR.

**b-** Célula generativa (CG) de forma lenticular, adosada a la pared del polen. La pared de la célula generativa (asteriscos) se funde con la intina (In). El citoplasma presenta pocos orgánulos y pocas cisternas de retículo (RE) y su densidad ribosómica es similar a la del citoplasma. El núcleo ocupa la mayor parte del volumen celular. Los ribosomas se encuentran agrupados en polisomas.

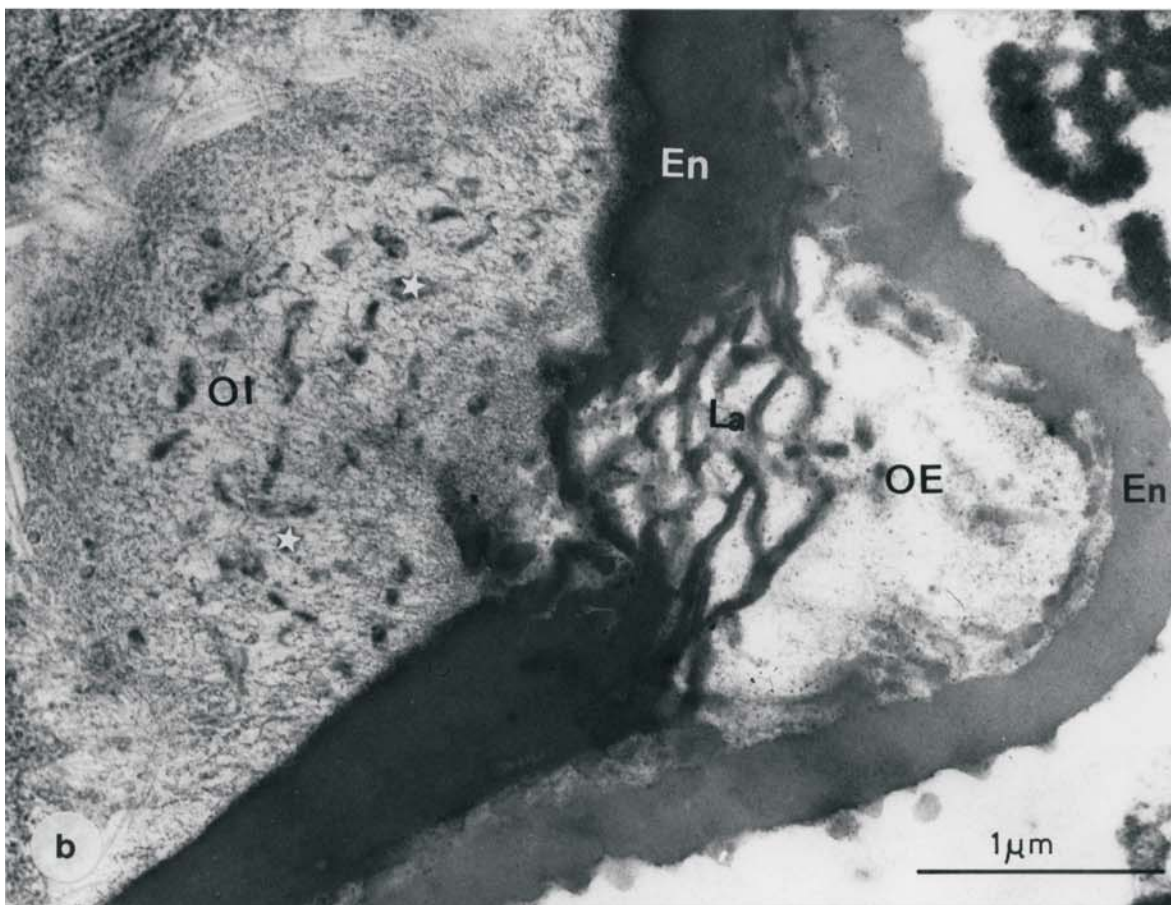
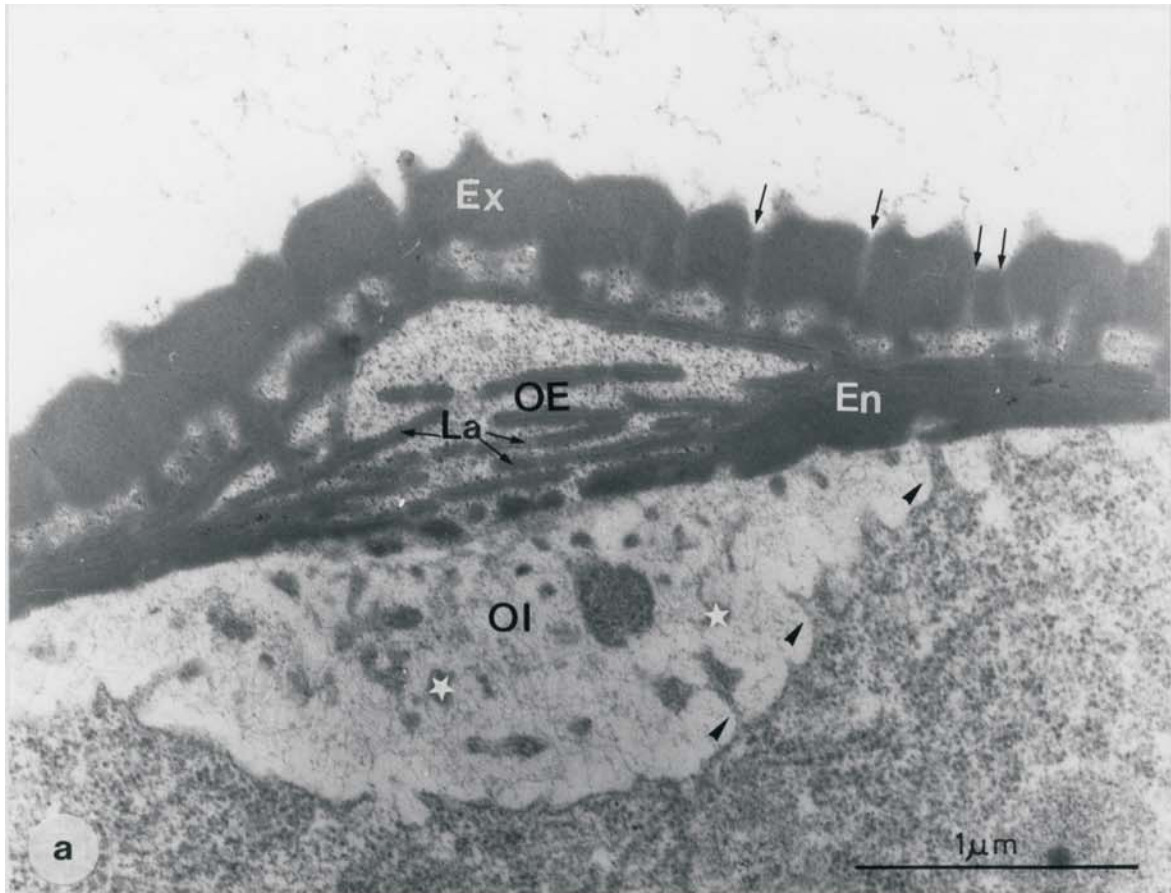




**LAMINA 19**

**POLEN BICELULAR JOVEN**

**a, b-** Región apertural. El oncus de la exina (OE), cubierto por la ectexina, mantiene su forma lenticular presentando una protuberancia hacia el exterior. El oncus de la intina (OI), también lenticular, presenta tubulaciones (estrellas blancas) inmersas en una matriz fibrilar. Las tubulaciones proceden del citoplasma por invaginaciones del plasmalema (cabezas de flecha).

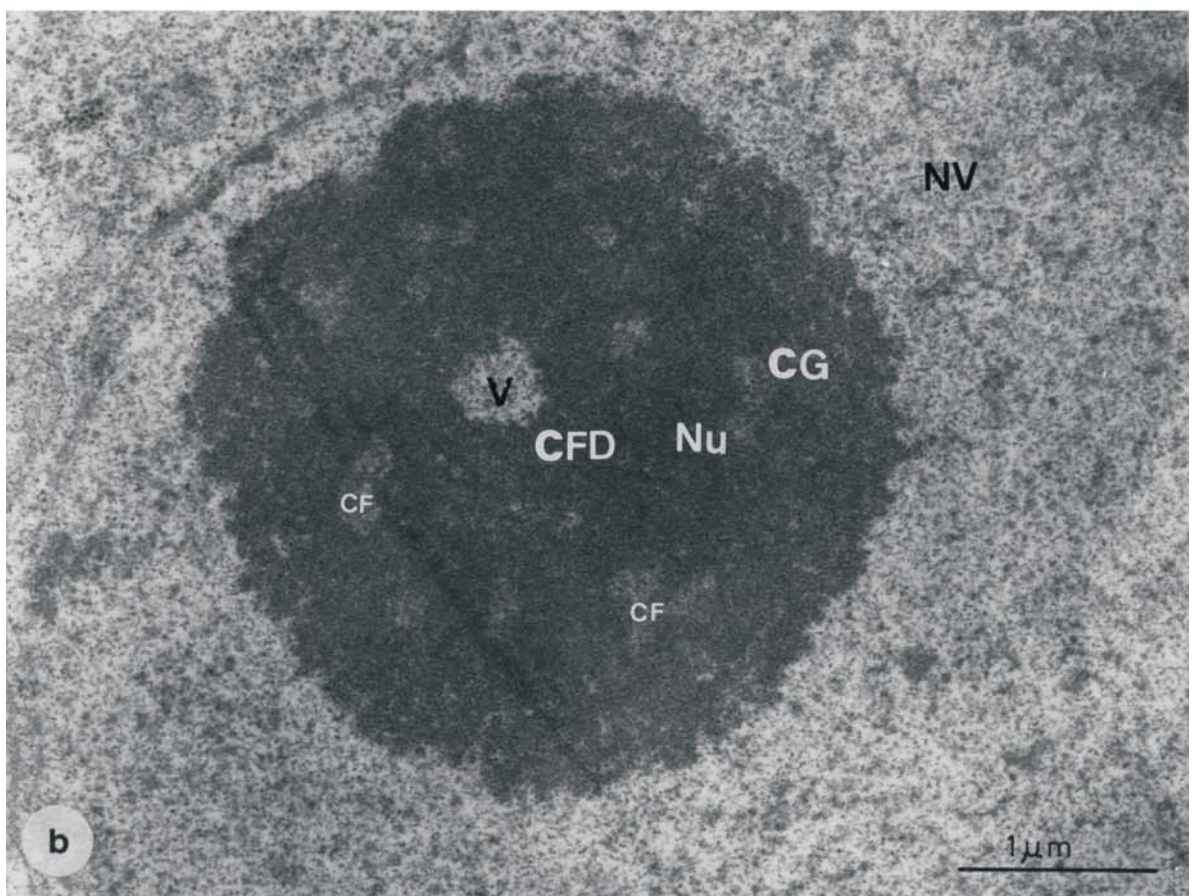
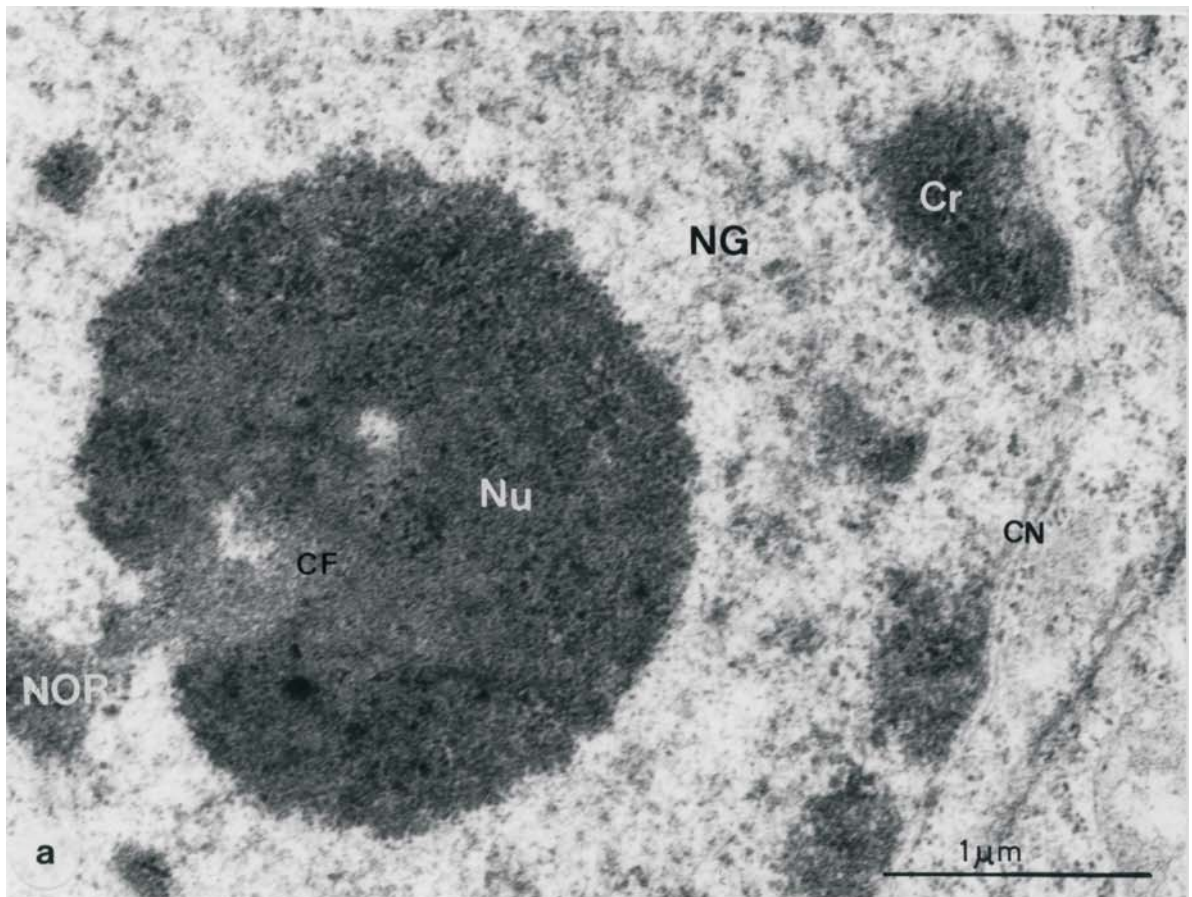


**LAMINA 20**

**POLEN BICELULAR JOVEN**

**a-** Núcleo generativo con masas de cromatina (Cr) de tamaño considerable adosadas a la cubierta nuclear (CN). Este núcleo presenta un centro fibrilar grande (CF) unido al NOR y rodeado por sus componentes fibrilar y algo de granular.

**b-** Núcleo vegetativo con la cromatina descondensada. Gran nucleolo con una estructura completamente diferente: numerosos centros fibrilar (CF) homogéneos y pequeños dentro del componente fibrilar denso (F). Mayor cantidad de componente granular con un cierto grado de segregación en la periferia (G).



**LAMINA 21**

**POLEN BICELULAR MEDIO**

**a-** Grano bicelular medio. Citoplasma muy rico en orgánulos con gran cantidad de material de reserva: almidón (A) y cuerpos osmiófilos (L).

**b-** Amiloplastos (A) rodeados por cisternas de retículo (RE).

**c-** Mitocondria (M) con crestas largas, dictiosomas (D) pequeños con cuatro o cinco cisternas y vesículas diminutas en sus extremos. Material fijado sólo con glutaraldéhid.

**d-** Grano de polen con la célula generativa rodeada por su pared e inmersa en el citoplasma vegetativo, el cual muestra gran cantidad de almidón.

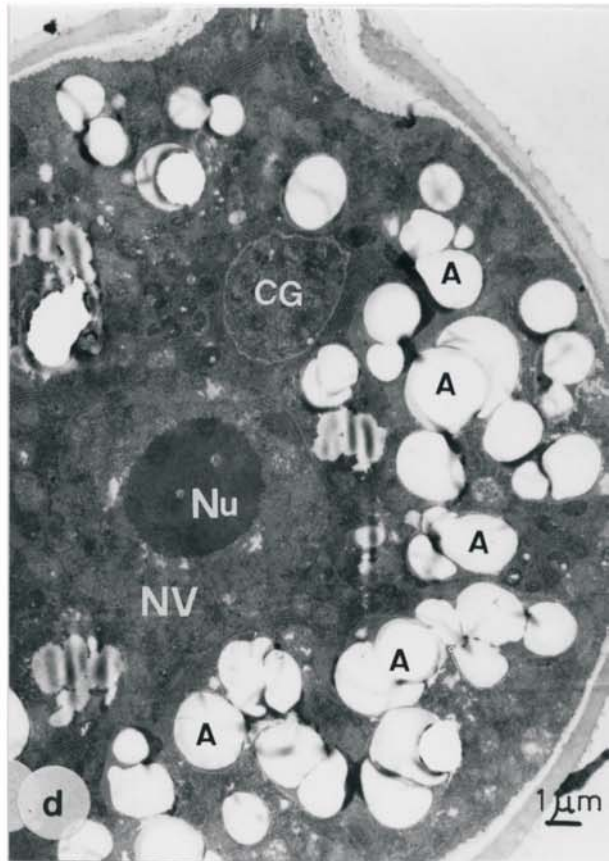
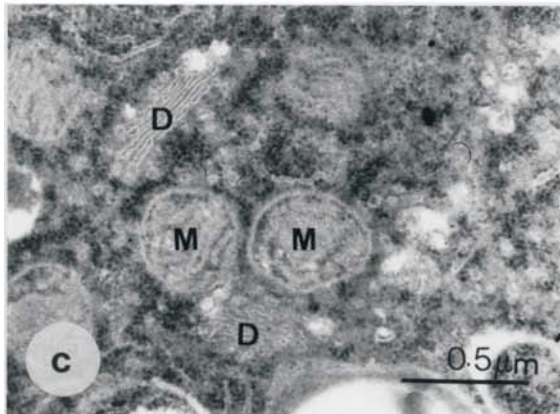
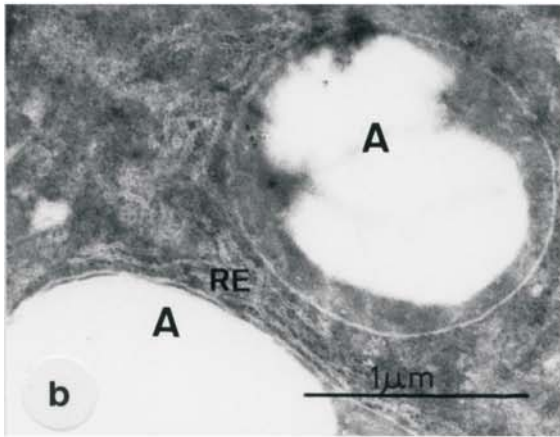
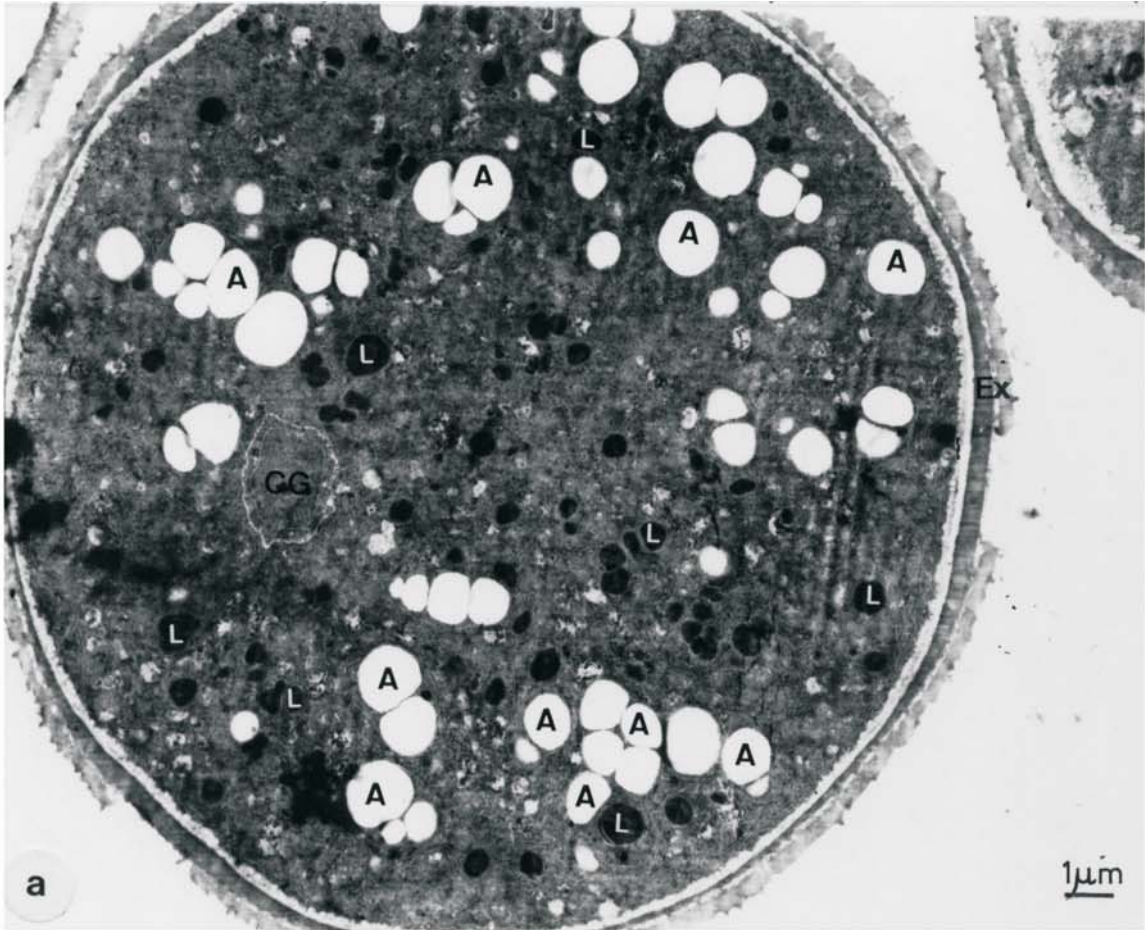


Lámina 21

**LAMINA 22**

**POLEN BICELULAR MEDIO**

**a-** Detalle de la exina. La ectexina (Ec) formada por un tectum (T) grueso y continuo, sólo interrumpido por microcanales (flechas). Las columelas (Ba) son cortas y macizas apoyándose directamente en la endexina.

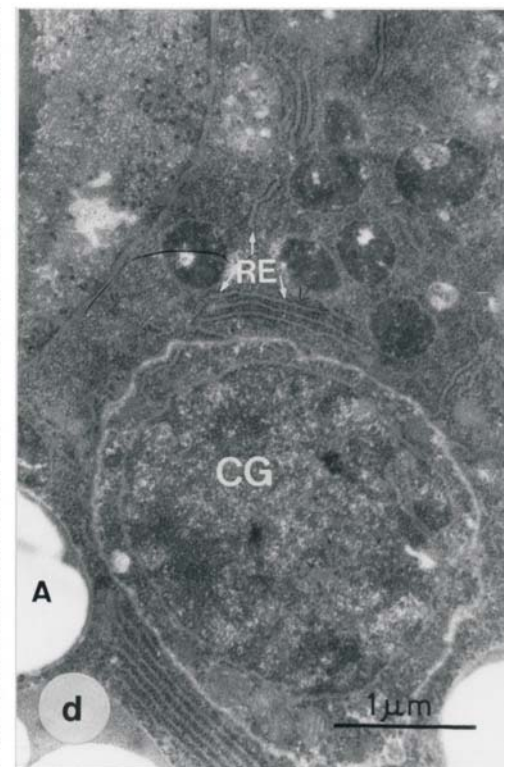
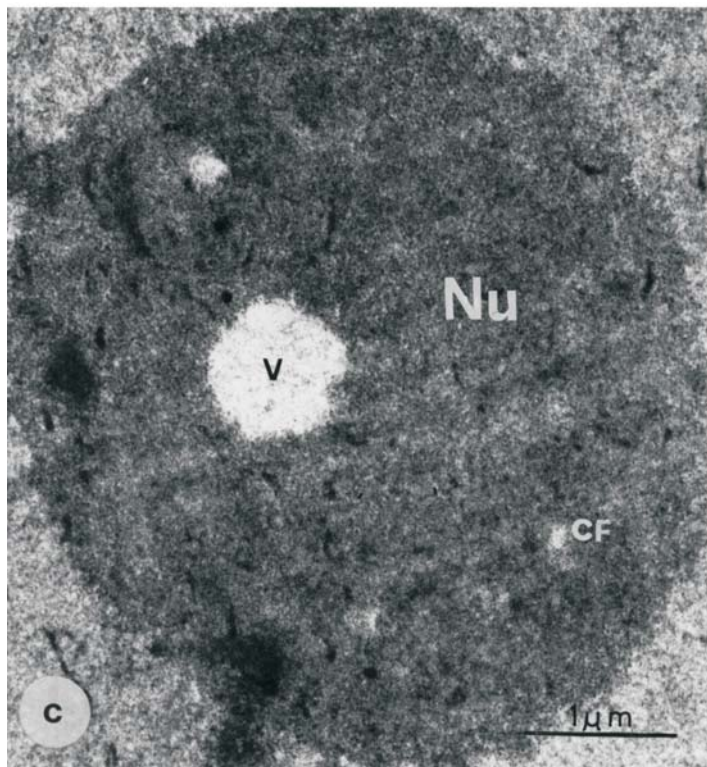
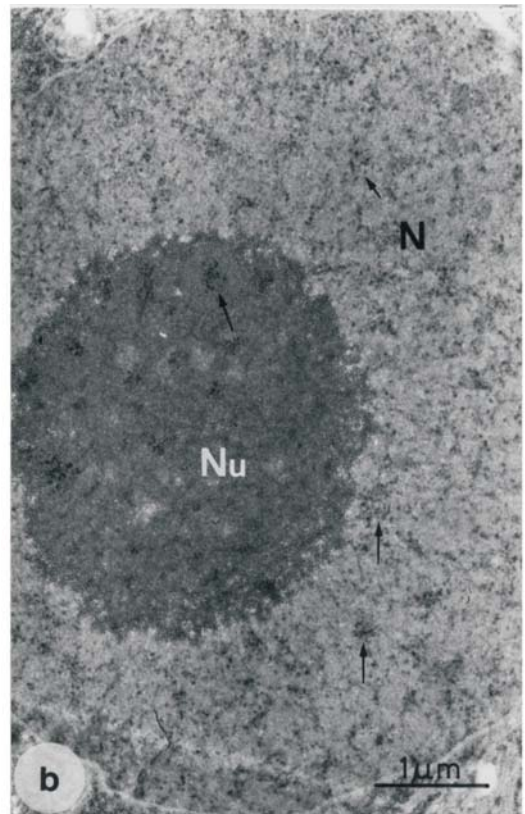
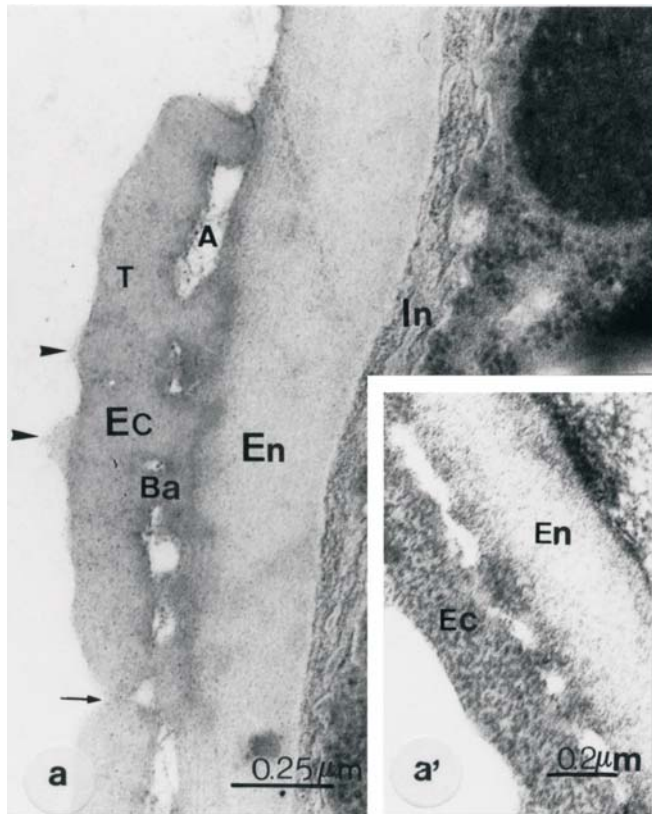
**á-** Exina en la que se puede apreciar como el material de la ectexina no es homogéneo sino que presenta un ligero punteado.

**b-** Núcleo vegetativo con cromatina descondensada. Nucleoplasma con gran cantidad de fibras y gránulos (flechas), también localizados en el nucleolo. Nucleolo con centros fibrilar es pequeños y homogéneos (CF). Componente granular parcialmente segregado.

**c-** Nucleolo vegetativo con una vacuola central, centros fibrilares pequeños (CF).

**d-** Célula generativa inmersa dentro del citoplasma vegetativo y rodeada por grupos de cisternas de RE rugoso. El núcleo ocupa la mayor parte del volumen celular, con la cromatina parcialmente condensada.





**LAMINA 23**

**POLEN BICELULAR MADURO**

- a-** Polen bicelular maduro. Citoplasma lleno de vesículas y otros orgánulos.
- b, d-** Fijación solamente con glutaraldéhidro por lo que las estructuras osmiofilas, como membranas y cuerpos lipídicos, no están teñidos destacándose muy bien dentro de un citoplasma que presenta un alto grado de densidad electrónica. Mitocondrias (M) de crestas largas y bien patentes, con zonas de degradación en su matriz (asterisco). Plastos sin almidón (P). Cuerpos lipídicos (L) rodeados por una cisterna de RE rugoso.
- c-** Célula generativa con una pared altamente lobulada (flechas gruesas) y rodeada por cisternas de RE rugoso. El núcleo tiene la cromatina muy condensada.
- e-** Cuerpos lipídicos (L), rodeados por más de una cisterna de retículo endoplásmico rugoso (RE).

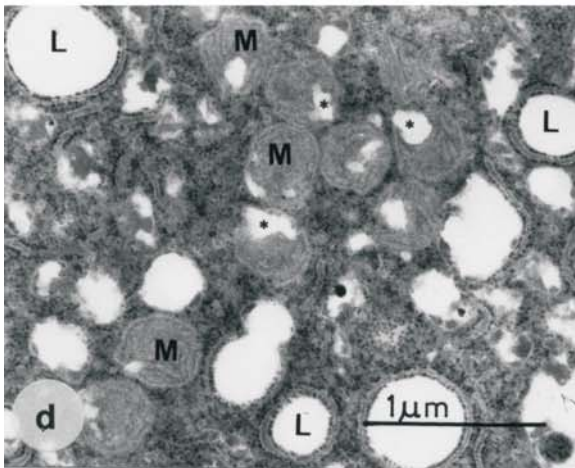
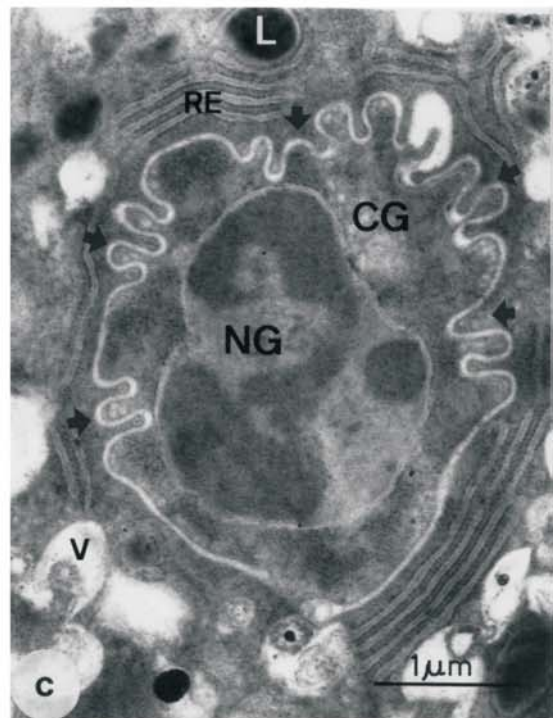
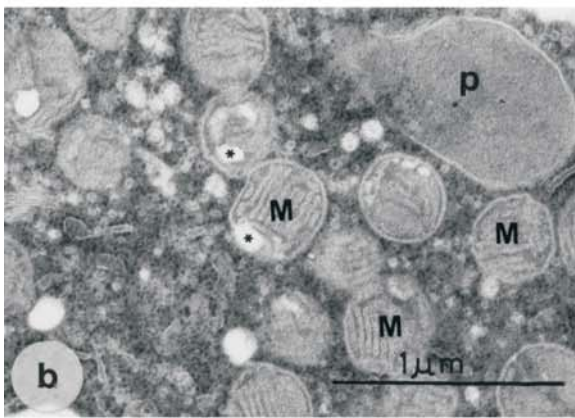
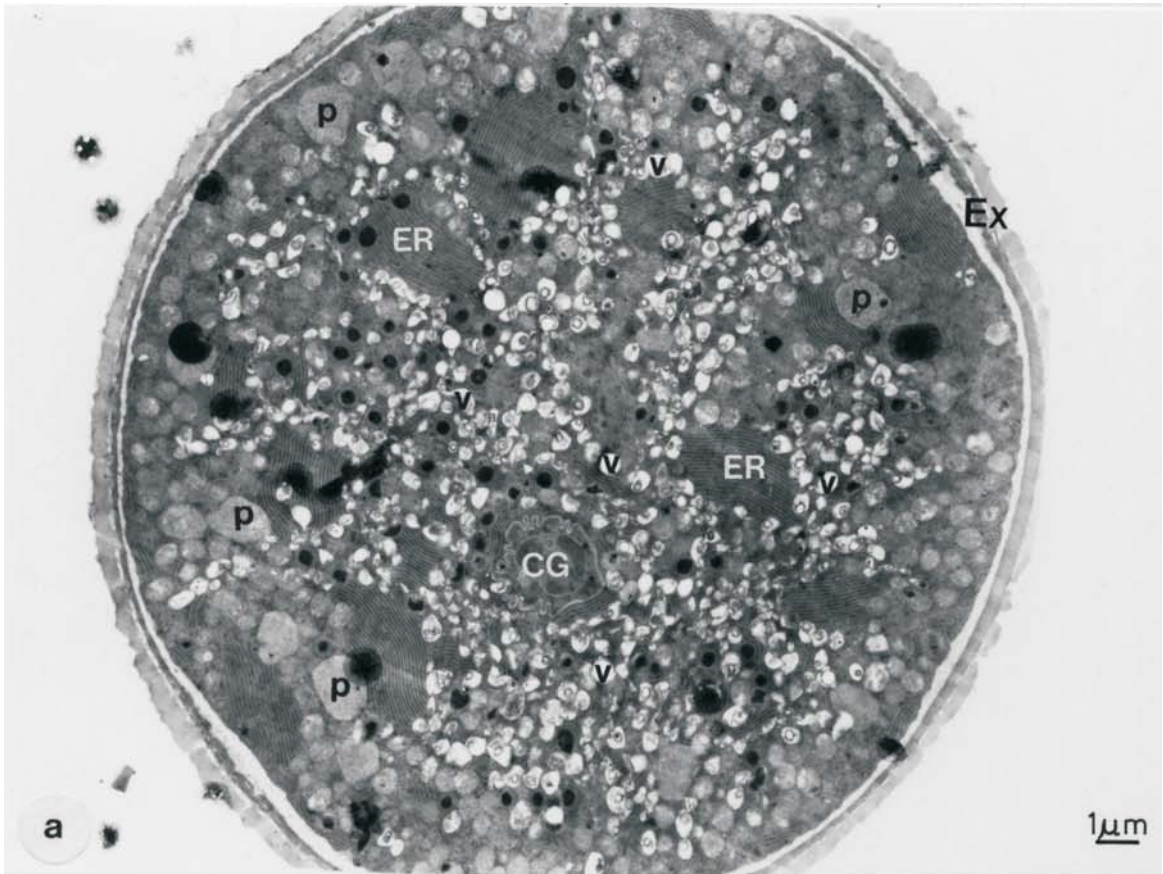


Lámina 23

**LAMINA 24**

**POLEN BICELULAR MADURO**

**a-** Citoplasma del grano maduro muy rico en orgánulos con los dos núcleos vegetativo (NV) y generativo (NG). El núcleo vegetativo ha perdido la forma esférica siendo ahora lobulado. El núcleo generativo tiene la misma forma alargada que la célula generativa (CG). Ambos presentan cromatina muy condensada y ausencia de nucleolo.

**b-** Agrupación de cisternas de RE rugoso paralelas entre sí y muy dilatadas. Se aprecia fragmentación y vesiculación de esta cisternas (triángulos). Las vesículas primarias no pierden los ribosomas los cuales muestran un elevado contraste (flechas).

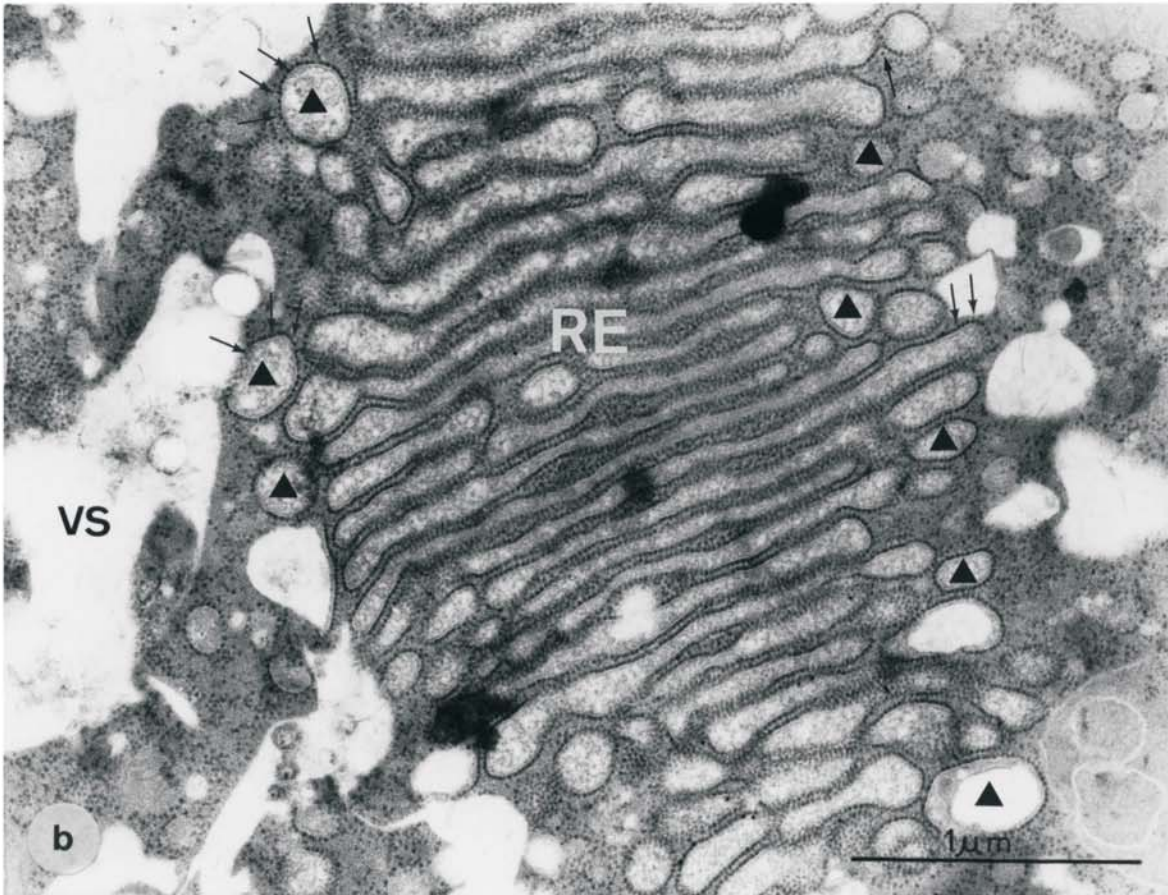
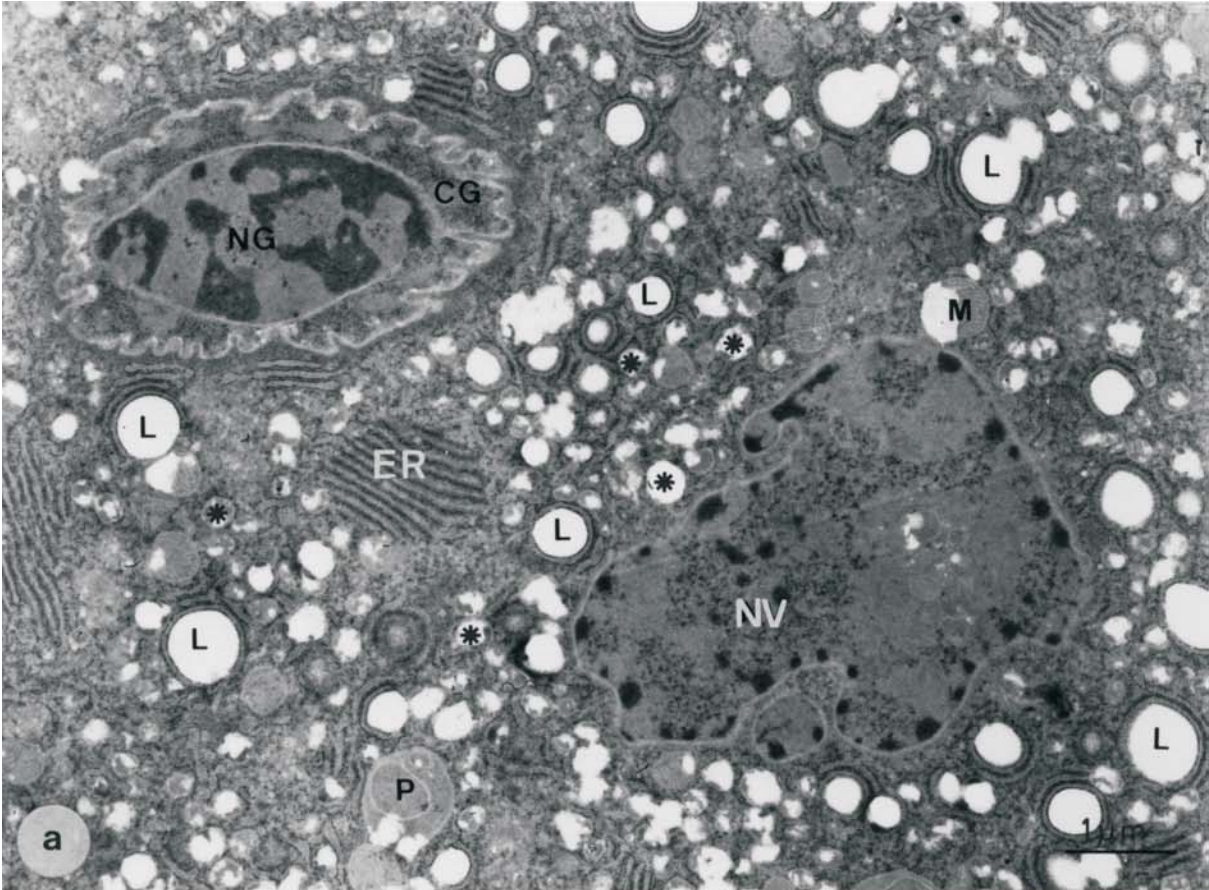


Lámina 24

**LAMINA 25**

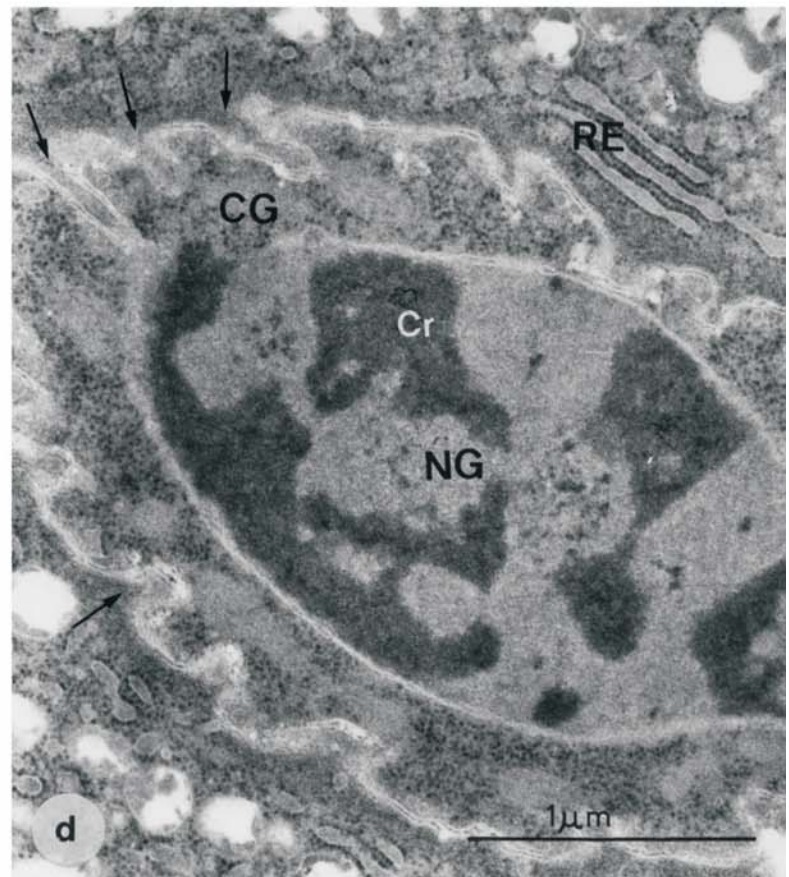
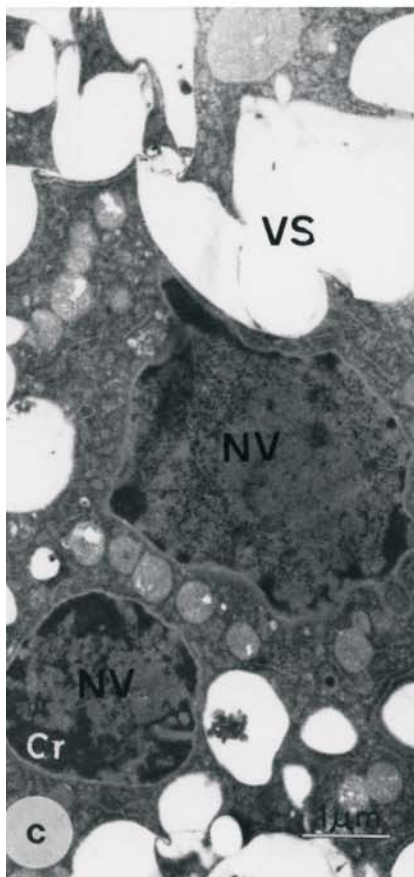
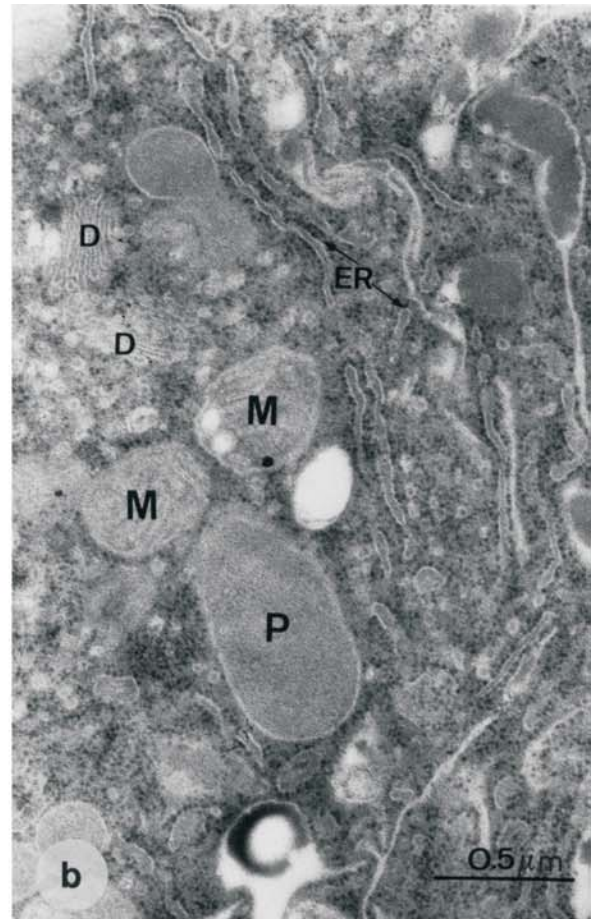
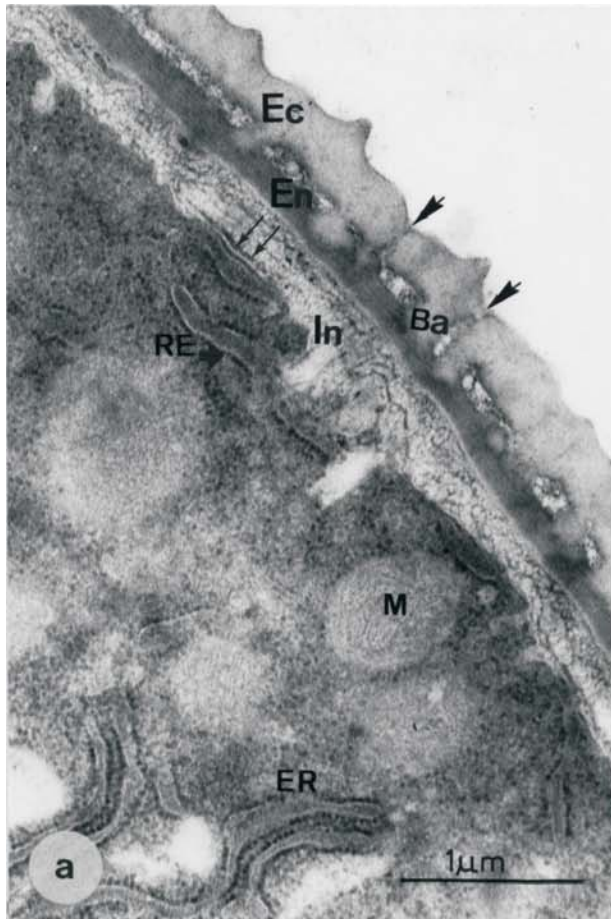
**POLEN BICELULAR MADURO**

**a-** Pared del polen maduro completa con exina (Ex) e intina (In), esta última constituida por un material fibrilar. Continua la presencia de microcanales en el tectum (cabeza de flecha). En el citoplasma las cisternas de retículo endoplásmico rugoso (RE) están llenas de material denso a los electrones, muchas de ellas se disponen justo debajo del plasmalema de forma paralela (flechas).

**b-** Detalle del citoplasma rico en organelas: Dictiosomas (D), mitocondrias (M), plastos (P). Material fijado sólo con glutaraldehido.

**c-** Citoplasma altamente vesiculado con el núcleo vegetativo (NV) representado por dos compartimentos aparentemente independientes que corresponden a dos lóbulos del mismo.

**d-** Célula generativa con pared muy ondulada (flechas). El núcleo generativo presenta grandes masas de cromatina condensada (Cr) en un nucleoplasma de matriz grisácea.



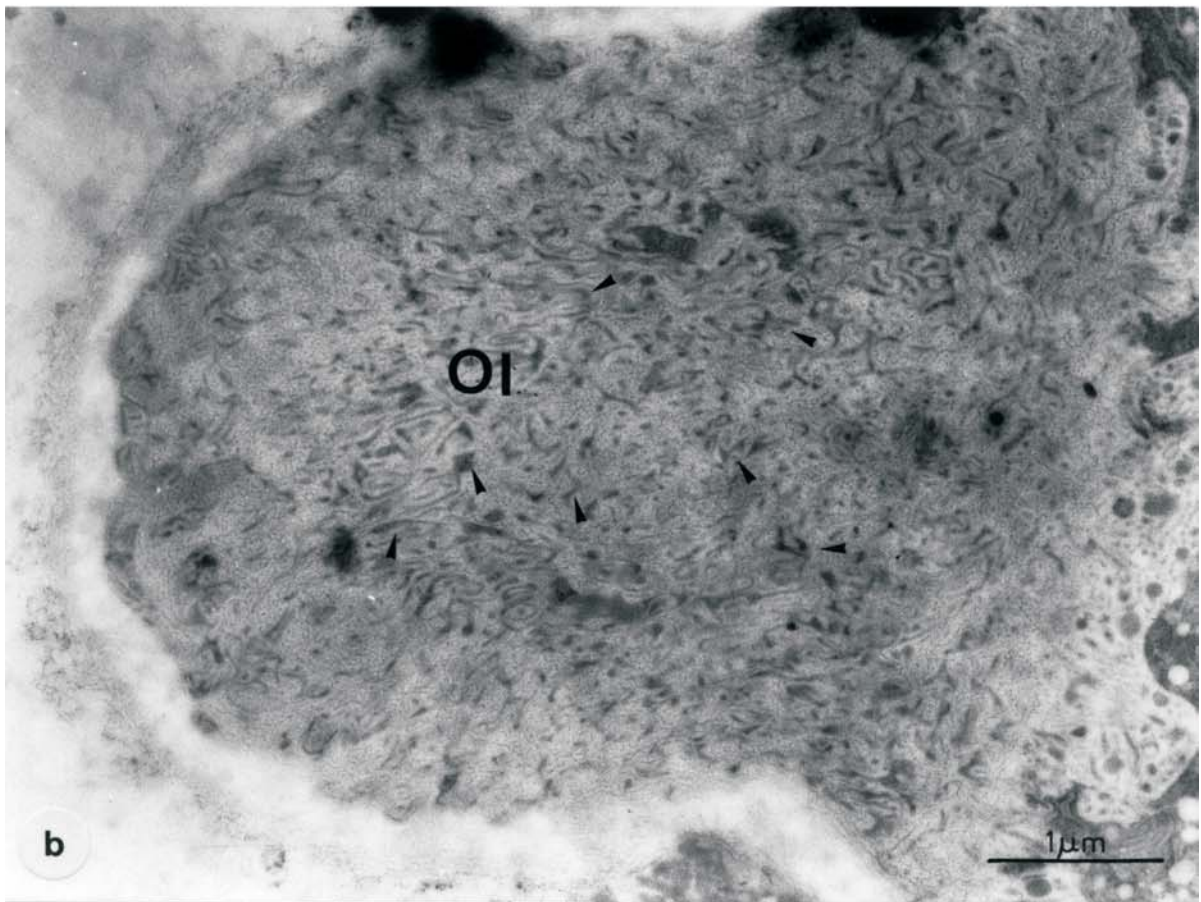
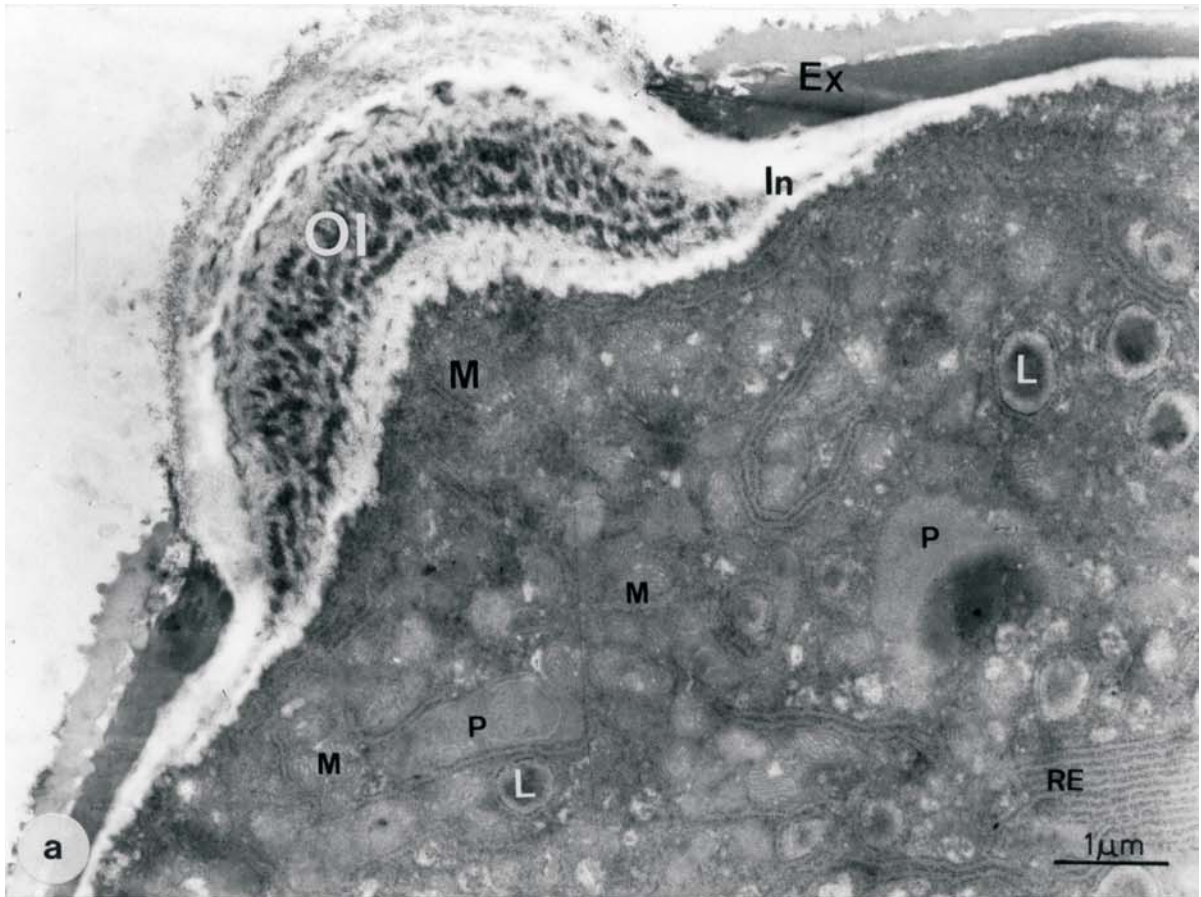
**LAMINA 26**

**POLEN BICELULAR MADURO**

**a-** Región apertural con la exina (Ex) interrumpida permitiendo que el abultado oncus de la intina (OI) salga hacia fuera. En la matriz del oncus las tubulaciones dilatadas y llenas de un material denso se encuentran separadas del plasmalema por una capa homogénea de intina (In). En el citoplasma próximo a la apertura se acumulan mitocondrias (M).

**b-** Detalle del oncus de la intina muy desarrollado con numerosas tubulaciones densas (cabezas de flecha) inmersas en una matriz fibrilar grisácea.



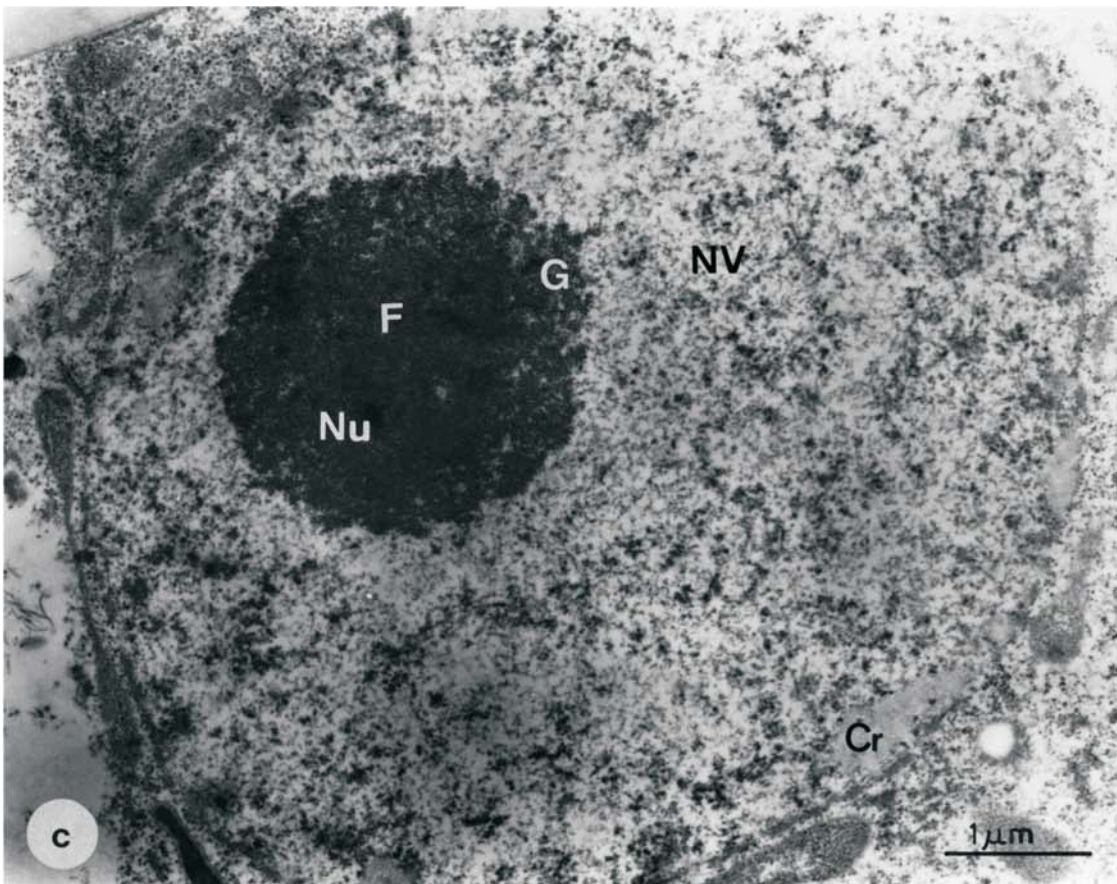
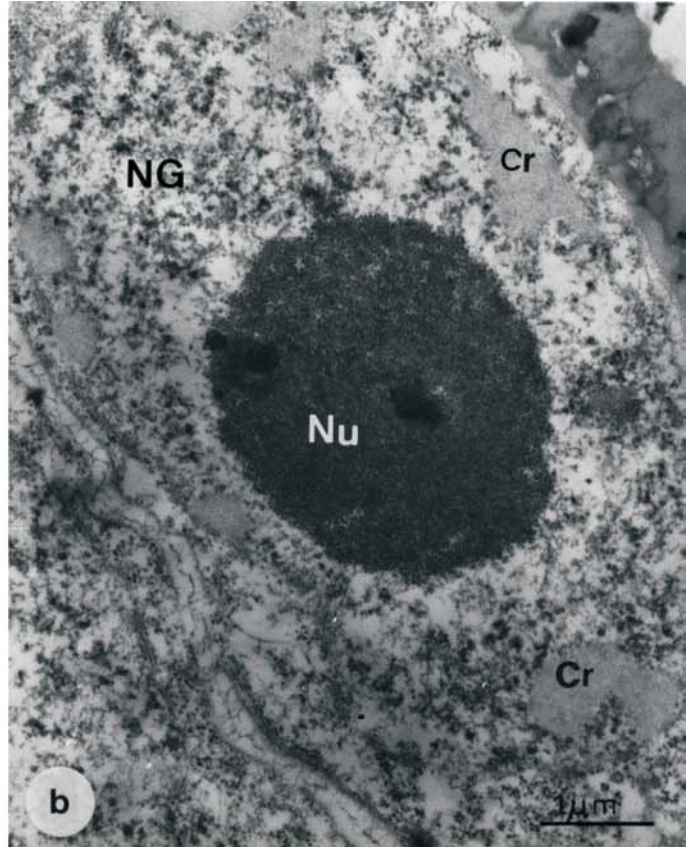
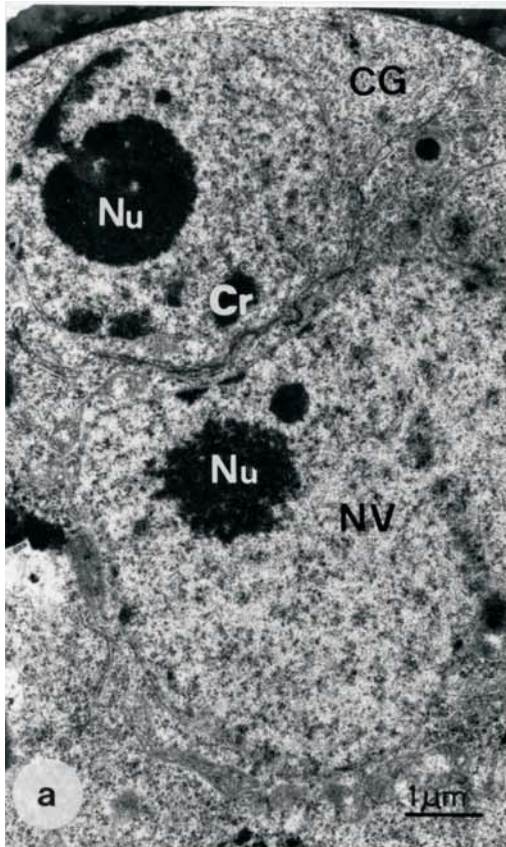


**LAMINA 27**

**TINCIÓN PREFERENCIAL PARA RIBONUCLEOPROTEINAS (EDTA)**

**a-** Control, tinción uranilo-plomo. Núcleo vegetativo (NV) y generativo de un polen bicelular joven. Obsérvese como la cromatina, nucleolo y material ribonucleoproteico presentan el mismo grado de tinción.

**b, c-** Tinción de EDTA. **b-** Núcleo generativo; **c-** núcleo vegetativo. Nucleolo y material fibrilo-granular del nucleoplasma se tiñe, mientras que las masas de cromatina aparecen blanqueadas.



**LAMINA 28**

**TINCIÓN PREFERENCIAL PARA RIBONUCLEOPROTEINAS (EDTA)**

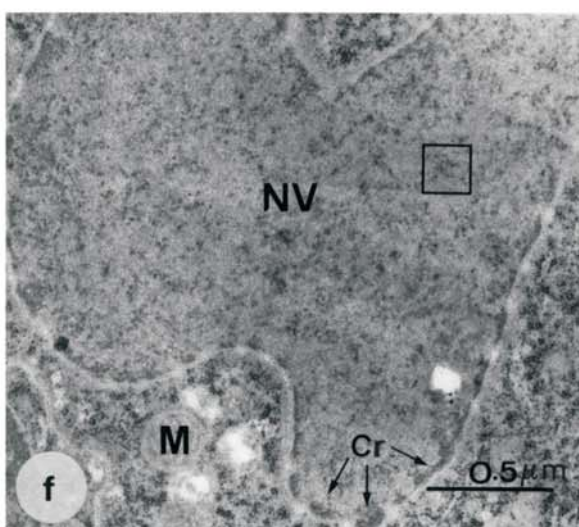
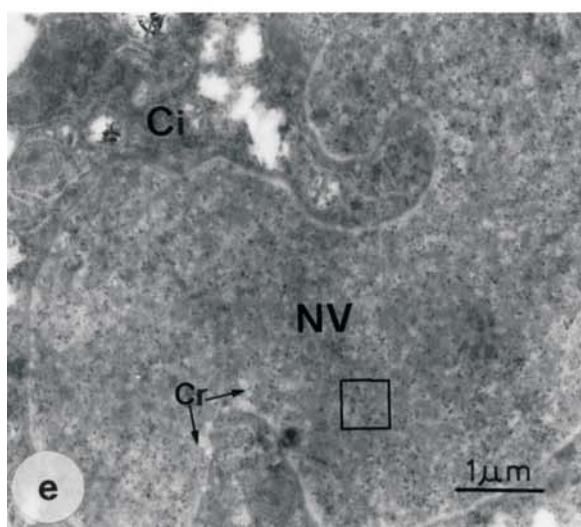
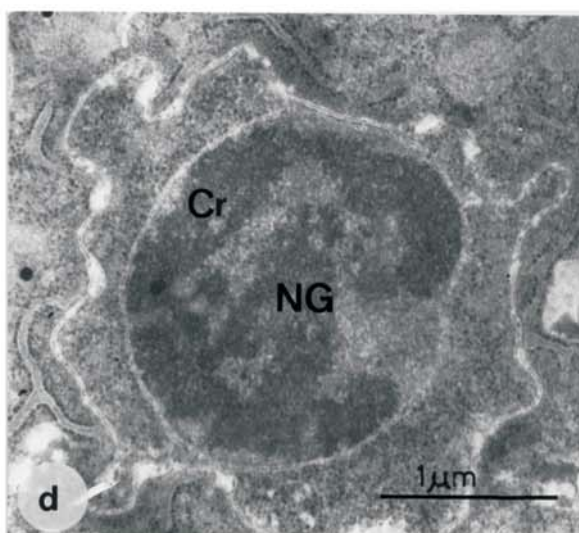
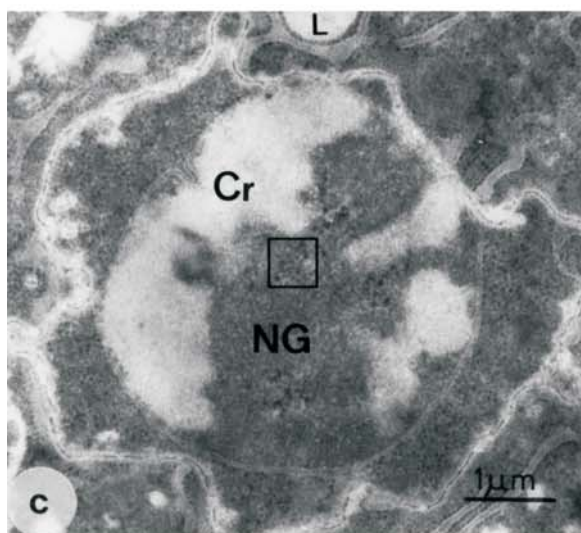
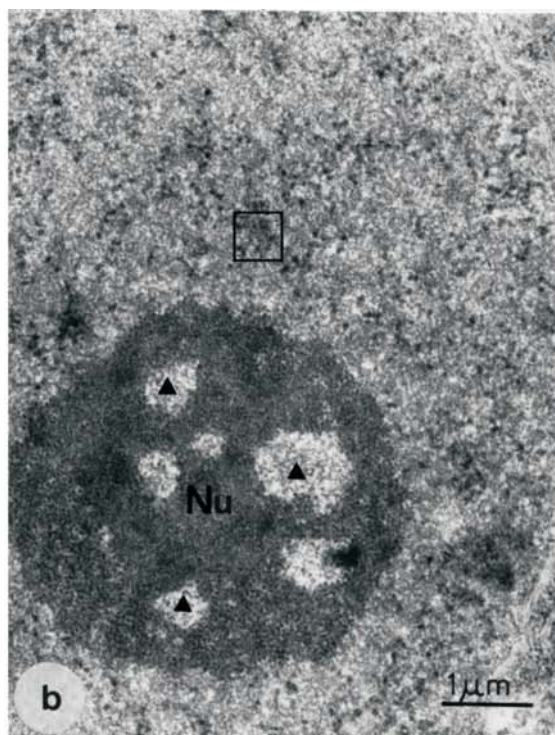
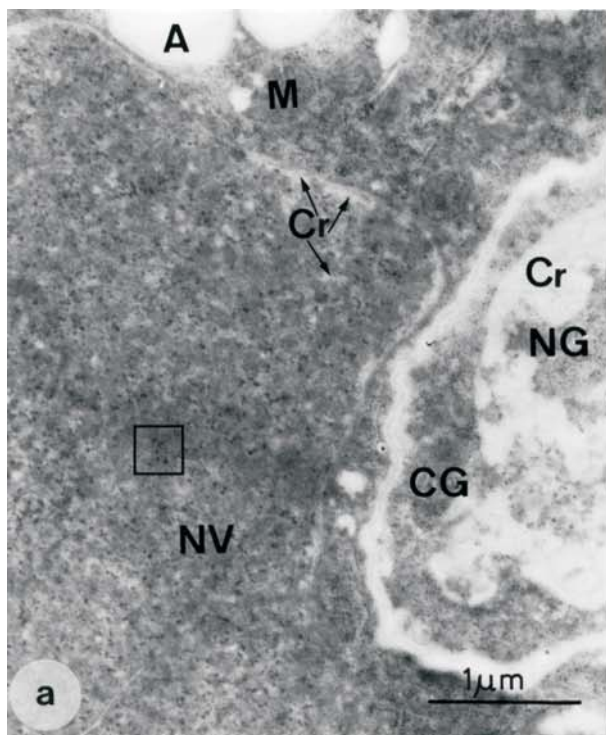
**a, b-** Polen bicelular medio. **a-** EDTA, **b-** control. Obsérvese la gran cantidad de granos ribonucleoproteicos en el nucleoplasma vegetativo (recuadro).

**c, d-** Célula generativa del grano bicelular maduro.

**c-** EDTA; **d-** Control.

**e, f-** Núcleo vegetativa del grano bicelular maduro.

**e-** EDTA; **f-** Control.



**LAMINA 29**

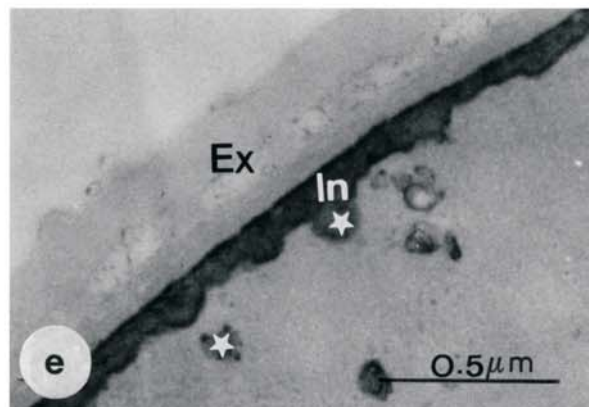
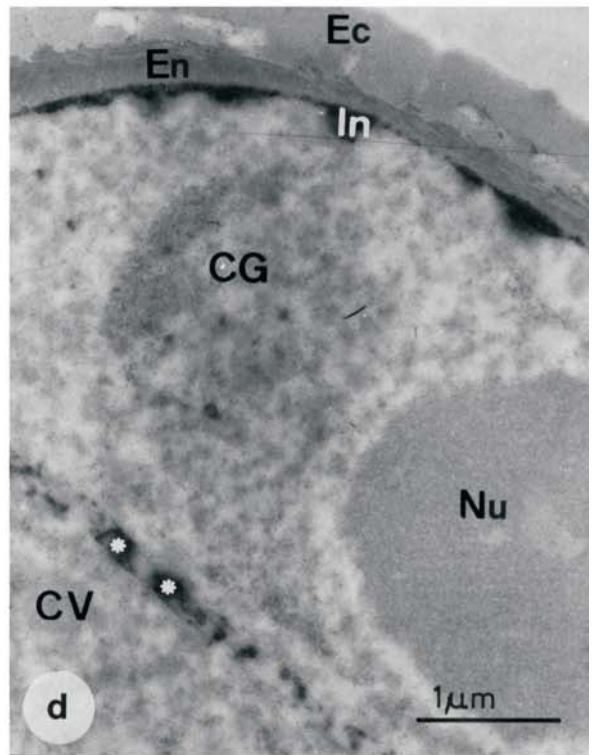
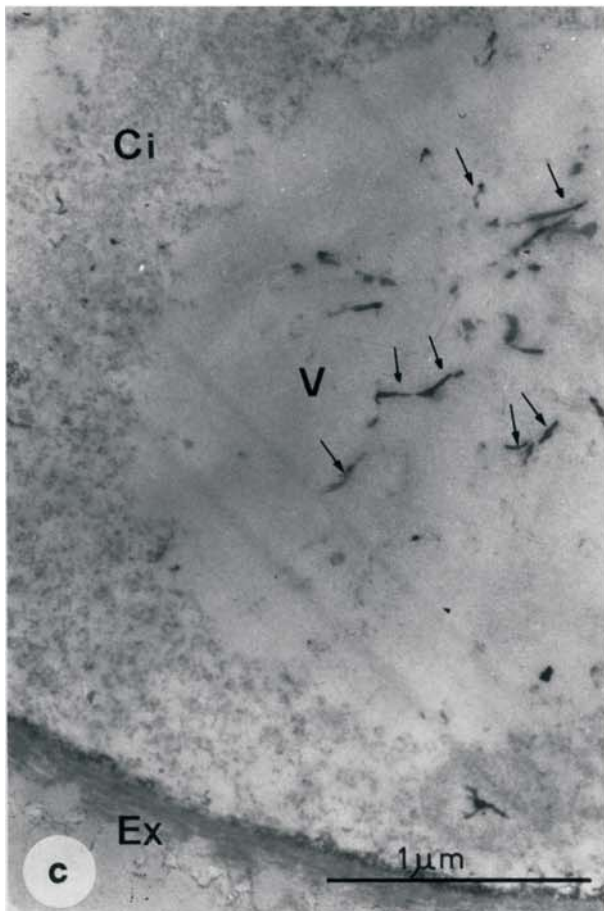
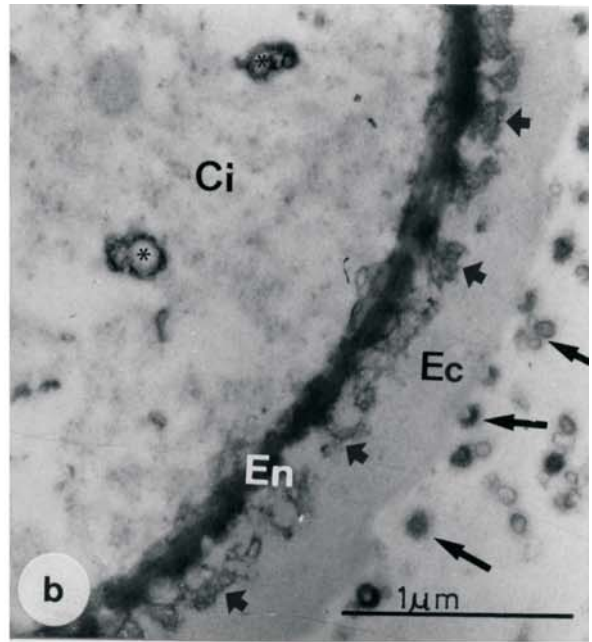
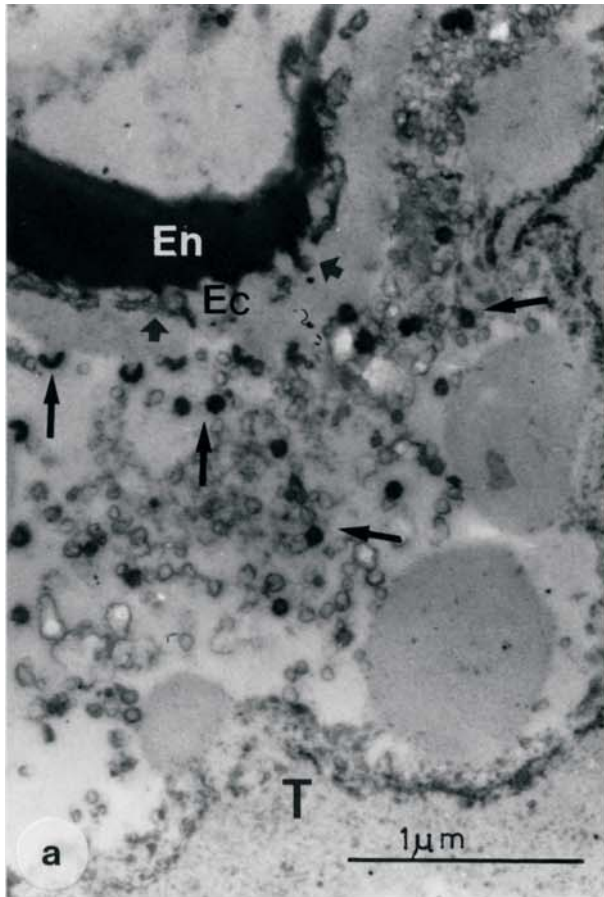
**TINCIÓN ESPECIAL PARA POLISACÁRIDOS: PTA**

**a, b-** Microspora. En la pared se tiñe la endexina (En), material fibrilar de las arcadas (flechas gruesas), así como los gránulos suprategmiales de la exina y material globular del lóculo de la antera (flechas largas).

**c-** Microspora vacuolada. Se tiñe el material fibrilar incluido dentro de la vacuola.

**d-** Grano bicelular joven. La pared de la célula generativa (asteriscos) y la intina (In) del grano se tiñen por igual.

**e-** Grano de polen maduro. La intina da positiva al igual que las vesículas localizadas en el citoplasma cercanas o fundiendo con la intina (asteriscos).



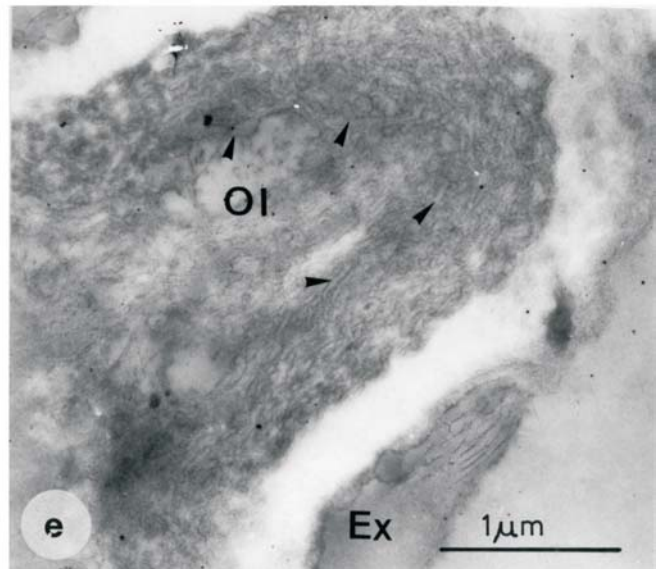
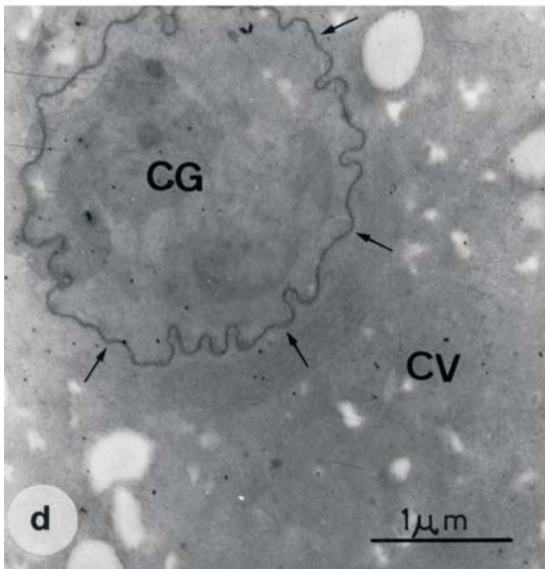
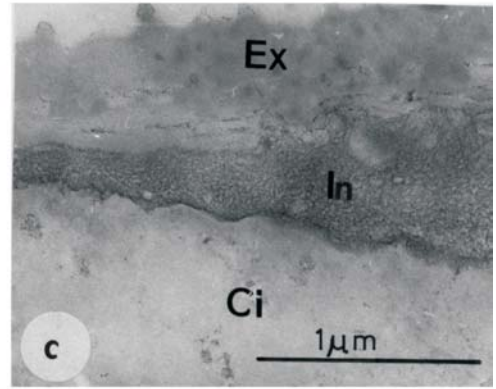
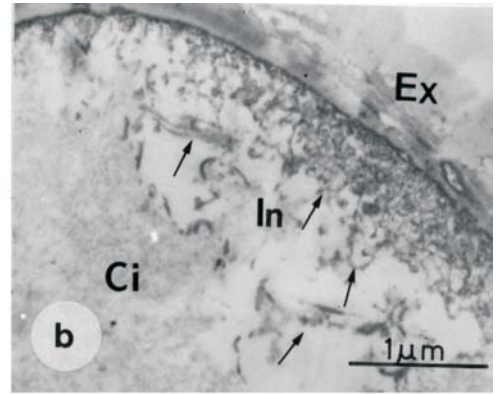
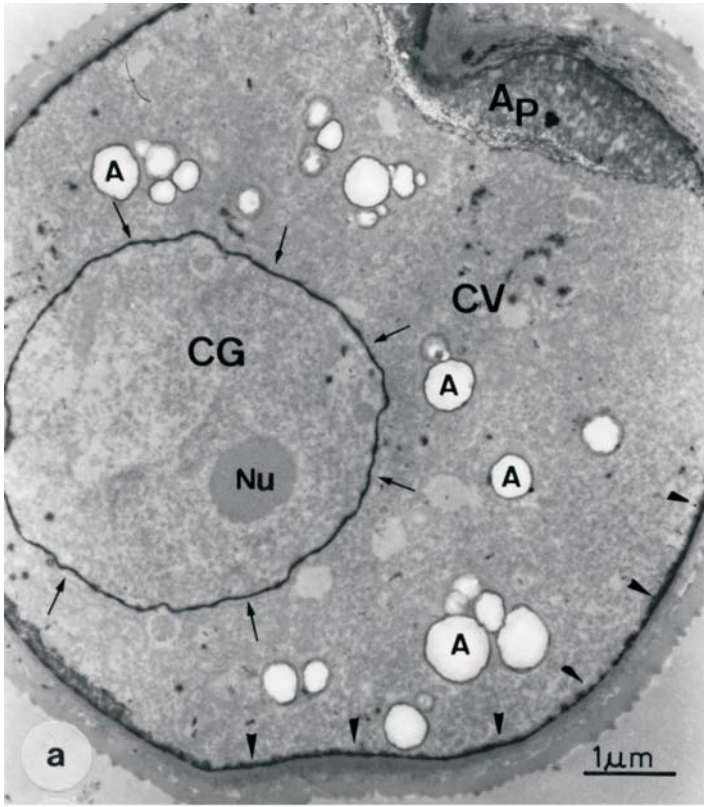
**LAMINA 30**

**TINCIÓN ESPECIAL PARA POLISACÁRIDOS: PTA, THIERY**

**a, b-** Grano bicelular. PTA. Intina (cabezas de flecha) y pared de la célula generativa (flechas) se tiñen intensamente, así como las pequeñas vesículas en el citoplasma.

**c, d, e-** Grano bicelular. Test de Thiery. La intina (In), la pared de la célula generativa (flechas) y la matriz del oncus de la intina (OI) dan positivas a esta reacción.





**LAMINA 31**

**DETECCIÓN DE CATIONES INORGÁNICOS EN LA PARED DEL POLEN**

Técnica del Piroantimoniato potásico. Polen Bicelular.

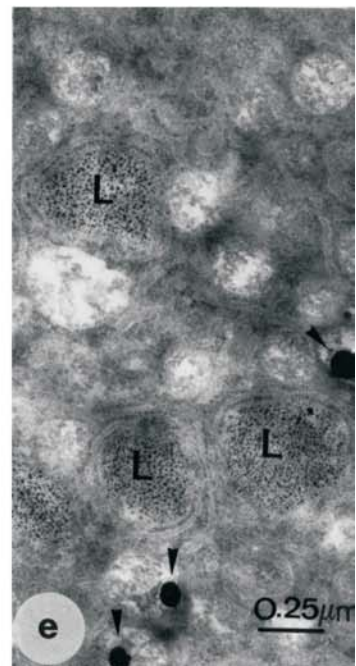
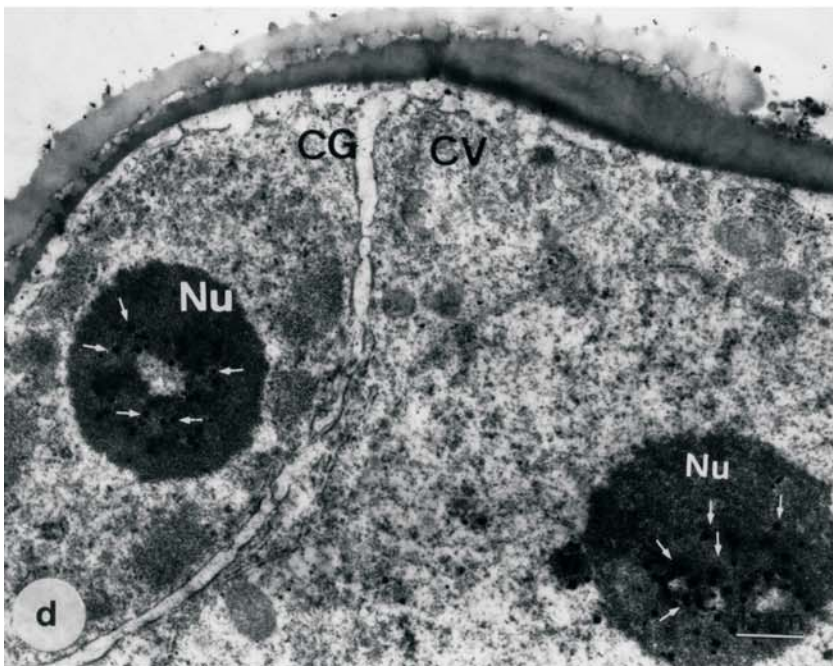
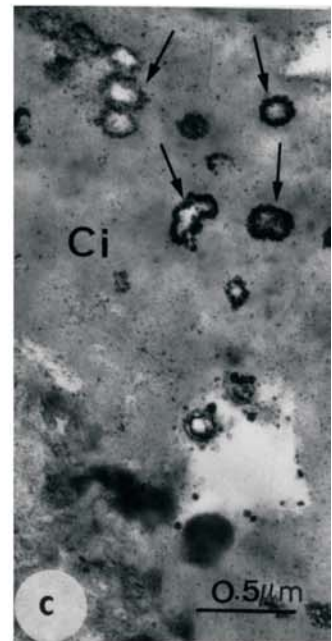
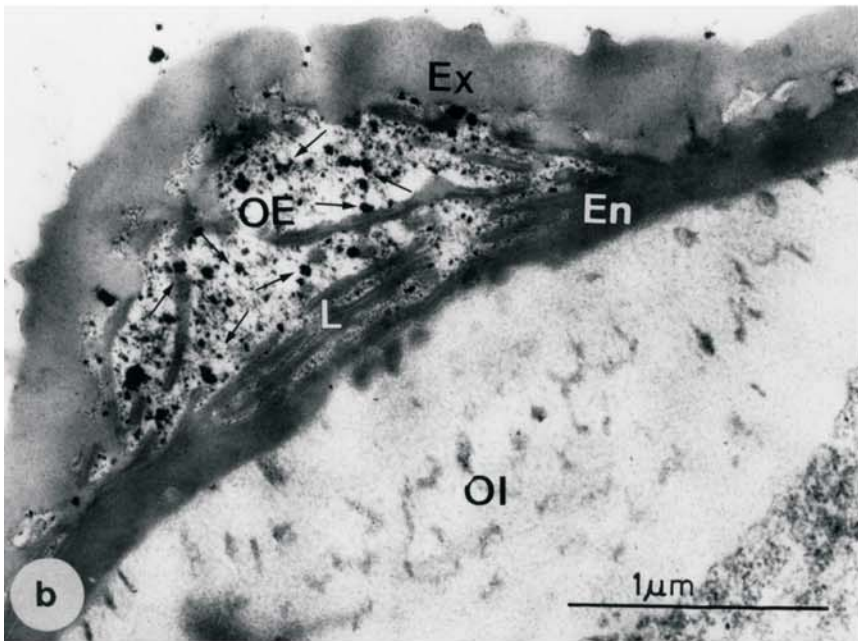
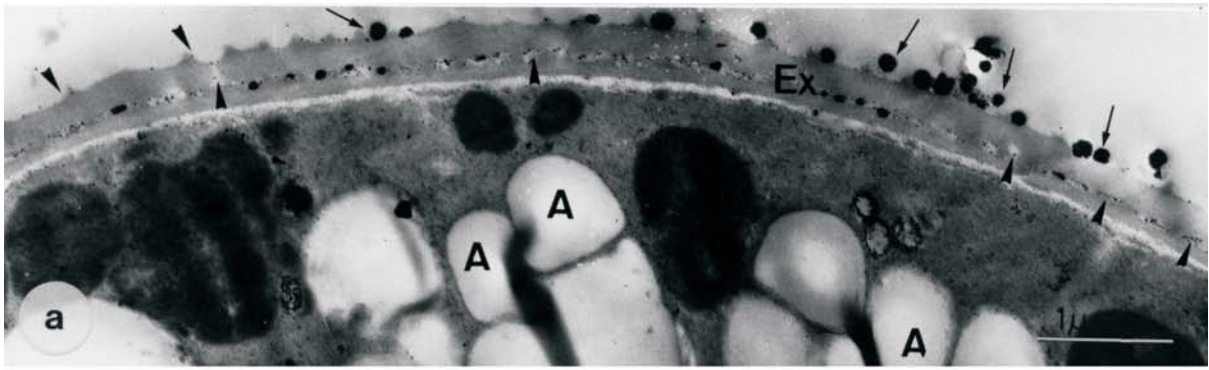
**a-** La exina presenta en la superficie externa y en las arcadas dos tipos de precipitado de diferente tamaño, grueso (flecha delgada) y fino (flechas gruesas).

**b-** Región apertural con precipitado en la matriz de oncus de la exina.

**c-** Citoplasma en el que aparece precipitado a nivel de vesículas principalmente en sus membranas (flechas).

**d-** Célula vegetativa y generativa mostrando reacción positiva en sus nucleolos (flechas)

**e-** Los cuerpos lípidicos dan reacción positiva observándose gran cantidad de precipitado fino en ellos. Vesículas (cabeza de flecha) que muestran precipitado grueso.



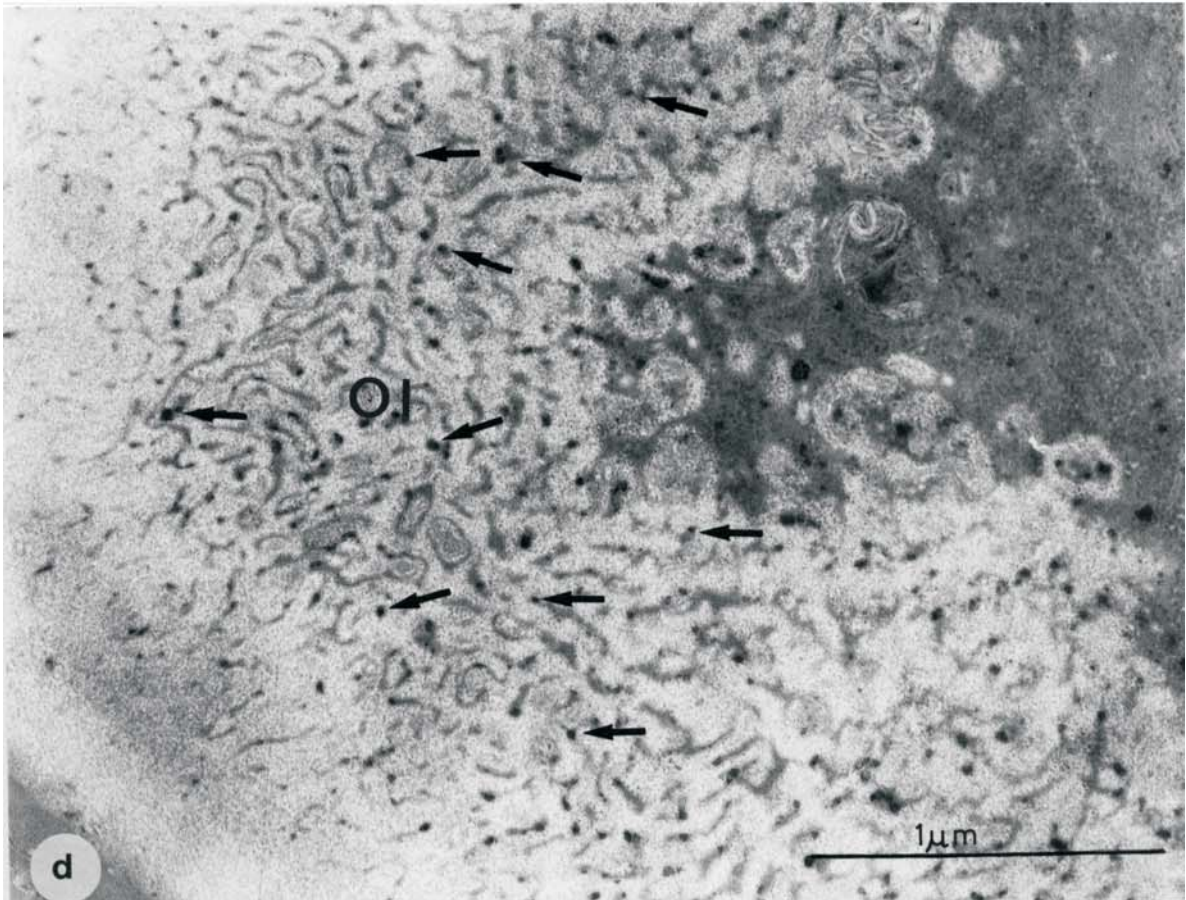
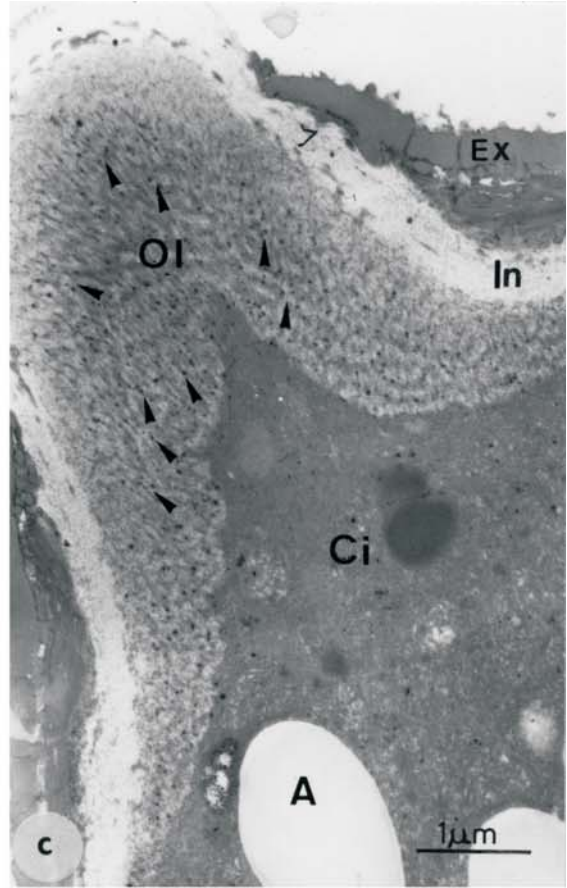
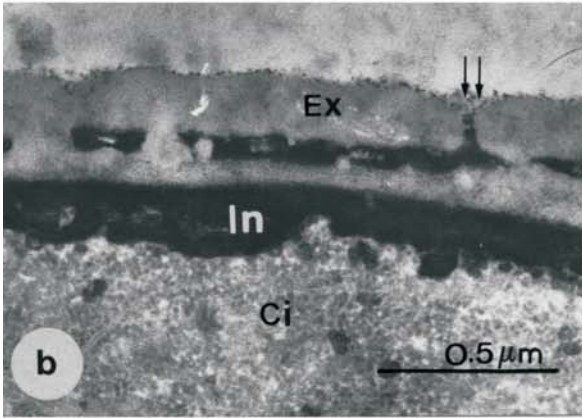
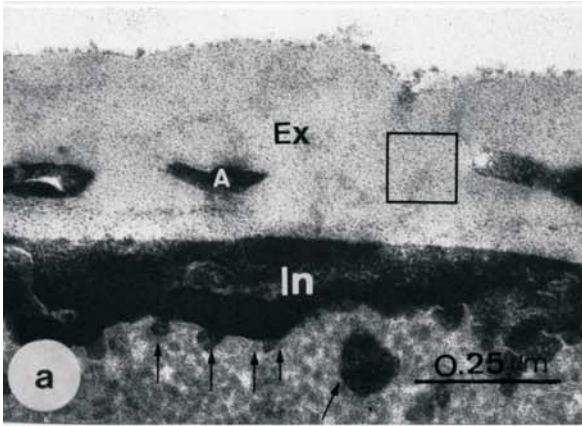
**LAMINA 32**

**EL LANTANO COMO ELEMENTO TRAZA**

Polen bicelular medio.

**a,b-** Pared del grano de polen en la que la intina se encuentra totalmente "negra" por el precipitado, así como los microcanales (doble flecha) y arcadas (A) de la exina. Se aprecia un fino precipitado en el material que constituye el tectum y las columelas (recuadro). La reacción también es positiva en vesículas del citoplasma que se encuentran cercanas o unidas a la intina (flechas).

**c,d-** Región apertural. Obsérvese el precipitado localizado en los túbulos del oncus del oncus de la intina (OI).



**LAMINA 33**

**EL LANTANO COMO ELEMENTO TRAZA**

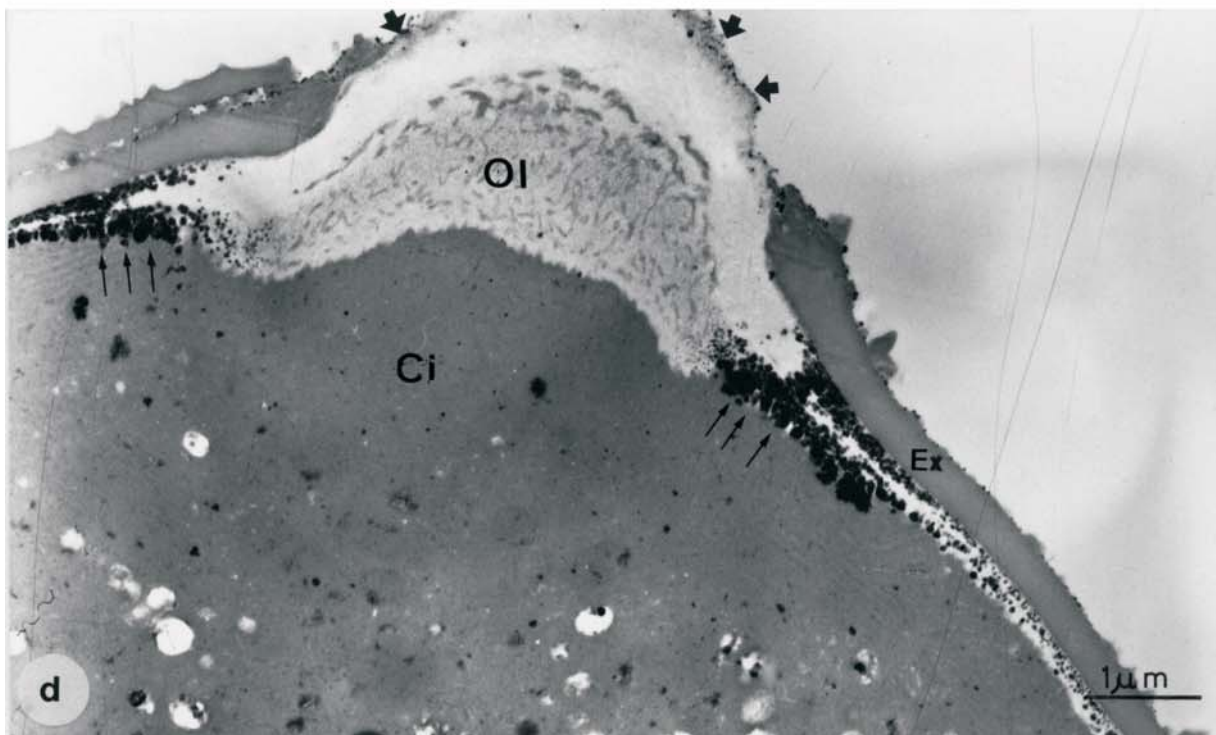
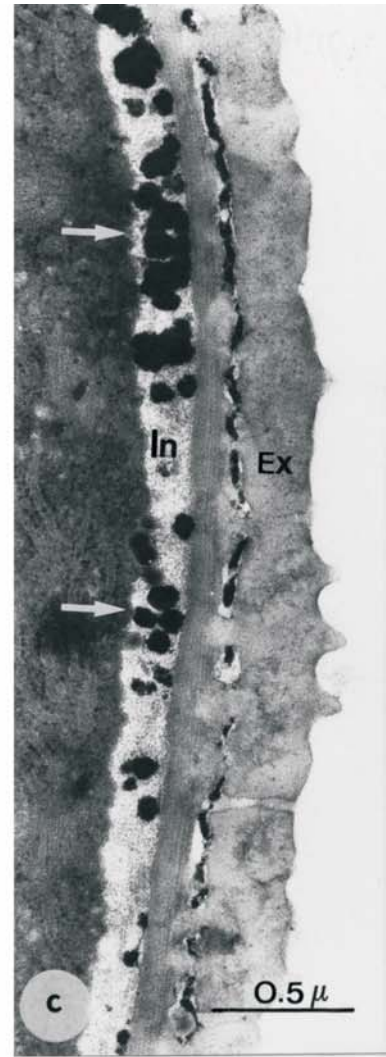
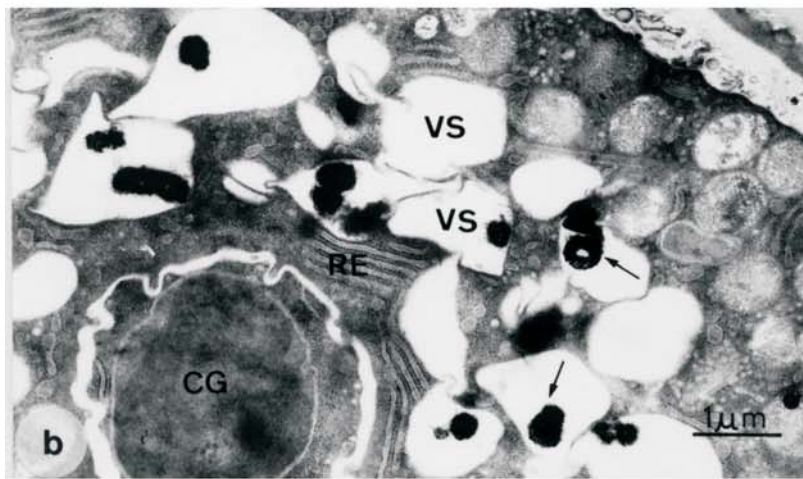
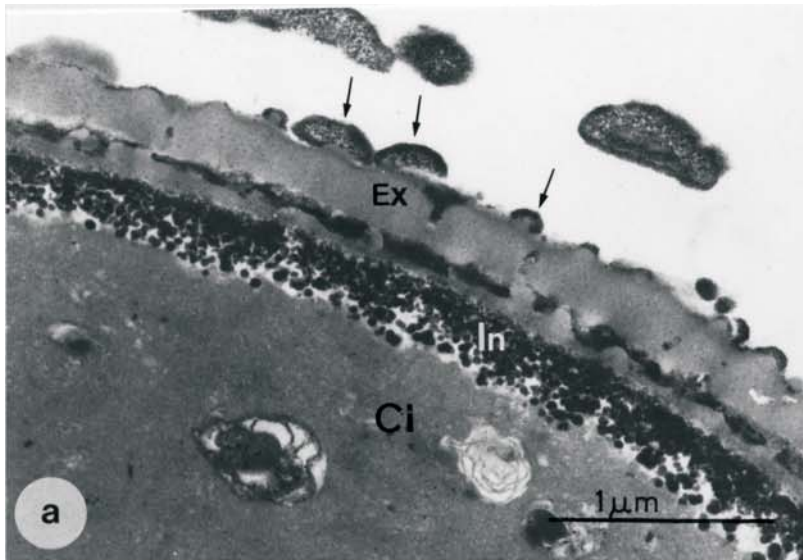
Grano de polen maduro.

**a-** El precipitado se localiza en la intina (In), arcadas y en la superficie del grano (flechas). El grado de precipitado es menor que el que se observa en el interior de la intina del polen bicelular medio.

**b-** Dentro de las vesículas (Vs) del citoplasma se observa precipitado grueso.

**c-** Intina y arcadas presentan una distribución desigual de precipitado (flechas)

**d-** La región apertural aparece libre de precipitado en el oncus de la intina (tanto las tubulaciones como la matriz) aunque este se encuentra en su superficie externa (flechas gruesas). El precipitado (flechas delgadas) se acumula principalmente en la intina contigua al oncus de la intina (OI).



**LAMINA 34**

**EL LANTANO COMO ELEMENTO TRAZA**

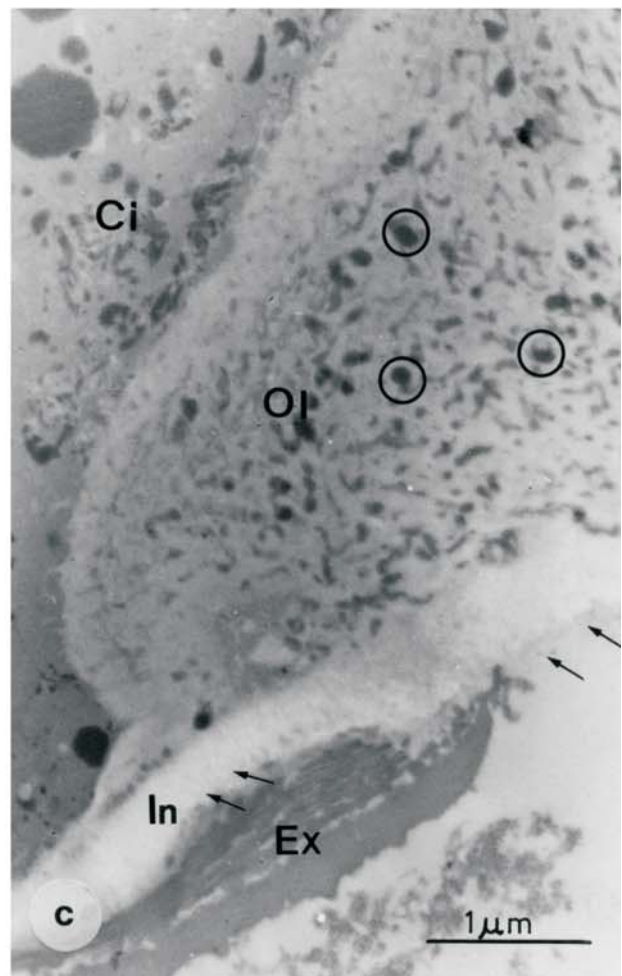
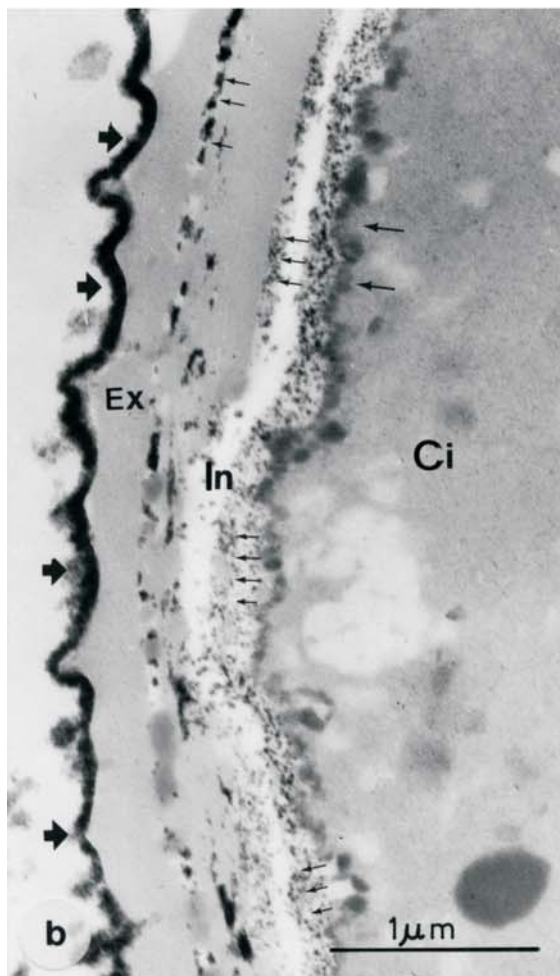
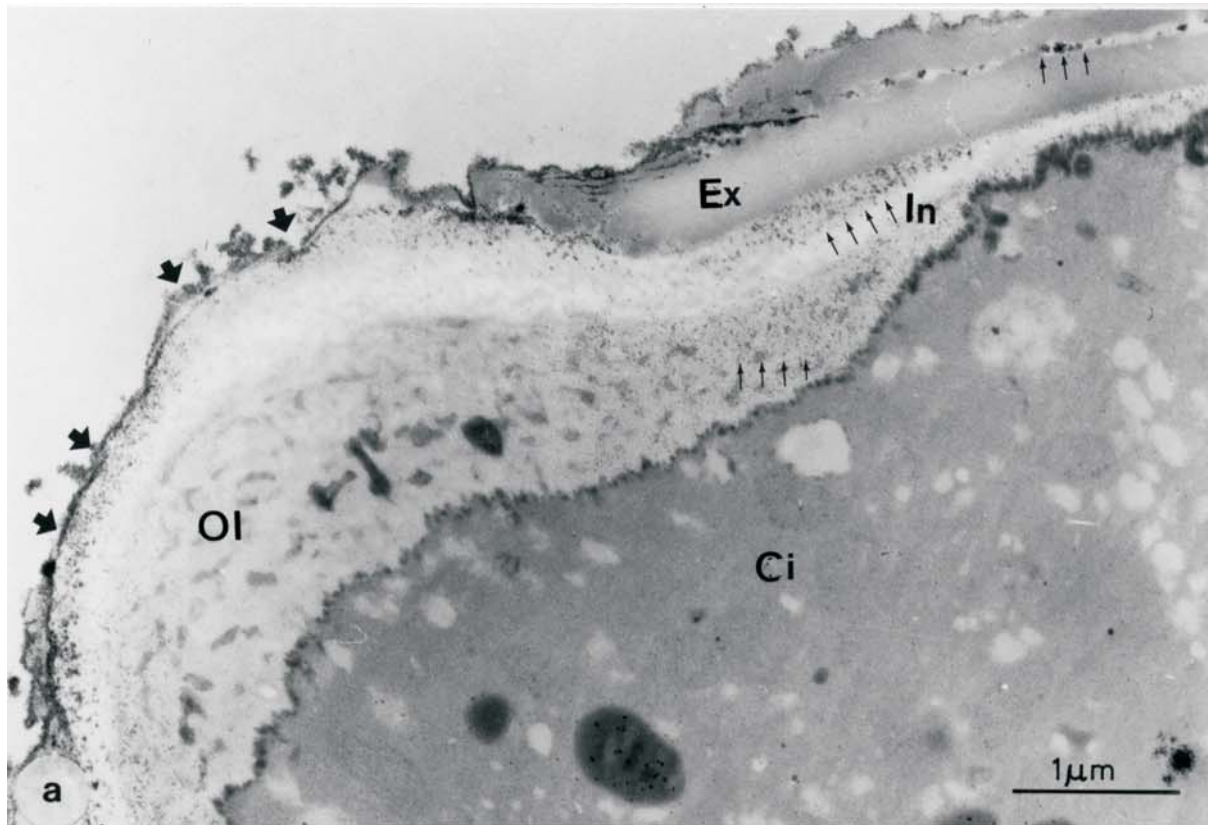
Polen maduro cultivado en un medio que contiene nitrato de lantano.

**a-**El precipitado está localizado en el exterior de la apertura (flechas gruesas), arcadas e intina no apertural (flechas pequeñas). Las tubulaciones del oncus de la intina (OI) están libres de precipitado.

**b-** En las zonas interaperturales se observan depósitos de lantano a nivel de las arcadas e intina (flechas). La superficie del grano aparece totalmente cubierta por precipitado (flechas gruesas).

**c-** Control, polen cultivado en medio sin lantano. Ausencia total de precipitado





**LAMINA 35**

**GRANO DE POLEN MADURO, MICROCUERPOS: PEROXIDASAS,  
CATALASAS Y OXIDASA**

Técnica de la DAB: **a, b, c, e, f**

**a, b, c-** Incubación DAB más H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**a-** Material teñido. **b, c-** material sin teñir.

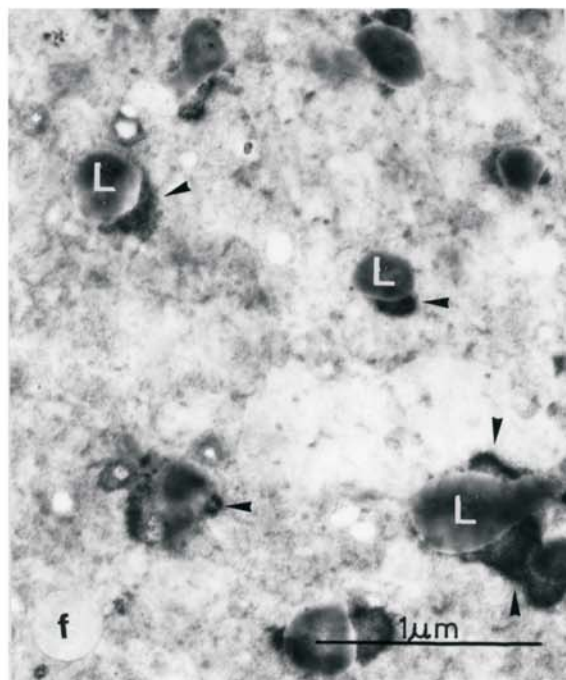
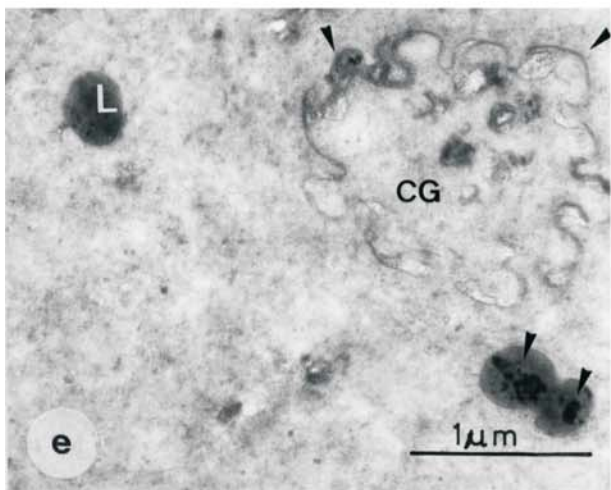
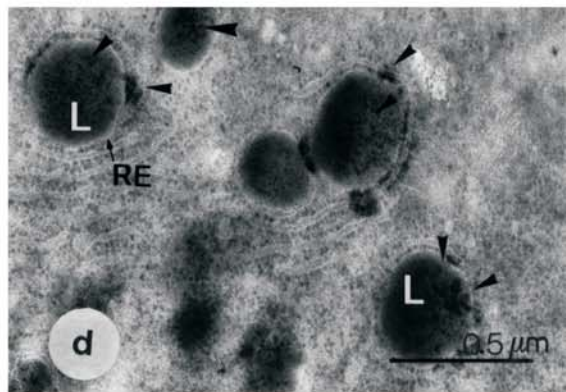
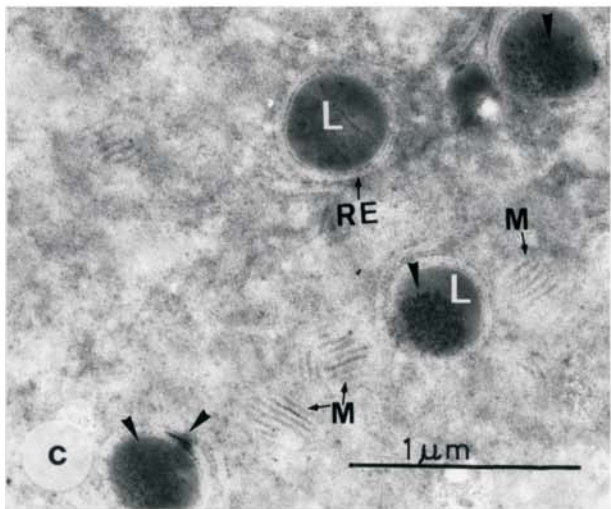
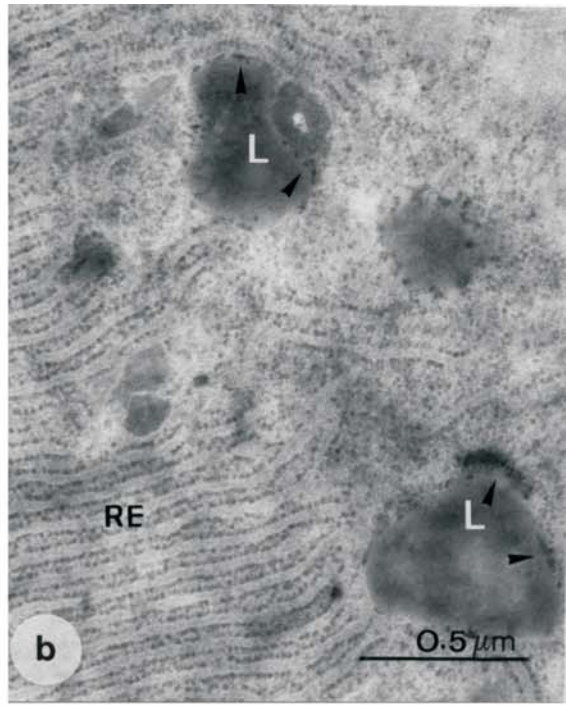
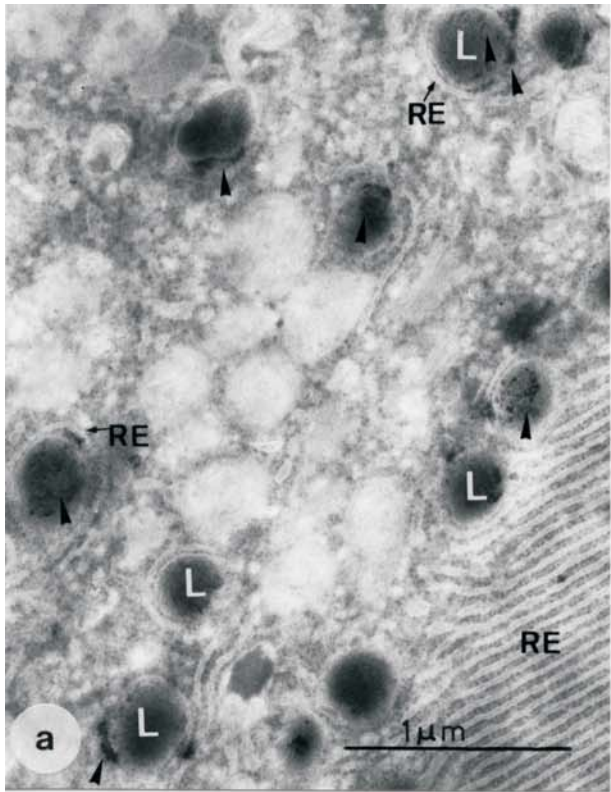
Obsérvese la presencia de precipitado tanto en el interior de los cuerpos osmiófilos (L) como en citoplasma adyacente (cabeza de flecha). **c-** Las crestas de mitocondrias (M) también son positivas a la reacción.

**e, f-** Controles

**e-** Incubación en DAB con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y AT. El precipitado (cabezas de flecha) sólo se da en el interior de los cuerpos osmiófilos (L). También se encuentra en la pared generativa.

**f-** Incubación en DAB sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En este caso, el precipitado (cabezas de flecha) aparece en el citoplasma que rodea los cuerpos osmiófilos (L).

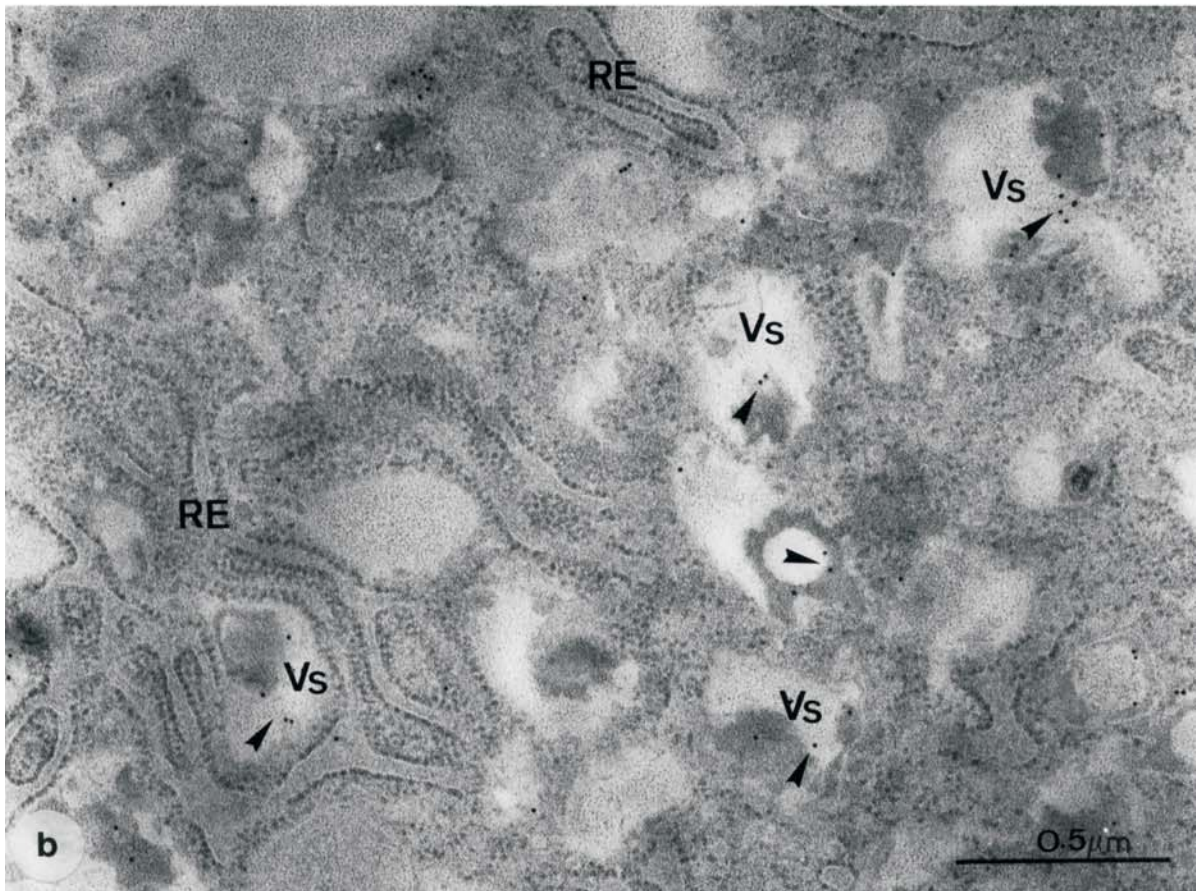
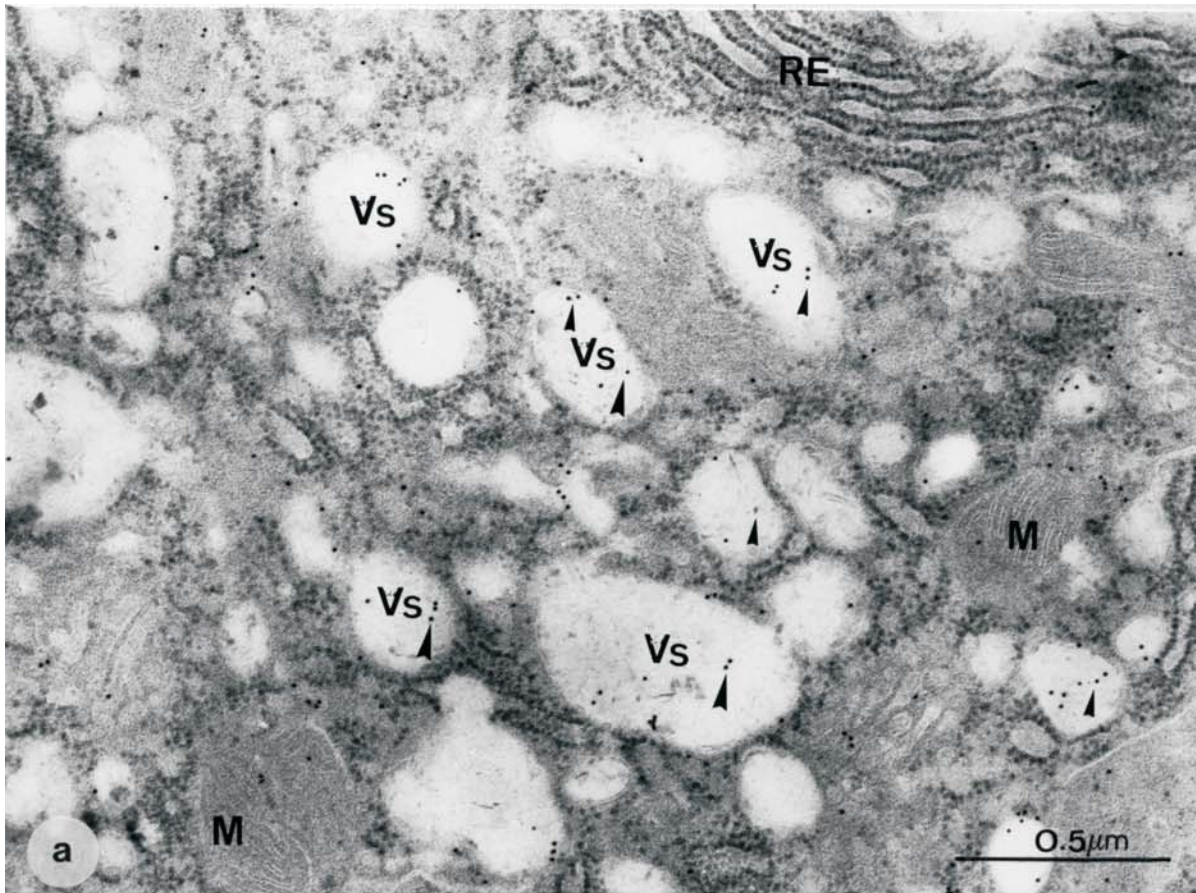
**d-** Técnica del cerio para detectar Xantina oxidasa. Material teñido. El precipitado presenta la misma localización que en la reacción de la DAB (cabezas de flecha) tanto en la periferia, como en el interior de los cuerpos lipídicos.



**LAMINA 36**

**POLEN MADURO: INMUNOLocalIZACIÓN DE PEROXIDASA**

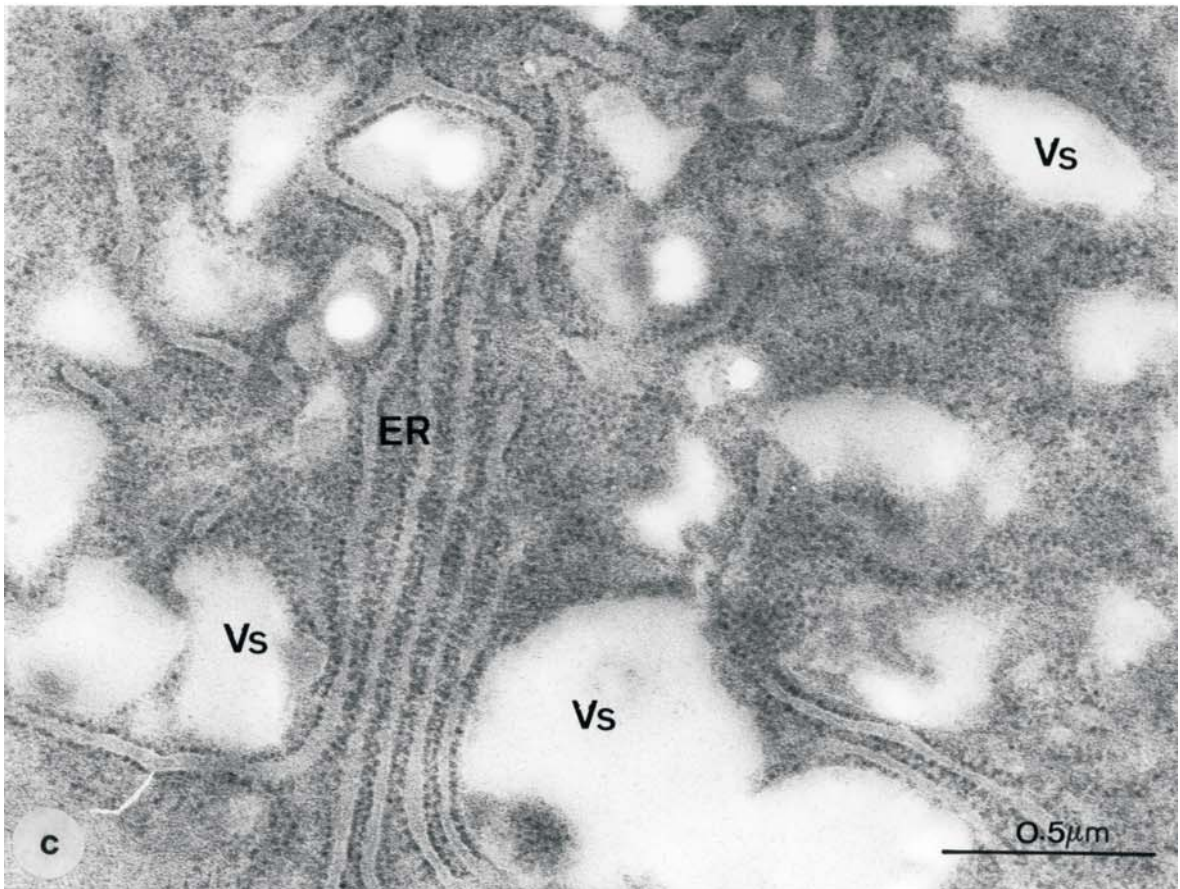
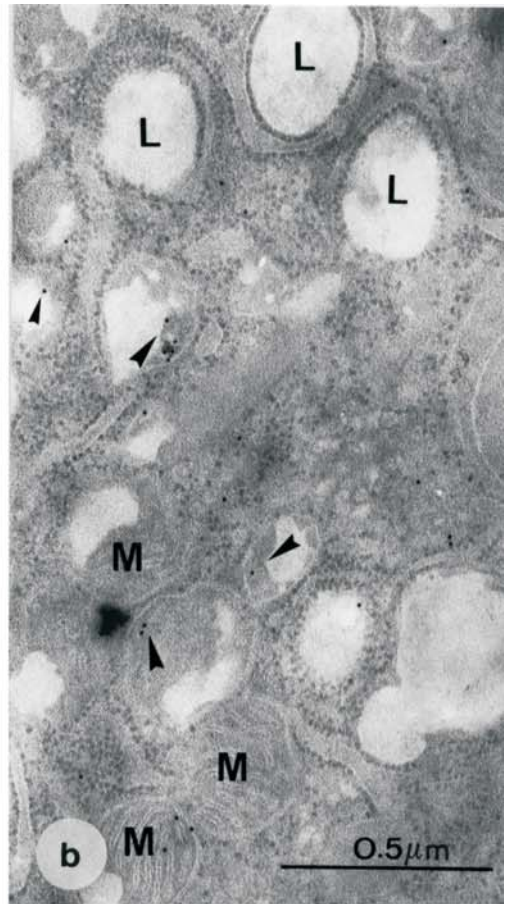
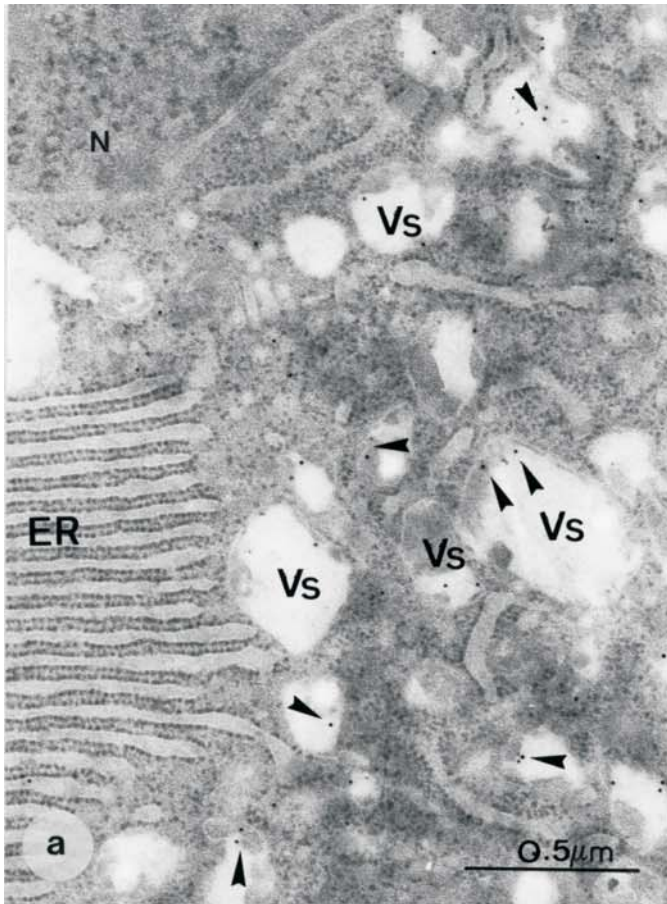
**a,b-** El marcado de oro (cabezas de flecha) se localiza principalmente a nivel de vesículas o pequeñas vacuolas (Vs). Esporádicamente las mitocondrias (M) y retículo (RE) pueden presentar algún grano de oro.



**LAMINA 37**

**POLEN MADURO: INMUNOLocalIZACIÓN DE PEROXIDASA.**

- a-** Los granos de oro se localizan en vesículas que contienen restos de material grisáceo en su interior (cabezas de flecha). Cisternas de retículo endoplásmico rugoso y núcleo (N) aparecen libres de marcado.
- b-** Los cuerpos lipídicos (L) están libres de marcado mientras las mitocondrias (M) con signos de degradación si presentan partículas de oro (cabeza de flecha).
- c-** Control. Citoplasma completamente limpio de granos de oro.



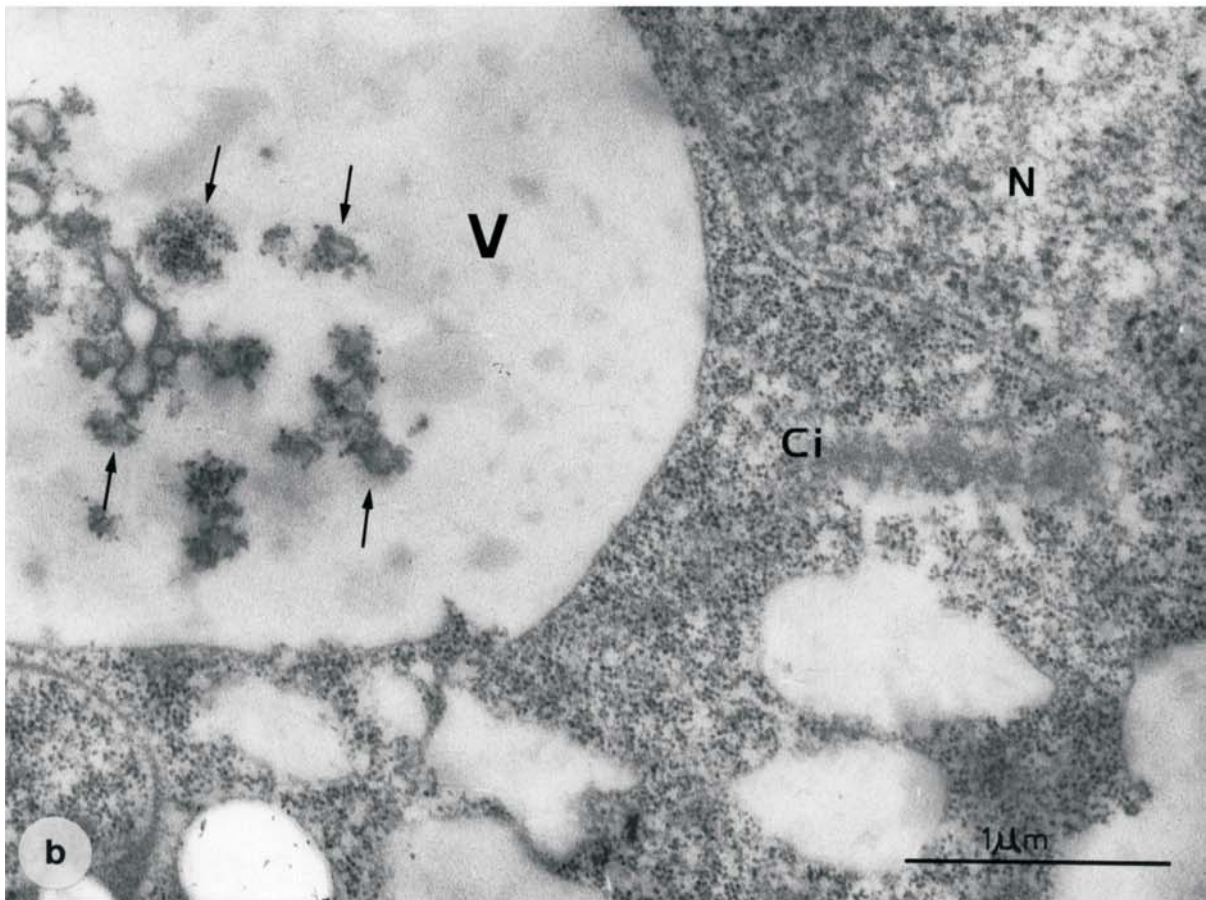
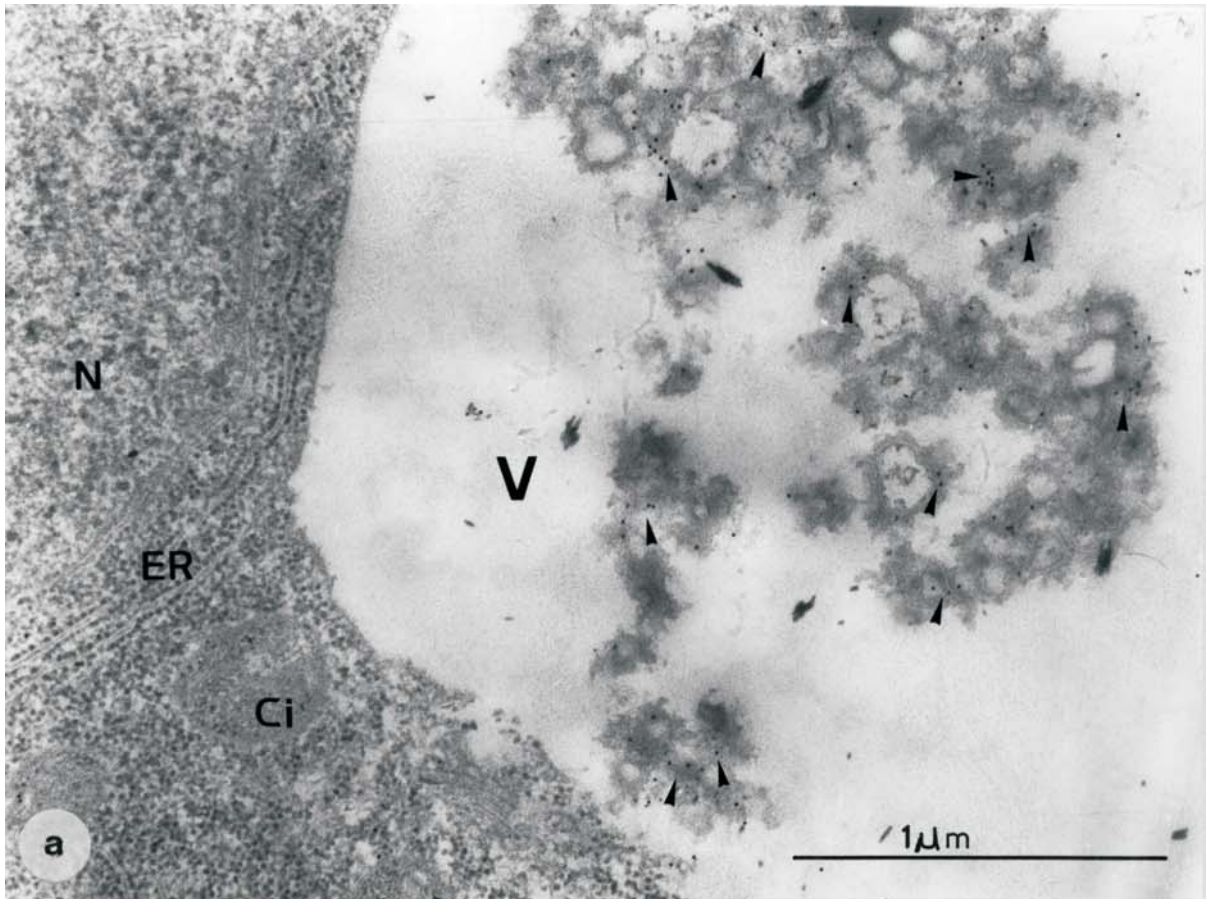
**LAMINA 38**

**MICROSPORA VACUOLADA: INMUNOLocalización DE PEROXIDA-  
SA.**

**a-** El marcado (cabezas de flecha) está localizado preferencialmente sobre el material fibrilar de la vacuola (V).

**b-** Control. No se observa marcado sobre el material fibrilo-granular de la vacuola (flechas).







## ***Capítulo 5: Discusión***

### **5.1- CULTIVO *in vitro* DE ANTERAS DE TOMATE**

Las técnicas de cultivo *in vitro* van orientadas a la obtención de individuos haploides, los cuales tienen un gran número de ventajas frente a los individuos diploides (como ya se ha indicado en el capítulo introducción) por lo que son muy útiles en programas de mejora vegetal y de ingeniería genética.

Son numerosas las posibles vías de androgénesis que han sido descritas como se indica en el esquema II (página ). Nosotros hasta ahora sólo hemos conseguido la formación de callos a partir del cultivo de anteras. De los dos medios utilizados, los resultados parecen ser que han sido mejores con el medio MS obteniendo

## **DISCUSIÓN**

---

callos que se desarrollan más y en mayor número; estos resultados son similares a los de otros autores (Zagorska y col. 1982); (Ziv y col. 1982). La concentración óptima de hormonas en nuestro caso es de 2mg/l NAA y 5 ó 1mg/l kinetina lo que coincide con los datos señalados por Gulshan y col. (1981). Parece ser que las hormonas y su concentración son factores decisivos en los cambios que se originan en el cultivo. También es importante el genotipo de la planta donadora y su interacción con los componentes del medio (Levenko y col. 1977).

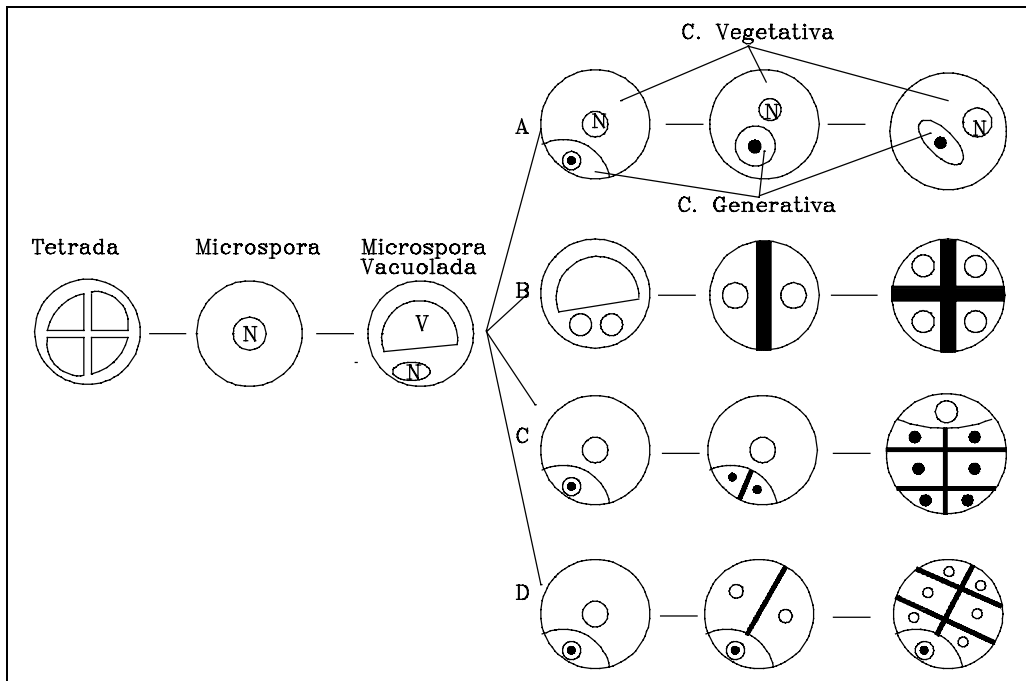
La formación del embriode es un fenómeno más complejo y específico que la formación de callos, por lo que resulta más difícil encontrar las condiciones ambientales, así como la composición óptima del medio. Son varias las especies en las que a partir del cultivo de anteras se han obtenido directamente embrioides que llegan a desarrollarse dando una planta completa, como es el caso de *Datura* (Guha y Maheshwari 1964) y *Nicotiana* (Sunderland y Wicks 1971) y *Oenothera* (Martínez y Noher de Halac 1992). Sin embargo no se tiene certeza si las plantas obtenidas son haploides o diploides, al no poder determinar si la nueva planta se desarrolla a partir del grano de polen o de las paredes de la antera, por lo que la utilización de las anteras para la obtención de haploides tiene sus inconvenientes. En realidad la mejor forma de asegurarnos el origen haploide de callos y embrioides, sería realizando el cultivo del polen aislado (Sharp y Raskin 1972). Para ello es de máxima utilidad conseguir la maduración *in vitro* del polen. Esto lo ha logrado el grupo de Heberle-Bors en Viena, utilizando como material microsporas de *Nicotiana* (Benito-Moreno y col. 1988; Kyo y Harada 1988). Si embargo, hasta la fecha esta es la única especie en la que se ha llevado a cabo con

éxito la maduración *in vitro* del polen. Nuestro propósito fue poner este sistema a punto en el tomate, ya que al tratarse de un género que pertenece a la misma familia que el tabaco (Solanáceas), pensamos que podría ser un material idóneo. Pero los resultados preliminares obtenidos no parecen confirmar esta hipótesis, ya que tanto la inducción de la androgénesis como la maduración del polen no parecen ser fáciles de llevar a cabo, ya que después de un año de experiencias sólo conseguimos la formación de callos.

En el Esquema V, se muestran las tres posibles vías de formación del callo o del embriode a partir de la microspora: A) División asimétrica de la microspora para dar lugar al grano de polen. B) El núcleo de la microspora se divide de forma simétrica dando dos núcleos iguales, los cuales se dividen de manera sucesiva dando como resultado la formación de callos o de embriones (Gulshan y col. 1981). C, D). En otros casos, inicialmente la división del núcleo de la microspora se realiza de forma asimétrica dando dos núcleos diferentes entre sí uno vegetativo y otro generativo para posteriormente ser (C) bien el núcleo generativo el que se divide sucesivamente degenerando la célula vegetativa, o (D) ser el núcleo vegetativo el que se divide desapareciendo la célula generativa (D) (Reinert y col. 1981).

Según lo indicado, un aspecto importante a tener en cuenta es el estadio en el que se encuentran las anteras que ponemos en cultivo. Nosotros hemos cultivado anteras desde el estadio de CMP hasta que contenían polen bicelular. El estadio en el que nosotros hemos conseguido inducir la formación de callos ha sido el de microspora, coincidiendo con los resultados de otros autores (Sopory y Mahesh-

## DISCUSIÓN



**ESQUEMA V:** Diferentes orígenes de granos de polen pluricelulares

wari 1976; Dunwel Y Sunderland 1973; Gulshan y col. 1981; Sunderland 1984; Heberle-Bors 1985; Prakash y Giles 1987; Benito Moreno 1988). Algunos autores (Sangwan y Sangwan-Norreel 1987) indican que la relación almidón/estadio de desarrollo posiblemente sea determinante para que la planta se pueda considerar androgénica, de manera que especies en las que el almidón aparece en estadios jóvenes generalmente son recalcitrantes. Se ha sugerido que el paso de proplastidios hasta amiloplastos marca un estado de desarrollo tal en el que es difícil de inducir una actividad meristemática. Según este criterio *Lycopersicum esculentum* podría ser considerada una especie recalcitrante puesto que el almidón comienza a aparecer en un estadio relativamente temprano como es la microspora vacuolada.

Sin embargo si se ha conseguido inducir la androgénesis en esta especie (Gresshoff y Doy 1972; Zagorska y col. 1982; Ziv y col. 1982) por lo que se trataría de una excepción (Sangwan y Sangwan-Norreel 1987). Una posible explicación de los resultados obtenidos por nosotros podría ser que el estadio de desarrollo de la microspora es tan determinante que limita enormemente la posibilidad de inducir la androgénesis, por lo que posiblemente nunca hayamos partido del estadio adecuado. Un seguimiento a nivel celular de los cambios que se producen durante la microsporogénesis en *Lycopersicum* nos dará información a cerca de la diferenciación que tiene lugar en cada etapa del desarrollo del polen y nos ayudará en nuestra tarea de inducir la embriogénesis *in vitro* a partir de la antera y/o microsporas.

### **5.2- CAMBIOS SUFRIDOS POR EL GRANO DE POLEN DURANTE EL DESARROLLO Y MADURACIÓN.**

#### **5.2.1 CITOPLASMA**

El grano de polen de tomate, al igual que ocurre en otras especies sufre cambios en su organización y estructuras, orientados a conseguir un grano capaz de llevar a cabo las funciones propias de la fase gametofítica, como son la formación de las células gaméticas y germinación del tubo polínico. De aquí la atención que

## **DISCUSIÓN**

---

diferentes autores han prestado al estudio del desarrollo del polen (Gorska-Brylass et al 1984; Cresti y col. 1984; Fernández 1986; Weber 1989b; Rodríguez-García y Fernández 1990).

El incremento de la **población ribosómica** que nosotros observamos durante el desarrollo de la microspora del tomate, parece ser un fenómeno general relacionado con la expresión del genoma haploide de las microsporas (Dickinson y Heslop-Harrison 1977). Después de la meiosis la microspora presenta un citoplasma pobre en ribosomas, los cuales progresivamente aumentan en número hasta llegar a polen maduro con un citoplasma muy rico en ribosomas. La repoblación ribosómica postmeiótica ha sido relacionada con la presencia en el citoplasma de jóvenes microsporas de cuerpos semejantes al nucleolo y que son conocidos en la literatura como nucleoloides (Dickinson y Heslop-Harrison 1970). Estos cuerpos han sido encontrados en diferentes especies como son *Lathyrus odoratus* (Latter 1926); *Fritillaria* (Frankel 1937); *Sambucus nigra*, *Bellevalia romana* (Gavaudan 1948; Gavaudan y col. 1936); *Lilium longiflorum* (Dickinson y Heslop-Harrison 1970); *Allium cepa* (Rodríguez-García 1970); *Olea europaea* (Rodríguez-García y Fernández 1989). Sin embargo la microspora del tomate no presenta en ningún momento cuerpos citoplásmicos semejantes al nucleolo. Pero si se han observado localizados en el citoplasma cercano a la cubierta nuclear y en estrecha relación con ella, pequeñas masas de material denso similares en sus características a material nuclear. Las imágenes nos sugieren una aparente salida de este material a través de los poros nucleares, por lo que estas masas podrían



tener una función similar a los nucleoloides de otras especies. Actualmente se conoce bien la naturaleza ribonucleoproteica de los nucleoloides y su analogía con los nucleolos (Alché 1991; Sato y col. 1991). Es necesario identificar la naturaleza de estas masas densas del tomate para poder establecer su similitud y su posible función en el mecanismo que presenta la microspora para restaurar la población ribosómica.

El sistema de membranas de una célula está representado mayoritariamente por el **retículo endoplásmico**. En nuestro material objeto de estudio el RE prácticamente no existe o es muy escaso hasta bien avanzada la microspora. Es a lo largo de la maduración del polen cuando el RE experimenta un espectacular cambio en cuanto al número y tamaño de sus cisternas. Una diferenciación del RE semejante a la que nosotros observamos en el polen de tomate ha sido descrita en otras especies: *Nicotiana* (Cresti y col. 1985); *Lycopersicum peruvianum* (Cresti y col. 1977); *Euphorbia* (Murgia y col. 1986); *Olea* (Rodríguez-García y Fernández 1990); *Apium* (Weber 1989). El hecho de que las membranas del retículo siempre estén asociadas a ribosomas, tratándose de retículo endoplásmico rugoso, así como la dilatación que experimentan sus cisternas durante el desarrollo indican una elevada síntesis y almacenamiento de proteínas, lo cual también ha sido sugerido por otros autores (Fisher y col. 1968; Jensen 1968; Cresti y col. 1975; Cresti y col. 1977). Recientemente ha sido probada la presencia de proteínas dentro de cisternas del RE en el polen maduro del olivo mediante técnicas inmunocitoquímicas (Rodríguez-García y col. 1992).

## **DISCUSIÓN**

---

La disposición de las cisternas de RE paralelas al plasmalema en el grano de polen maduro, sugieren una función de transporte hacia la pared del grano (Chripeels 1976, 1980; Rodríguez-García y Fernández 1990). Por otra parte la fragmentación que sufren estas cisternas dando lugar a vesículas, indican otra posible vía de reutilización de las proteínas almacenadas en este RE.

Las **mitocondrias** experimentan un incremento en tamaño y número durante el desarrollo y maduración del polen. En el tomate hay que destacar que es justo inmediatamente antes y después de la división mitótica asimétrica, cuando observamos formas alargadas y muy grandes e incluso estranguladas, lo que induce a pensar que las mitocondrias se dividen. Además durante la maduración del grano de polen se aprecia un mayor número de mitocondrias acompañadas de un descenso en su tamaño, lo que parece ser una consecuencia lógica de la división mitocondrial. Otros indicios de que hay una renovación de la mitocondrias es la degradación que se observa en la matriz de algunas de ellas, así como la presencia de vesículas del mismo tamaño y que tienen en su interior restos de matriz, crestas e incluso, a veces, se puede distinguir una doble membrana externa. Es en el material incluido en estas vesículas donde se ha localizado la peroxidasa, lo que sugiere procesos degradativos en los que tiene un papel importante la actividad peroxidásica.

Los **plastos** de la microspora son poco diferenciados, presentando una estructura propia de leucoplastos, siendo hacia el final de este período cuando se observan

los primeros indicios de almidón. Pero no es hasta el polen bicelular avanzado cuando el almidón alcanza su máxima representación. Cabe preguntarse de donde proceden los precursores utilizados en la síntesis del almidón, ya que los plastos sin diferenciar no tienen capacidad de síntesis. Se ha postulado la hipótesis de que los restos glucídicos procedentes de la degradación de la pared de calosa sean reutilizados por la microspora para este fin (Rodríguez-García, García 1978).

Aunque en el tomate los primeros depósitos no aparecen inmediatamente después de la degradación de la calosa, esto no es obstáculo para que los restos de glucosa pueden almacenarse en el lóculo y/o dentro de la gran vacuola citoplásmica que se forma en el estadio de microspora vacuolada. Ello explicaría el que la formación del almidón se produzca en tiempos diferentes de la microsporogénesis según las especies (Paccini y Franchi 1988; Sangwan y Sangwan Norreel 1987). Por otra parte la íntima relación observada entre los plastos y el RE rugoso sugiere la idea de que el RE en estos momentos sea una vía de transporte hacia los plastos de precursores del almidón (Larson 1965). Esta asociación entre plastos y RE ha sido descrita en varias especies (Larson 1965; Cammefort 1970; Dumas 1974; Abreu y Santos 1977; Paccini y Cresti 1976; Rodríguez-García y Sievers 1977) lo que indica que no es esta una peculiaridad del polen de tomate, sino más bien responde a un mecanismo utilizado por la célula cuando las circunstancias lo requieren. A partir de polen bicelular medio se observa una disminución del **almidón** y un incremento de los **cuerpos osmiófilos**, probablemente de naturaleza lipídica. Este hecho también ocurre en otros pólenes (Miki-Hiroshige y Nakamura 1983; Fernández 1986; País y Feijoo 1986, 1987; Charzynska y col. 1989). Todo parece

## **DISCUSIÓN**

---

indicar que se produce una metabolización del almidón hasta lípidos igual que ha sido descrito en *Lilium longiflorum* (Miki-Hiroshige y Nakamura 1983; Bird y col. 1983); *Olea europaea* (Fernández 1986).

Al final de la maduración los cuerpos osmiófilos también desaparecen probablemente para ser metabolizados hasta azúcares. En el caso de semillas oleaginosas también tiene lugar una metabolización de lípidos a azúcares (Beevers 1980). La estrecha relación que existe entre cuerpos osmiófilos y cisternas de RE nos sugiere un papel del RE en la metabolización de los lípidos de una manera análoga a la indicada en cotiledones de sandía sobre la ontogenia de glioxisomas (Wanner y col. 1982).

EVOLUCION DE ORGANULOS CITOPLASMATICOS DURANTE EL DESARROLLO Y MADURACION DEL GRANO DE POLEN DEL TOMATE

	PLASTOS	MITOCONDRIAS	RETICULO ENDOPLASMICO	AP. GOLGI
TETRADAS				
M. R. LIBERADA				
MICROSPORA MEDIA				
MIC. VACUOLADA				NO SE OBSERVA
POLEN BIC. JOVEN				NO SE OBSERVA
POLEN BIC. MEDIO				
POLEN MADURO				

## **DISCUSIÓN**

---

### **5.2.2 NÚCLEO**

Los complejos procesos de diferenciación que tienen lugar durante el desarrollo del polen vienen estrictamente regulados y controlados por el núcleo, de aquí la importancia de este compartimento. Cualquier cambio de la actividad nuclear queda reflejada en su estructura.

La microspora sintetiza durante su desarrollo una gran cantidad de RNA ribosómico y de transferencia. Esta actividad disminuye bruscamente en el polen bicelular (Steffensen 1966; Mascarenhas y Bell 1970; Mascarenhas 1975). Durante la maduración del polen tiene lugar una intensa transcripción y síntesis de RNA mensajero y de proteínas (Mascarenhas 1989). La presencia de determinados enzimas en el polen es consecuencia de la expresión del genoma haploide y no está influido por el genotipo diploide de la planta (Mascarenhas 1989).

Son escasos los estudios sobre la replicación en el grano de polen (Swiff 1950; Moses y Taylor 1955; Jalouzot 1969; Tanaka y col. 1979; Chwirot y Gorska-Brylass 1981; Risueño y col. 1985; Testillano 1991). Estos trabajos muestran que la dinámica del período S de la interfase postmeiótica varía mucho según la especie. La síntesis de DNA tiene lugar bien en un único incremento en fases cercanas a la primera mitosis, o bien en dos incrementos de DNA, uno al principio de la interfase y otro al final de la misma (Jalouzot 1969; Tanaka y col. 1979; Archiaga 1985; Testillano 1991).

En el tomate se ha determinado la evolución de la ultraestructura nuclear a lo largo de la interfase postmeiótica de la tetrada y de los núcleos vegetativo y

generativo durante la maduración del grano de polen. Durante la interfase de la microspora, la **cromatina** en general se encuentra más bien dispersa. Sin, embargo se puede apreciar cierto grado de condensación en el período de tetrada y en la microspora media. El máximo grado de descondensación de la cromatina se detecta en la joven microspora y a lo largo de la vacuolación de la microspora. En este tiempo también se observa una elevada cantidad de gránulos en el nucleoplasma. Finalmente, previo a la mitosis asimétrica, tiene lugar una rápida condensación de la cromatina. Al no contar con resultados de experimentos autorradiográficos, mediante la incorporación de elementos radiactivos (uridina tritiada), no nos ha sido posible determinar las fases  $G_1$ ,  $S_1$  y  $S_2$  de la interfase y relacionarlas con las diferentes estadios de la microspora, así como con los grados de condensación de la cromatina. Sin embargo estas fases si han sido determinadas en otras especies como es el caso de *Scilla peruviana* (Testillano 1991). Aunque sólo sea indirectamente, y teniendo en cuenta las diferencias propias de cada especie, podemos decir que la máxima descondensación de la cromatina tiene lugar durante el período S (según los resultados de Testillano 1991), lo cual implicaría que este período, en el tomate, abarca desde la joven microspora libre hasta la fase vacuolada ya avanzada.

En el polen bicelular el comportamiento de ambos núcleos es completamente distinto. El núcleo generativo sufre una condensación progresiva de su cromatina hasta llegar a la máxima condensación en el grano de polen maduro. El núcleo vegetativo presenta un alto grado de descondensación de su cromatina durante toda la maduración. Sólo en el estadio final, cuando el núcleo pierde su forma esférica,

## **DISCUSIÓN**

---

es posible observar condensación de su cromatina, pero con un patrón diferente al que muestra el núcleo generativo.

En células vegetales la cromatina se estructura según diferentes patrones, dependiendo de la cantidad de DNA total y repetitivo de la especie (Jordan y col. 1980). La cromatina condensada o heterocromatina se ha descrito transcripcionalmente inactiva ya que no se marca en experimentos autorradiográficos con incorporación de uridina tritiada con pulsos cortos (Granboulan y Granbouland 1965; Karasaki y col. 1965; Fakan y Puvion 1980). La inactivación de la cromatina condensada se ha relacionado con el alto grado de compactación de la cromatina. Por tanto las diferencias estructurales de la cromatina en ambos núcleos responde a sus diferencias fisiológicas: mientras el núcleo generativo pasa del período S a G<sub>2</sub> muy pronto, encontrándose ya en polen bicelular medio en fase G<sub>2</sub>, el núcleo vegetativo se detiene en la fase G<sub>1</sub> y nunca entra en el período S de replicación (Zarsky y col. 1992). Sólo al final de la maduración del polen, el núcleo vegetativo presenta signos de entrar en vía terminal de degeneración: lobulación de la cubierta nuclear posiblemente por pérdida del citoesqueleto nuclear, condensación de la cromatina en forma de grumos y diferenciación de la matriz nuclear haciéndose más grisácea y homogénea.

La evolución del **nucleolo** a lo largo de la microspora y del polen bicelular refleja los cambios de actividad relacionados con la biogénesis de ribosomas y su transporte (Warner 1990). Las diferentes etapas de esta biogénesis corresponden a dominios nucleolares, los cuales pueden ser identificados por su morfología. Los



tres dominios nucleolares básicos son: los centros fibrilares (CF), considerados como lugar de almacenamiento de genes ribosomales no transcritos; el componente fibrilar denso (CFD), lugar de transcripción de estos genes y el componente granular (CG), lugar de maduración y almacén de las subunidades ribosomales (Goessens 1984; Hernandez-Verdun 1986). Sin embargo, actualmente no hay unanimidad sobre cuál es el verdadero lugar de transcripción. Algunos autores creen que esta tiene lugar en los CF (Scheer y Benavente 1990); para otros ocurre en el límite entre los CF y el CFD (Derenzini y col. 1990; Thiry y col. 1991) y otros consideran solamente al CFD como responsable de la transcripción (Hartung y col. 1990; Wachtler y col. 1989).

La morfología nucleolar varía drásticamente con los cambios de su actividad. Es bien conocido que las variaciones en la síntesis y/o procesamiento del RNA ribosómico provocan inmediatamente una redistribución de los componentes nucleolares tanto en condiciones experimentales como naturales (Goessens 1984; Hadjiolov 1985; Risueño y Medina 1986; Olmedilla y col. 1987). Ello ha permitido relacionar típicas morfologías nucleolares con diferentes niveles de actividad transcripcional.

De nuestras observaciones durante la interfase de la microspora se desprende que el nucleolo sufre una paulatina activación durante la interfase, al igual que ocurre en la microspora de *Scilla* (Testillano 1991). Una vez que el nucleolo ya está completamente reorganizado en la joven tetrad, esta presenta un aspecto muy compacto y se observa formado solamente por un gran CF en conexión con el NOR y exclusivamente constituido por CFD. También hay que señalar la posible

## **DISCUSIÓN**

---

presencia de una gran vacuola central que le confiere al nucleolo puede tener forma de anillo. La ausencia de CG así como la aparición de grandes CF se ha descrito como una morfología típica de núcleos inactivos en transcripción (Risueño y Medina 1986). Sin embargo, la gran vacuola central hasta ahora ha sido relacionada con nucleolos que presentan una elevada actividad transcripcional (Moreno Díaz de la Espina y col. 1980; Risueño y Medina 1986; Testillano 1991). También se ha sugerido que estas vacuolas podrían estar implicadas en la translocación y almacenamiento de material nucleolar (Moreno Díaz de la Espina y col. 1980). Sin embargo, realmente no se conoce el papel concreto desempeñado por este tipo de vacuolas (Fakan y Hernandez-Verdun 1986).

En la joven microspora aumenta ligeramente el número de CF asociados a vacuolas periféricas, mientras desaparece la gran vacuola central. El CFD sigue siendo mayoritario. Las vacuolas se diferencian fácilmente de los CF por tener un contenido menos denso que los CF y de aspecto similar al del nucleoplasma (Jordan 1984; Risueño y Medina 1986), mientras los CF tienen un aspecto más denso y son argirófilos (Risueño y col. 1988). En células vegetales estas vacuolas se han denominado "vacuolas de reactivación" formadas a partir del gran CF inicial que contiene el NOR, para luego disminuir de tamaño y llegar a desaparecer al mismo tiempo que aumenta la actividad transcripcional del nucleolo (Risueño et al. 1982; Fakan y Hernández-Verdun 1986; Testillano 1991). En la microspora media estas vacuolas se van haciendo más pequeñas, se incrementa el número de pequeños CF homogéneos y aumenta el CG, todo ello indica una mayor actividad nucleolar. En las últimas etapas del estadio de microspora (Microspora vacuolada) el CG es

abundante y aparece entremezclado con el CFD. Ya no existen vacuolas y los numerosos CF son homogéneos y pequeños. Se han descrito estos CF homogéneos como más activos por tener DNA en estado descondensado lo cual está relacionado a una mayor actividad transcripcional del nucleolo (Risueño y Medina 1986). Esta morfología es típica de un nucleolo con gran actividad (Risueño y col. 1982). Todos estos cambios son evidencia de un incremento en la síntesis de RNA<sub>r</sub> durante la interfase de la microspora, durante gran parte de la cual el nucleolo se ha ido activando lentamente hasta llegar al período de microspora vacuolada, en la que según todos los indicios la actividad de transcripción es máxima.

Tras la mitosis asimétrica es posible observar, como desde el principio, los nucleolos de las células recién formadas presentan diferente comportamiento.

La única morfología observada en el núcleo generativo, responde a una baja actividad nucleolar: un sólo CF unido al NOR, rodeado por una masa compacta de CFD y muy poco CG segregado en la periferia. Esta estructura solamente se encuentra en el polen bicelular joven para desaparecer paulatinamente en las siguientes etapas del polen. Esto significa que el nucleolo no llega a activarse y pasa directamente de la reorganización a su extinción. Este hecho es muy significativo y responde a la baja o nula síntesis de RNA de la célula generativa.

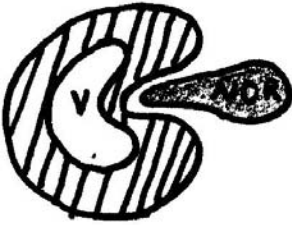



En cambio en la célula vegetativa es conocida por una elevada síntesis de RNA mensajero y de proteínas (Mascarenhas 1989). En el núcleo vegetativo encontramos un nucleolo con la estructura de un nucleolo activo. Paulatinamente esta actividad parece decrecer como se refleja en la segregación que presentan el CFD y CG (Risueño y Medina 1986). Finalmente en el polen maduro, cuando ya cesa

## **DISCUSIÓN**

---




la síntesis de RNA y proteínas el nucleolo también desaparece. Observamos una transformación progresiva de la estructura nucleolar conforme la síntesis de RNA va decayendo (Risueño 1990). Nos encontramos ante un claro ejemplo de la estrecha relación que existe entre estructura-función.

**EVOLUCIÓN DEL NUCLEOLO Y DE LA CROMATINA DURANTE EL DESARROLLO DE LA MICROSPORA DE POLEN DE TOMATE**

	NUCLEOLO	DESCOMPENSACIÓN DE LA CROMATINA
TETRADAS		+
MICROSPORA LIBRE		+++
MICROSPORA MEDIA		++
MICROSPORA VACUOLADA		+++

CFD  CG  V = vacuola

**EVOLUCIÓN DEL NUCLEOLO Y DE LA CROMATINA DURANTE EL  
DESARROLLO Y MADURACIÓN DEL GRANO DE POLEN DE TOMATE**

	P. JOVEN	P. MEDIO	P. MADURO
NUCLEOLO VEGETATIVO			No se observa
NUCLEOLO GENERATIVO		No se observa	No se observa
CROMATINA N VEGETATIVO	- grado de descondensación: +++	- grado de descondensación: +++	- grado de descondensación: +
CROMATINA N GENERATIVO	- grado de condensación: +	- grado de condensación: ++	- grado de condensación: +++

CFD 

CG 

### 5.3\_ ONTOGENIA Y DESARROLLO DE LA PARED DEL GRANO

Una estructura tan compleja como es la pared del grano de polen, despierta interés desde el punto de vista biológico en relación con su ontogenia y diferenciación. Son numerosos los estudios realizados sobre el desarrollo de la pared del polen de diferentes especies vegetales: *Parkinsonia aculeata* (Larson y Lewis 1962); *Poa* (Rowley 1962); *Lilium* (Heslop-Harrison 1968); *Endymium non-scriptus* (Angol 1967); *Lilium longiflorum* (Dickinson 1970); *Lilium* (Rodríguez-García y col. 1983); *Olea europaea* (Fernández y Rodríguez-García 1988, 1989); *Tragopogon porrifolius* (Blackmore y Barnes 1987), entre otros. Nuestros estudios se inician en el estadio de tetradas, donde las microsporas se encuentran rodeadas por una pared de calosa hasta que el grano de polen está maduro y listo para germinar. Este período abarca la formación y desarrollo de la pared del polen.

Durante el período de tetradas se inicia la formación de la pared del polen. Lo primero que se forma es la **primexina** en tetradas muy jóvenes, estando situada entre el plasmalema y la calosa (Heslop-Harrison 1963a). Esta pared inicial también se le ha atribuido una semejanza con el "glicocalix" de las células animales (Rowley y Skvarla, 1975). Se trata de una matriz de naturaleza celulósica (Heslop-Harrison 1968 a,c) en donde se disponen los primeros elementos de la exina: **probáculas** y **protectum**. En la formación de la primexina de algunas especies parecen intervenir vesículas originadas por el aparato de Golgi (Dickinson 1970; Rodríguez-García y col. 1983). En el tomate no se han observado vesículas

## **DISCUSIÓN**

---

de Golgi en relación con la primexina. Esto puede ser debido a que la formación de la primexina tenga lugar en un tiempo muy corto y la probabilidad de encontrara ese estadio es muy pequeña. Pero por otro lado también hay que tener en cuenta que los dictiosomas observados en la joven tetrada del tomate presentan poca actividad, por lo que también puede ser que sea otro tipo de mecanismo el que tiene la célula para formar esta pared.

Actualmente se desconoce de donde proviene la información que determina el "patrón" o "plantilla" de la estructura de la exina, aunque parece haber pruebas a favor de un origen esporofítico (Dickinson y Sheldon 1986). El núcleo diploide es el que contiene esta información como lo demuestra la existencia de microsporas sin núcleo en el caso de meiosis aberrantes, y que sin embargo presentan una exina perfectamente estructurada (Heslop-Harrison 1968a,b). Son varias las hipótesis propuestas en cuanto a como se determina la estructura de la exina. Por un lado se ha propuesto a la pared de calosa como un molde negativo que lleva impresa la "plantilla" de la exina (Waterkeyn, y Bienfait 1970). Por otro lado se le ha atribuido un posible papel a cisternas de retículo endoplásmico orientadas perpendicularmente al plasmalema y que se encuentran en relación con el lugar donde se desarrollarán las báculas (Godwin 1968a, b; Vasil 1973 ; Majeswka y col. 1992). También se ha encontrado acumulación de ribosomas debajo del plasmalema en los sitios de las báculas (Fernández 1986; Alché 1991). En el caso del tomate, es esta acumulación ribosómica la que hemos observado.

El desarrollo de la exina durante el período de tetrada ha sido ampliamente



estudiado (Skvarla y Larson 1966; Heslop-Harrison 1968c; Sheldon y Dickinson 1983, Fernández y Rodríguez-García 1988a). La cuestión en la que aun no se ponen de acuerdo los autores es si la pared de calosa es una barrera impermeable que impide el paso de material del tapetum hacia la pared (Heslop-Harrison y Mackenzie 1967; Sheldon y Dickinson 1983), o por el contrario, el paso de sustancias a través de la calosa es posible (Southworth 1973; Mascarenhas 1975, Rodríguez-García y Majewska 1992), y por tanto no hay impedimento para que el tapetum contribuya a la formación de la pared en este estadio. En el tomate, la presencia de material denso dentro de la calosa de aspecto similar al que constituye las báculas y el tectum, está a favor de esta segunda posibilidad. Una vez que las microsporas son liberadas de la pared de calosa, el engrosamiento y desarrollo de la pared se debe claramente a la deposición de materiales procedentes del tapetum (Risueño y col 1969; Blackmore y Barnes 1990). En el tomate y mediante el uso de la técnica del PTA (Stockert y col. 1989) observamos en estadios jóvenes de desarrollo (microspora recién liberada y media), como se deposita material de aspecto globular en la superficie externa de la pared, el cual se tiñe de igual forma que otras estructuras similares contenidas en el tapetum. Todo esto sugiere un traspaso de sustancias desde el tapetum hacia la exina.

La exina del tomate al igual que otros pólenes muestra dos capas claramente diferenciadas: **ectexina** y **endexina**. Una característica a destacar en el caso del tomate es la **ausencia de capa basal** en la ectexina. En estudios sobre la pared del polen del tomate, se describe a la capa basal como discontinua (Fernández y col. 1992). Sin embargo más que una capa discontinua, en nuestra opinión, se trata de

## **DISCUSIÓN**

---

un ensanchamiento de las báculas o columelas en su parte basal. La falta de esta capa basal junto con la existencia de un tectum atravesado por microcanales, dota al polen de un alto grado de flexibilidad en su pared, facilitando los movimientos de adaptación de la ectexina sobre la endexina. Por otro lado, la presencia de gran cantidad de **estructuras lamelares** o "white line" en la **endexina**, también aumenta la elasticidad (Rowley 1964). Todas estas características aquí expuestas hacen que las zonas interaperturales de la pared jueguen un papel muy importante en los cambios de volumen del grano.

La **intina** es la pared del polen que presenta características y naturaleza propias de una pared celular. El inicio de su formación varía desde microspora (Mattson 1979; Owens y Dickinson 1983) hasta polen bicelular (Rowley 1976) según las especies. El tomate comienza la formación de la intina como en la mayoría de las especies en el estadio de microspora vacuolada.

Mediante el uso de técnicas citoquímicas, como son la técnica de Thiery (Bernhard 1969) y la tinción con PTA (Stocker y col. 1989) es posible comprobar la naturaleza polisacáridica y glicoproteica de esta capa de la pared, así como la implicación en su formación de vesículas citoplásmicas portadoras de precursores polisacáridicos.

Las **aperturas** del polen (Erdtman 1947) son consideradas como una región especializada del esporoderma, más delgada que el resto y que difiere en estructura y/o en su ornamentación. Sin embargo esta definición responde a

estudios morfológicos orientados hacia la taxonomía. La visión que hoy en día se tiene de las aperturas del grano es mucho más dinámica. Gracias a estudios ontogénicos y de desarrollo se sabe que las aperturas son estructuras que sufren grandes cambios a lo largo de la maduración del polen (Fernández y Rodríguez-García 1988b). No se puede hablar de apertura sin tener en cuenta la diferenciación que presenta la intina en esta región en forma de lente u oncus, con tubulaciones dentro de una matriz fibrilar. Este oncus juega un papel fundamental en la función principal de las aperturas como es la germinación. La presencia de proteínas en estas tubulaciones ha sido postulada y demostrada por algunos autores (Knox y Heslop-Harrison 1969). Estas proteínas están relacionadas con fenómenos de reconocimiento y compatibilidad e incompatibilidad polen-estigma (Knox y Heslop-Harrison 1969; Kress 1986; Blackmore y Barnes 1990).

Otra de las funciones de las aperturas de los granos de polen es la de facilitar los cambios de volumen que estos pueden sufrir. Esta función en el caso del tomate, puede estar limitada a la zona del colpo donde la exina es más delgada y la endexina más gruesa, ya que en la zona ecuatorial del colpo donde se encuentra el puente de ectexina, no sería posible un plegamiento de la pared haciéndola más rígida en esta zona. Sin embargo esto no evita que la apertura actúe como un sistema harmomégata (Blackmore y Barnes 1986).

Previo a la germinación del tubo polínico en el estigma es necesario la polinización. Esta puede variar según sea el agente transportador: anemófilo (aire), zoófilo (animales) entomófilo (insectos), hidrófila (agua). En los pólenes entomófilos se ha descrito que la exina tiene una cubierta de material lipídico procedente del

## **DISCUSIÓN**

---

tapetum, que le confiere a los pólenes la capacidad de adherirse a los insectos. Este material es conocido en la literatura como "pollenkitt" (Knoll 1930; Heslop-Harrison 1968a,b; Hesse 1977; Paccini y Juniper 1979). El polen de tomate es entomófilo y sin embargo hay que señalar que nosotros no hemos encontrado "pollenkitt" ni cualquier otro material o restos de tapetum que rodeen o cubran la pared del polen. Por lo que se trata de un dato interesante que habrá que tener en cuenta cuando se hable de la función del "pollenkitt" en relación con la polinización.

La presencia de elementos inorgánicos en la pared del polen, al igual que en el tomate, también ha sido indicada en otras especies (Cercenau-Larrival y Derouet 1988). No es de extrañar que existan elementos que actúan como cofactores dada la elevada actividad que tiene lugar en la superficie del polen: tanto durante la germinación, como en las reacciones de compatibilidad e incompatibilidad. Incluso se ha sugerido una posible relación entre la presencia de determinados elementos inorgánicos, como es el caso del potasio y los caracteres alérgicos que presentan ciertos pólenes (Cercenau-Larrival y Derouet 1988). Sin embargo el potasio es uno de los elementos detectados en la pared del polen de tomate, especie de la que no se conoce hasta ahora ningún tipo de reacción alérgica.

El paso de material a través de la pared del grano de polen ha sido demostrado en diferentes especies utilizando diversas sustancias marcadoras: lantano (Rowley 1976; Fernández y Rodríguez-García 1990); hierro coloidal, (Rowley y Dunbar

1970); peroxidasa exógena y ferritina (Rowley 1975). Como resultado de estos estudios se han descrito varias vías de penetración de material hacia el interior del grano: microcanales, apertura y/o directamente a través de los material de la exina (Rowley y Flynn 1971; Rowley 1975; Rowley y col. 1987; Abadie 1988; Fernández y Rodríguez-García 1990).

Nuestros resultados con el polen de tomate son muy similares a los previamente obtenidos en el polen del olivo (Fernández y Rodríguez-García 1990). La vía de entrada de este material varia según sea el estadio de desarrollo del grano. Las diferencias se hacen más patentes en el polen maduro por la no utilización de la aperturas como vías de paso, así como por la disminución generalizada de entrada de lantano a través del resto de la pared. Posiblemente el grano de polen maduro, ya no necesita que el tapetum o el lóculo de la antera le suministren material y ello coincide con que las estructuras implicadas en este paso, las tubulaciones del oncus de la intina, ya están preparadas para otra función como puede ser el transporte de proteínas necesarias para la germinación. Además el hecho de que la apertura no presente ninguna señal de lantano, también corrobora el que en estadios próximos a la germinación la dirección del flujo de material se haya invertido, siendo ahora dirigida desde el citoplasma hacia el exterior del grano (Fernández y García 1990).

Como es sabido el lantano no tiene capacidad para atravesar las membranas (Revel y Karnovsky 1967; Leonard y col. 1975; Taylor y Hall 1978). Ello implica que el paso tiene lugar mediante un mecanismo de pinocitosis. La presencia de precipitado de lantano en el interior de pequeñas vesículas dispersas por el cito-

## **DISCUSIÓN**

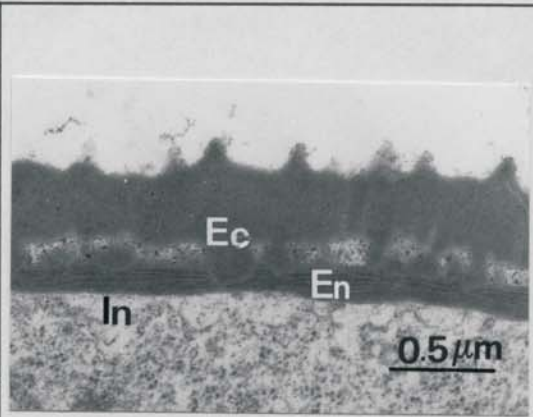
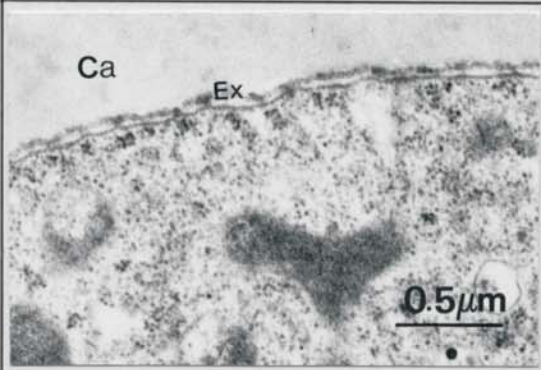
---

plasma del grano de polen de tomate, apoyan esta hipótesis. La endocitosis es uno de los mecanismos de los que se vale el grano para tomar material del exterior una vez que este ha pasado a través de la pared, siempre y cuando este material no pueda atravesar el plasmalema.

Las experiencias del lantano en medio de cultivo, previamente a su fijación, demuestran que los resultados eran repetitivos incluso variando las condiciones. En este caso el paso de lantano se parece más a lo que ocurre en condiciones fisiológicas ya que la fijación es posterior a la incorporación del lantano al medio. Los resultados nos confirman que el paso de sustancias del exterior a través de la pared del grano es una realidad.

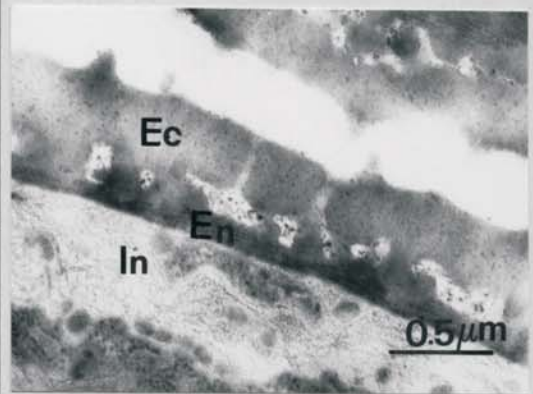
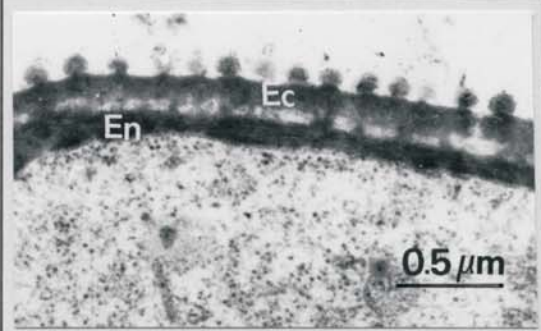
EVOLUCION DE LA PARED DEL GRANO DE POLEN DE TOMATE  
A LO LARGO DE SU DESARROLLO

TETRADAS



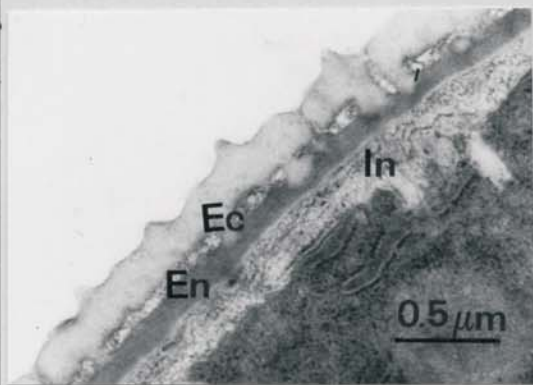
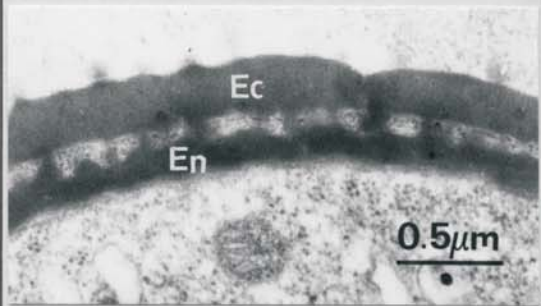
POLEN BICELULAR JOVEN

M. RECIENTE LIBERADA



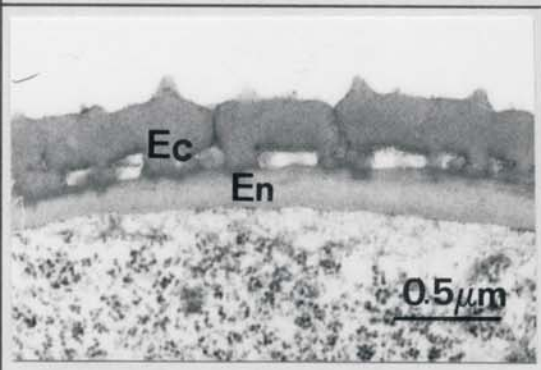
POLEN BICELULAR MEDIO

MICROSPORA MEDIA



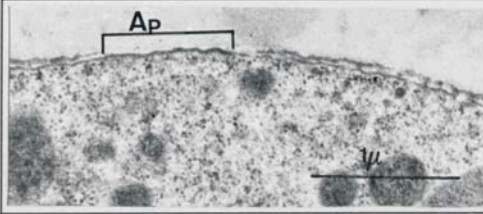
POLEN MADURO

MICROSPORA VACUOLADA

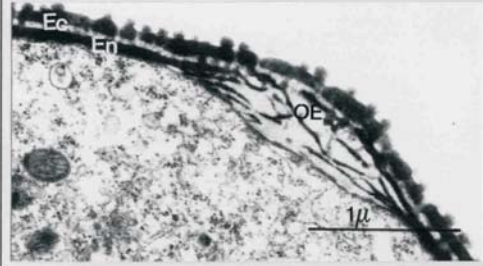


EVOLUCION DE LA REGION APERTURAL DEL GRANO DE POLEN DE TOMATE A LO LARGO DE SU DESARROLLO

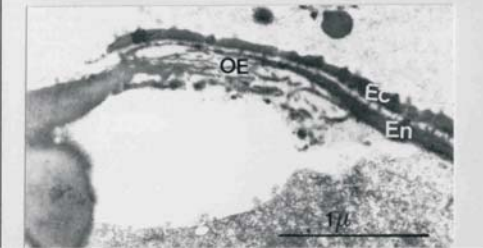
TETRADAS



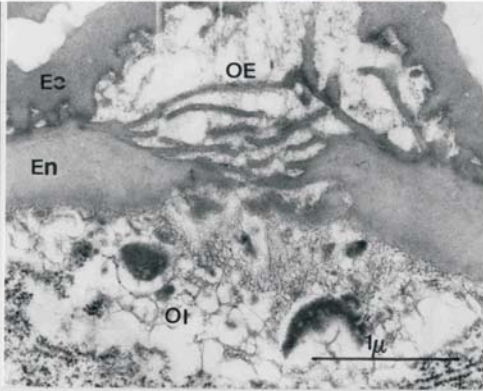
M. RECIENTE LIBERADA



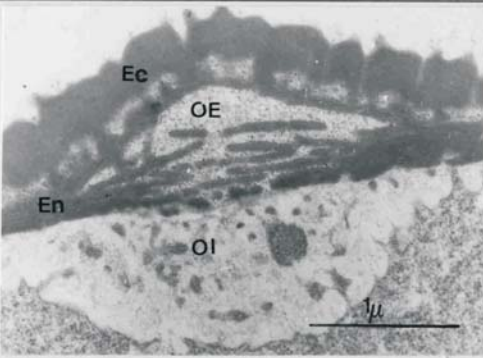
MICROSPORA MEDIA



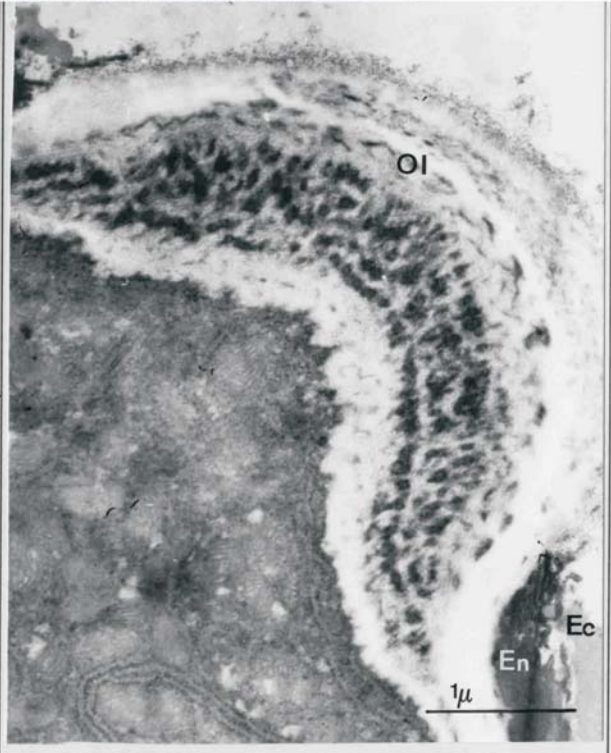
MICROSPORA VACUOLADA



POLEN BICELULAR JOVEN



POLEN BICELULAR MEDIO



POLEN MADURO



#### **5.4- MICROCUERPOS: ACTIVIDAD CATALASA, PEROXIDASA Y OXIDASA**

El grano de polen maduro contiene una elevada cantidad de sustancias de reserva las cuales son utilizadas durante la germinación como fuente de energía. Es un hecho bien conocido que la conversión de lípidos hasta azúcares depende de la cooperación entre glioxisomas (microcuerpos), cuerpos lipídicos, mitocondrias y citoplasma, según ha sido estudiado en semillas oleaginosas (Beevers 1980; Wiskichad y Dry 1985). Sin embargo son escasas las referencias en cuanto a la presencia de microcuerpos en el grano de polen (Clarke y Steer 1983; Pais y Fejioo 1986, 1987; Charzynska 1989). Actividad peroxidásica ha sido citoquímicamente detectada en el polen de algunas gimnospermas (Wrobel y Gorska-Brylass 1988). Más recientemente ha sido estudiada mediante la utilización de métodos bioquímicos la expresión de genes de catalasa en el polen maduro de maíz (Acevedo y Scandalios 1990).

La falta de evidencias morfológicas acerca de la existencia de microcuerpos en el grano de polen de tomate, nos ha llevado a la utilización de técnicas citoquímicas para la detección de marcadores bioquímicos propios de microcuerpos: catalasas, peroxidasas y oxidasas.

La técnica de la DAB permite la identificación de estructuras que contienen catalasa y peroxidasa funcionales.

Según nuestras observaciones la reacción positiva a la DAB se localiza en la superficie de cuerpos osmiófilos en estrecho contacto con cisternas de RER que los

## **DISCUSIÓN**

---

rodean, así como en el interior de estos cuerpos, lo cual nos sugiere que esta reacción sea debida a la actividad catalásica y/o a la actividad peroxidasa.

Cuando utilizamos como inhibidor al AT la actividad catalásica se ve prácticamente inhibida (Recheigl y Evans 1963; Drumm 1970). Por esta razón la presencia de precipitado fino en la zona central de los cuerpos lipídicos sería producto de actividad peroxidasa.

Cuando el control se realizó incubando el material en un medio que sólo contenía DAB (sin  $H_2O_2$ ) las peroxidasa quedan inhibidas al no tener sustrato ( $H_2O_2$ ) sobre el que actuar (Vigil 1970), mientras que las catalasas si son activas. En este caso el precipitado que se localiza en la periferia de los cuerpos lipídicos correspondería a la actividad catalasa. Estos resultados muestran que la catalasa no está localizada en ningún compartimento, sino en el citoplasma estrechamente relacionado con cisternas de retículo y cuerpos lipídicos. Esto coincide con las hipótesis de Goldman y Blobel (1978) quienes sugieren que tanto catalasa como otras enzimas peroxisomales son sintetizadas en el citosol a nivel de polisomas. También Sautter (1989) indica la presencia de catalasa a nivel de RE. Los resultados obtenidos con la técnica de la DAB están en línea con los estudios preliminares realizados en el tomate mediante inmunodetección de catalasa, los cuales indican una localización de esta enzima a nivel de ribosomas asociados a retículo endoplásmico rugoso (resultados no mostrados).

En investigaciones realizadas sobre glioxisomas de cotiledones de sandía (Wanner y col. 1982) se muestra una estrecha relación entre cuerpos lipídicos y RE. Los lípidos comienzan a ser rodeados por cisternas de RE y gradualmente van siendo

metabolizados, dando lugar a un compartimento denominado glioxisoma.

El precipitado de los cuerpos osmiófilos con la DAB también coincide con los resultados obtenidos mediante la técnica del cerio para detectar xantina oxidasa (Angermüller y col. 1987). Algunas células transforman mucho del  $O_2$  que ellas consumen en ión superóxido ( $O_2^-$ ), el cual puede iniciar la peroxidación de lípidos (Ibrahim y Stoward 1978). Existen evidencias claras de que la xantina oxidasa es la principal enzima que cataliza la formación del ión superóxido, siendo por tanto, un buen marcador de la peroxidación de los lípidos (Mead 1976). Los resultados obtenidos en nuestro material indican su presencia en el interior de los lípidos posiblemente para ayudar a su metabolización.

En resumen, en el grano maduro de polen de tomate no hemos observado estructuras que respondan a las características morfológicas de microcuerpos. Sin embargo se detecta claramente la existencia de actividad enzimática de naturaleza peroxidasa, catalasa y oxidasa relacionada íntimamente con cuerpos lipídicos. La semejanza de nuestras observaciones con los resultados obtenidos por Wanner y col. (1982) sobre la ontogenia de glioxisomas de cotiledones de sandía, en los que se muestra una implicación directa del RE y cuerpos lipídicos en la ontogenia de estos microcuerpos, nos hace pensar en la posibilidad de que hayamos estudiado una fase previa en la formación de estas organelas.



# *Conclusiones:*

De los estudios realizados sobre el desarrollo del polen de tomate hemos sacado las siguientes conclusiones:

1- El citoplasma sufre una repoblación gradual durante el desarrollo del grano. El retículo endoplásmico presenta una gran proliferación pasando de estar ausente en la joven microspora, a estar constituido por numerosas cisternas de una gran longitud en el polen maduro.

2- El nucleolo, maquinaria celular de la biogénesis de ribosomas, también experimenta cambios estructurales que están de acuerdo con la información bioquímica disponible sobre la síntesis de RNA. Durante la interfase de la microspora la estructura nucleolar muestra una activación gradual, alcanzando su máxima actividad en la microspora vacuolada. En el grano de polen el nucleolo vegetativo, también muestra una estructura activa pero ligeramente menor que la microspora vacuolada. Esta estructura se mantiene hasta el grano de polen maduro en el que llega a desaparecer. En cambio el nucleolo generativo pasa de un estado muy poco activo a su desaparición en fases tempranas del grano de polen, como corresponde una célula en la que la síntesis de RNA es mínima.

3- Las mitocondrias experimentan un aumento de tamaño a lo largo del período de microspora para disminuir a partir del polen bicelular joven. Al mismo tiempo se aprecia un mayor número de las mismas, lo cual indica que las mitocondrias tienen al menos un ciclo de división. También se observa una degeneración de las mitocondrias, mientras que la población mitocondrial se mantiene lo cual implica la división de estas organelas.

## **CONCLUSIONES**

---

4- El inicio de sustancias de reserva, almidón y cuerpos lipídicos, se visualiza hacia el final de la microspora vacuolada y alcanza su máxima representación en el grano bicelular medio-maduro. En el polen ya maduro se observa una desaparición del almidón y se inicia la metabolización de los cuerpos lipídicos.

5- No se han encontrado orgánulos con características morfológicas propias de microcuerpos que pudieran estar implicados en la metabolización de sustancias de reserva. Sin embargo, si se ha detectado citoquímicamente, actividad catalasa, peroxidasa y oxidasa a nivel de cuerpos lipídicos y del citoplasma que los rodea. Esto unido a la estrecha relación que presentan las cisternas de retículo endoplásmico rugoso con los cuerpos lipídicos, nos sugiere que ambas estructuras pueden estar envueltas en la ontogenia de microcuerpos (de manera análoga a como ha sido propuesto en cotiledones de sandía (Wanner, 1982).

6- La pared del polen del tomate presenta unas características peculiares: columelas muy cortas y macizas, téctum ancho y casi continuo atravesado por microcanales y ausencia de capa basal, por lo que las columelas se insertan directamente en la endexina, la cual contiene gran cantidad de estructuras lamelares. Todos estos rasgos dotan a la pared de una gran flexibilidad, permitiéndola controlar los cambios de volumen producidos por los efectos de la desecación-hidratación del grano como consecuencia de las oscilaciones de temperatura a las que puede estar sometida esta especie.

7- Se ha demostrado que la pared del polen no es una barrera que impide el paso de materiales a través de ella. Las vías de paso varían y dependen del estadio de desarrollo del grano. En estadios más jóvenes, estas vías son microcanales de la exina y aperturas, mientras que en el estadio de polen maduro el paso sólo se realiza a través de la exina ya que las aperturas están preparadas para otra función: la germinación

# ***BIBLIOGRAFIA***

**ABADIE, M.; HIDEAUX, M.; BURY, E.** "Démasquage des substances d'impregnation et de transfert de nature glycoprotéique et polysaccharidique au niveau des parois polliniques de *Dactylis glomerata* L." Étude Botanique (1988) 13<sup>e</sup> série 9:181-201

**ABREU, I.; SANTOS, A.** "Intimate association between endoplasmic reticulum and plastids during microsporogenesis in *Lycopersicon esculentum* Mill and *Solanum tuberosum* L. (1977)

**ACEVEDO, A.; SCANDALIOS, J.G.** "Expression of catalase and superoxidodismutase genes in mature maize pollen" Theor. Appl. Genet. (1990) 80:705-711.

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**ALCHÉ, J.D.; FERNANDEZ, M.C.; RODRIGUEZ-GARCIA, M.I.** "Estudio de la formación de la pared especial de calosa durante la microsporogénesis de *Olea europaea* L. mediante técnicas de microfluorescencia" En: Polen, esporas y sus aplicaciones (Eds: Blanca, G.; Diaz de la Guardia, C.; M.C. Fernandez, M.C.; Garrido, M.; Rodriguez-Garcia, M.I.; Romero Garcia, A.T.) Granada (1990) pp:49-56

**ALCHÉ, J.D.** "Estudio a nivel celular de la microsporogénesis en olivo (*Olea europaea*) (Ultraestructura, citoquímica, Hibridación "in situ") Tesis doctoral, Granada 1991.

**ANGOLD, R.E.** "The ontogeny and fine structure of the pollen grain of *Endymion non-scriptus*" *Rev. of Paleobotany and Palynology* (1967) 3:205-212

**ANGERMÜLLER, S.; LEUPOLD, C.; ZAAR, K. AND FAHIMI, H.D.** " Electron microscopic cytochemical localization of  $\alpha$ hydroxyacid oxidase in rat kidney cortex" *Histochemistry* (1986) 85:411-418

**ANGERMÜLLER, S.; BRUDER, G; VÖLKL,A.; WESCH, H.; FAHIMI, H.D** "Localization of xatina oxidase in crytalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study" *European Journal of Cell Biology* (1987) 45:137-144

**ANGERMÜLLER, S.; LEUPOLD, C.; VÖLKL, A. FAHIMI, H.D.** "Electron microscopic cytochemical localization of  $\alpha$ -hydroxiacid oxidase in rat liver" *Histochemistry* (1986) 85:403-409

**ARNOLD, G. AND HOLTZMAN, E.** "Ultrastructural localization of  $\alpha$ -OH acid oxidase in peroxisomes with the  $CeCl_3$  technique" *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (1980) 28(9): 1025-1028



## **BIBLIOGRAFIA**

---

**ARNOLD, G.; LISCUM, L.; HOLTZMAN, E.** "Ultrastructural localization of d-amino acid oxidase in microperoxisomes of the rat nervous system" *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (1979) 27(3):735-745

**ARQUIAGA, C.** "Análisis citofotométrico y ultraestructural de la interfase de la microspora de *Hyacinthoides non-scripta*" Tesina de licenciatura , Universidad Complutense de Madrid, (1985).

**BAILEY, I. W.** "Some useful techniques in the study and interpretation of pollen morphology" *J. Arnold Arbor* (1960) 41:141-148

**BHANDARI, N.N** "The microsporangium" En: *Embryology of angiosperms* (Ed: Johri, B.M) Springer Heidelberg, New York, (1984) pp:53-121

**BARNABÁS, B; KOVÁCKS, G** "Perspectives of pollen and male gamete selection in cereals". En: *Plant Sperm cells as tools for Biotechnology* (Eds: Wilms, H.J.; Keijzer,C.J.) (1988) pp:137-147

**BATTAGLIA E.** " Meiosi anormale nella microporogenesi di *Laurus nobilis* L." *Atti. d.Società Toscana Sci.Nat.* (1947) 54:1-22

**BEEVERS, H.** "The role of glyoxylate cycle". En: *The Biochemistry of plants vol.4* (Ed: Stumpl P.K.) Academic Press, New York (1980) pp:117-129.

**BENITO MORENO, R.M.; MACKE, F.; ALWEN, A.; HEBERLE-BORS, E.** "In situ seed production after pollination with in vitro matured, isolated pollen" *Planta* (1988) 176:145-148

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**BERNHARD, W.** "A new staining procedure for electron microscopical cytology" *J. Ultras. Research* (1969) 27:250-265

**BHANDARI, N.N.** "The microsporangium" En: *Embryology of angiosperms* (Ed: Johri, B.M.) Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo (1984) pp:53-122

**BIRD, J.; PORTER, K.; DICKINSON, H.G.** "Eventes in the cytoplasm during male meiosis in *Lilium*" *Journal of Cell Science* (1983) 59:27-42.

**BLACKLEY, C.H.** "Experimental researches on the causes and nature of *Catarrhus assyivus*." Londres (1873)

**BLACKMORE, S. AND BARNES, S.H.** "Harmomegathic mechanisms in pollen grains" En: *Pollen and spores: form and function.* (Eds: Blackmore, S; Ferguson, I.K.), Finn. Soc. Symp. Ser. 12 Academic Press London (1986) pp:137-149

**BLACKMORE, S. AND BARNES, S.H.** "Pollen wall morphogenesis in *Tragopogon porrifolius* (Compositae.; Lactuaceae) and its taxonomic significance" *Reivew of Paleobotany and Palinology* (1987a) 52:233-246

**BLACKMORE, S. AND BARNES, S.H.** "Embryophyte spore walls: origin, development and homologies" *Cladistics* (1987b) 3:185-195.

**BLACKMORE, S; BARNES, S.H.** "Pollen wall development in angiosperms". En: *Microspores: Evolution and ontogeny* (Ed: Blackmore, S.; Knox, R.B.) Academic Press (1990) pp:172-192

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**BLACKMORE, S. AND FERGUSON, I.K.** "Pollen and spores: form and function" Blackmore, S; Ferguson, I.K. (Eds), Finn. Soc. Symp. Ser. 12 Academic Press London (1986)

**BLACKMORE, S.; McCONCHIE, C.A.; KNOX, R.B.** "Phylogenetic analysis of the male ontogenetic programe in aquatic and terrestrial monocotyledons" *Cladistics* (1988) 3:333-347

**BONNER, L.J.** "Pollination Biology of *Lycopersicum esculentum* in summer and winter" PhD Thesis, University of Reading, Reading, England (1988)

**BONNETT, H.T. NEWCOMB, E.M.** "Coated vesicles and other cytoplasmic componetes of growing root hairs of radish" *Protoplasma* (1966) 62:59-75

**BROOKS, J. AND SHAW, G.** "Sporopollenin: a review of its chemistry, paleochemistry and geochemistry" *Grana* (1978) 17:91-97

**BROWN, R.** "A brief account of microscopic observations made on the particles contained in the pollen of plants" Londres 1928-1929

**CAMEFORT, H.** "Particularités structurales du gamète femelle chez le *Cryptomeria japonica* D. Don. Formation de complexess plaste-reticulum pendant la periode de maturation du gamète" *C.R.Acad. Sc. Paris* (1970) 271:49-52

**CAUNEAU-PIGOT, A.** "Intérêt du froid pour la conservation et le stockage des pollens allergisants (*Dactyllis glomerata*). Contrôle de la viabilité par les tests de germination in vitro, et des éléments inorganiques détectés par la spectrométrie X à sélection d'énergie (1988)

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**CERCEAU-LARRIVAL, M.T. ET DEROUET, L.** "Relation possible entre les éléments inorganiques détectés par spectrométrie X à sélection d'énergie et l'allergénicité des pollens" *Annales des Sciences Naturelles, Botanique, Paris 13 serie* (1988) 9:133-152

**CHWIROT, W.B; GORSKA-BRYLASS, A.** "Variations of total protein content and protein synthesis during microsporogenesis in *Larix europaea* L" *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* (1981) 50:33-38

**CIAMPOLINI, F.; MOSCATELLI, A.; CRESTI, M.** "Ultrastructural features of *Aloe ciliaris* pollen. I. Mature grain its activation in vitro" *Sex. Plant. Reprod.* (1988) 1:88-96.

**CLARK, M.A.; ACKERMAN, A.** "A histochemical evaluation of the pyroantimoniate-osmium reaction" *J. Histochem. Cytochem.* (1971) 19:727-737

**CLARKE, E.; STEER, M.W.** "Cytoplasmic structure of germinated and ungerminated pollen grains of *Tradescantia virginiana*" *Caryologia* (1983) 36:299-305

**CRESTI, M.; CIAMPOLINI, F. AND KAPIL, R.N.** "Generative Cells of some angiosperms with particular emphasis on their microtubules" *Journal of Submicroscopic Cytology* (1984) 16:317-326

**CRESTI, M.; CIAMPOLINI, F.; MULCAHY, D.L.M.; MULCAHY G.** "Ultrastructure of *Nicotiana glauca* pollen, its germination and early tube formation" *Am. J. Bot.* (1985) 72:719-727

**CRESTI, M; CIAMPOLINI, F.; SARFATTI, G.** "Ultrastructural investigations in *Lycopersicon peruvianum* pollen activation and pollen tube organization after self and cross pollination". *Planta* (1980) 150:211-217

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**CRESTI, M.; PACINI, E.; CIAMPOLINI, F. SARFATTI, G.** "Germination and early tube development in vitro *Lycopersicum peruvianum* pollen: Ultrastructural features" *Planta* (1977) 136:239-247

**CRESTI, M.; PACINI, E.; SARFATTI, G.; SIMONCIOLI, C.** "Ultrastructural features and storage function of *Lycopersicum peruvianum* pollen". En: Gamete competition in plants and animals (Ed: Mulchany, D.L.) (1975). North Holland publishing company-Amsterdam, The Netherlands.

**CRESTI, M.; TIEZZI, A.** "Germination and pollen tube formation". En: Microspores: Evolution and ontogeny (Ed: Blackmore, S.; Knox, R.B.) Academic Press (1990) pp:239-263

**CHARZYNSKA, M.; MURGIA, M.; CRESTI, M.** "Ultrastructure of the vegetative cell of *Brassica napus* pollen with particular reference to microbodies" *Protoplasma* (1989) 152:22-28.

**CHRISPEELS, M.J.** "Biosynthesis, intracellular transport and secretion of extracellular macromolecules" *Ann. Rev. Pl. Physiol* (1976) 27:19-38

**CHRISPEELS, M.J.** "The endoplasmic reticulum". En: The biochemistry of the plants 1 (Eds: Toldbert, N.E.). The plant cell, N.Y. Academic Press (1980) pp:389-412

**CURRIER, H.B.; STRUGGER, S.** "Aniline blue and fluorescence microscopy of callose in Bulb scales of *Allium cepa* L." *Protoplasma* (1956) 45:552-559

**DERENZINI, M.; THIRY, M.; GOESSENS, G.** "Ultrastructural cytochemistry of the mamalian cells nucleolus" *J. Histochem. Cytochem.* (1990) 38:1237-1256

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**DICKINSON, H.G.** "Ultrastructural aspects of primexine formation in the microspore tetrad of *Lilium longiflorum*" *Cytobiol.* (1970) 1:437-449

**DICKINSON, H.G.; HESLOP-HARRISON J.** "The ribosome cycle, nucleoli and cytoplasmic nucleoloids in the meiocytes of *Lilium*". *Protoplasma* (1970) 69:181-200

**DICKINSON, H.G.; HESLOP-HARRISON J.** "Ribosomes, membranes and organelles during meiosis in angiosperms" *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* (1977) 277:327-342

**DICKINSON, H.G.; SHELDON, J.M.** "A radial system of microtubules extending between the nuclear envelope and the plasma membrane during early male haplophase in flowering plants" *Planta* (1984) 161:86-90

**DICKINSON, H.G.; SHELDON, J.M.** "The generation of pattering at the plasma membrane of the young microspore of *Lilium*". En: *Pollen and spores form and function.* (Eds: Blackmore, S. and Ferguson) (1986) pp:1-17

**DRUMM, H.; FALK, H.; MOLLER, J.; HORH, H.** "The development of catalase in the mustard seedling" *Cytobiologie* (1970) 2:335-340.

**DUMAS, C.** "Les associations reticulum endoplasmique-plaste et la sécrétion stigmatique". *Le Botaniste* (1974) VIII 56:81-102

**DUMAS, C.; GAUDE, T.** "Stigma-pollen recognition and pollen hydratation" *Physiologia Plantarum* (1983) 20:118-127

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**DUMAS, C.; KNOX, R.B.; McCONCHIE, C.A.; RUSSELL, S.D.** "Emerging physiological concepts in fertilization". *What's New in Plant Physiology* (1984) 15:17-20

**DUNBAR, A.** "Pollen ontogeny in some species of Campanulaceae. A study by electron microscopy" *Bot. Notiser* (1973a) 126:277-315

**DUNBAR, A.** "Pollen development in the *Elocharis palustris* group (Cyperaceae) I. Ultrastructure and ontogeny" *Bot. Notiser* (1973b) 126:197-254

**DUNWELL, J.M.; SUNDERLAND, N.** "Anther culture of *Solanum tuberosum* L." *Euphytica* (1973) 2:317-323.

**DUPLAN, J.C.; DUMAS, C.** "Viabilité pollinique et conservation du pollen" En: *Incompatibilité Pollinique et Amélioration des Plantes* (Eds: Y. Herve and Dumas C.) Université de Lyon Press, Lyon (1984) pp:40-90

**ERDTMAN, G.** "Suggestions for the classification of fossil and recent pollen grains and spores" *Svensk Bot. Tidskr.*(1947) 41:104-114

**ERDTMAN, G.** "Pollen morphology and plant Taxonomy, Angiosperms". Uppasala (1952) 539pp.

**ERDTMAN, G.** "Handbook of palinology" Hafner. New York (1969)

**EVANS, D.E.; SINGH, M.B.; KNOX, R.B.** "Pollen development: applications in Biotechnology" En: *Microspores: Evolution and Ontogeny.* (Eds: Blackmore, S; Knox, R.B.) Academic Press, London, (1990) 309-338

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**FAEGRI, K.** "Recent trends in palynology" Bot. Rev. (1956) 22:639-664.

**FAEGRI, K. AND IVERSEN** "Textbook of Pollen Analysis". Munksgaard, Copenage, (1950)  
237pp .

**FAKAN, S.; PUVION, E.** "The ultrastructural visualization of nuclear ribonucleoprotein antigens within spread transcription complexes" int. Rev. Cytol. (1980) 65:255-299.

**FEIJÓ, J.A.; PAIS, M.S.M.** "Ultrastructural modifications of plastids and starch metabolism during the microsporogenesis of *Ophrys lutea* (Orchidaceae)" Annals of Botany (1988) 61:215-219

**FERNANDEZ, M.C.** "Estudio ultraestructural, citoquímico, morfométrico del grano de polen del olivo (*Olea europaea*) durante su formación. Tesis doctoral, Granada, 1986.

**FERNANDEZ, M.C AND RODRIGUEZ-GARCIA, M.I.** "Ultraestructura y desarrollo de la pared celular del grano de polen del olivo (*Olea europaea*): II zona apertural" An. Asoc. Palinol. Leng. Espa. (1985) 2:237-246.

**FERNANDEZ, M.C. AND RODRIGUEZ-GARCIA, M.I.** "Pollen wall development in *Olea europaea*" New Phytol. (1988a) 108:91-99

**FERNANDEZ, M.C.; RODRIGUEZ-GARCIA, M.I.** "A review of the terminology applied to apertural thickenings of the pollen grain: Zwischenkörper or oncus?" Review of Paleobotany and Palynology (1988b) 54:159-163



## **BIBLIOGRAFIA**

---

**FERNANDEZ, M.C.; RODRIGUEZ-GÁRCIA, M.I.** "Developmental changes in the aperture during pollen grain ontogeny in *Olea europaea* L. *New Phytologist* (1989) 108:91-99

**FERNANDEZ-FERNANDEZ, M.C.; ALCHÉ, J.D.; RODRIGUEZ-GARCIA, M.I.** "Ultraestructura de la pared del grano de polen de *Lycopersicum esculentum*" En: *Polen, esporas y sus aplicaciones* (Eds: Blanca, G.; Diaz de la Guardia, C.; M.C. Fernandez, M.C.; Garrido, M.; Rodriguez-Garcia, M.I.; Romero Garcia, A.T.) Granada (1990) pp:65-72

**FERNANDEZ-FERNANDEZ, M.C.; RODRIGUEZ-GARCIA, M.I.** "Passage of Lanthanum through the pollen wall of *Olea europaea* L. during development". *Plant Cell Reports* (1990) 8:667-671

**FERNANDEZ, M.C.; ROMERO-GARCIA, A.T.; RODRIGUEZ-GARCIA, M.I.** "Aperture structure, development and function in *Lycopersicum esculentum* Miller (Solanaceae) pollen grain" *Review of Paleobotany and Palynology* (1992) 72:41-48

**FISHER, H.** "Beiträge zur vergleichenden morphologie der pollenkörner" Breslav (1890)

**FISHER, D.B.; JENSEN, W.A.; ASHTON, M.E.** "Histochemic studies of pollen: storage pockets in the endoplasmic reticulum" *Histochemical J.* (1968) 13:169-182

**FONT QUER, P.** "Diccionario de Botánica" Ed labor s.a. (1985) 1244pp.

**FOROUGHI-WEHR, B.; WENZEL, G.** "Androgenic haploid production" *IAPTC Newslett* (1989) 58:11-18

**FRANKEL, O.** "the nucleolar cycle in some species of *Fritillaria*" *Cytologia* (1937) 8:37-47

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**FRANKEL, R; IZHAR, S.; NITSEN, J.** "The timing of calose activity and cytoplasmic male sterility in *Petunia*" *Biochem. Genet.* (1969) 3:451-455

**GAVAUDAN, P.** "Exchanges de matériaux figurés entre noyau et cytoplasme" *Gallica. Biol. Acta* (1948) 1:225-226

**GAVAUDAN, P. AND YU CHIN-CHEN** "Centrosomes et extrusions chromatiques chez les angiosperms" *Actualités Scientifique et Industrielles* 319 Paris Hermann and Cia (1936)

**GODWIN, H.** "The origin of the exine" *New Phytology* (1968) 67:667-678

**GODWIN, H.** "Pollen exine formation" *Nature* (1968) 220:389

**GOESSENS, G.** "Nuclear structure" *Int. Rev. Cyt.* (1984) 87:107-158

**GOLDMAND, B.H. AND BLOBEL G.** "Biogenesis of peroxisomes: intracellular site of synthesis of catalase and uricase" *Proceedings of the National Academic of sciences of U.S.A.* (1978) 75:5066-70.

**GORSKA-BRYLASS, A.; CHWIROT, W.; MAJEWSKA, A.** "Ultrastructural and metabolic transformations of the larch microspore during G<sub>1</sub> period of the postmeiotic interphase" *Postepy Biologii Komori* (1984) 11:577-580

**GRANBOULAN, N.; GRANBOULAN, P.** "Cytochimie ultrastructural du nucléole. II. Etude des sites de synthèse du RNA dans le nucléole et le noyau" *Exp. Cell Res.* (1965) 38:604-619

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**GRESSHOFF, P.M.; DOY, C.H.:** "Development and differentiation of haploid *Lycopersicum esculentum* (Tomato)". *Planta* (Berl.) (1972) 107:161-170.

**GUHA, S.; MAHESHWARI, S.:** "Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura* in vitro". *Nature* (1964) 212:97-98.

**GULSHAN; VARGHESE T.M. & SHARMA, D.R.:** "Studies on anther cultures of tomato *Lycopersicum esculentum* Mill". *Biologia Plantarum* (Praha) (1981) 23: 414-420

**HADJIOLOV, A.A.** "The nucleolus and the ribosome biogenesis" En: *Cell Biology monographs* Vol. 12 (Eds: Alfert, M.; Beermann, W.; Glodstein, K.R.; Porter, P.; Sittle, P) Wien, New York, Springer and verlag (1985) pp:1-268

**HAGEMANN, R.** "Unequal plastid distribution during the development of the male gametophyte of angiosperms" *Acta Bot. Soc. Pol.* (1981) 50:321-327

**HARDIN, J.H. AND SPICER, S.S.** " Ultrastructure of neuronal nucleoli of rat trigeminal ganglia: comparasion of routine with pyroantimoniate-osmium tetroxide fixation" *J. Ultrastruct. Res.* (1970) 31:16-36

**HARTUNG, M.; WACHTLER, F.; DE LANVERSIN; FOUET, C.; SCHARZACHER, H.G.; STAHL, A.** "Sequetial changes in the nucleoli of human spermatogonia with special refernce to rDNA localization and transcription" *Tissue and Cell* (1990) 22:25-37

**HEBERLE-BORS, E.** "In vitro haploid formation from pollen: a critical review" *Theor. Appl. Genet.* (1985) 71:361-374

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**HERNANDEZ, F.** "Historia natural de la nueva España" Vol. 5 (1580).

**HERNANDEZ-VERDUN, D.** "The nucleolus today" J. of Cell Science (1991) 99:465-471

**HERNANDEZ-VERDUN, D.** "Structural organization of the nucleolus in mamalian cells" En: Methods and achievements in experimental pathology (Eds: Jasmin, G; Simard, R.) vol.12 Karger Basel (1968) 26-62

**HESLOP-HARRISON, J.** "An ultrastructural study of pollen wall ontogeny in *Silene pendula*". Grana Palinologica (1963a) 4:7-24

**HESLOP-HARRISON, J.** "Cell walls, cell membranes and protoplasmic connections during meiosis and pollen development" En: Pollen Physiology and Fertilization. (Ed:Linskens H.F.), North-Holland Publ. Amsterdam The Netherlands (1964) pp:39-47

**HESLOP-HARRISON, J.** "Cytoplasmic conections between angiosperms meiocytes" Ann. Bot. (1966a) 30:221-230

**HESLOP-HARRISON, J.** "Cytoplasmic continuities during spore formation in flowering plants" Endeavour (1966,b) 25:65-72

**HESLOP-HARRISON, J.** "The pollen grain wall". Science (1968a) 161: 230-237

**HESLOP-HARRISON, J.** "Tapetal origin of pollen coat substances in *Lilium*". New Phytol. (1968b) 67:779-786

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**HESLOP-HARRISON, J.** "Wall development within the microspore tetrad on *Lilium longiflorum*".

Canadian Journal of Botany (1968c) 46:1185-1192

**HESLOP-HARRISON, J.** "Pollen germination and pollen tube growth" International Review of

Cytology (1987) 107:1-78

**HESLOP-HARRISON, J. AND MACKENZIE, A.** "Autoradiography of (2-<sup>14</sup>C)-Thymidinederivate during meiosis and microsporogenesis in *Lilium* anthers" J. Cell Sci. (1967) 2:387-800

**HESLOP-HARRISON, Y.; HESLOP-HARRISON, J.S; HESLOP-HARRISON, J.**

"Germination of *Corylus avellana* L. pollen: hydratation and the function of the oncus" Acta

Botánica Neederland (1986) 35:265-284

**HESSE, M.** "Vergleichenden untersuchungen zur entwicklungsgeschichte und ultrastruktur von

pollenklebstoffen bei verschiedenen Angiospermen" Mitt. Bot. Linz (1977) 9:237-258

**HUANG, A.H.C.; TRELEASE, N. AND MOORE, T.S.** "Plant peroxisomes" Acad. Press. New

York (1983)

**HUYNH, K.L.** "Arrangement of some monosulcate, disulcate, trisulcate, dicolpate and tricolpate

pollen types in the tetrads and some aspects of evolution in the angiosperms" En:The evolutionary

significance of the exine. (Eds:Ferguson, I.K.; Muller, J.). Academic Press London (1976) pp:101-

124

**HYDE, M. A.** "Studies in atmospheric pollen". New Phytologist (1950)

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**IBRAHIM, B. AND STOWARD, P.** "The histochemical localizatio of xathine oxidase"  
Histochemical Journal (1978) 10:615-617

**IGLESIAS P.** "El libro del tomate". Ed. Alianza (1988) pp:13-20

**ISLAM, A.S.** "The embryology of *Ottelia alismoides*" Pers. Jour. Indian Bot. Soc. (1950) 29:79-91.

**IZHAR, S.; FRANKEL, R.** "Mechanism of male sterility in *Petunia* II. Free amino acids in male fertile and male sterile anthers during microsporogenesis" Theor. Appl. Genet. (1971) 43:13-17

**JALOUZOT, R.** "Differenciacion nucleaire et cytoplasmique du grain de pollen de *Llium candidum*" Exp. Cell. Res. (1969) 55:1-8

**JENSEN, W.A.; FISHER D.B.; ASHTON M.E.** "Cotton embryogenesis: the pollen cytoplasm"  
Planta (1968) 81: 206-228

**JORDAN, E.G.** "Nucleolar nomenclature" J. Cell Sci. (1984) 67:217-220

**JORDAN, E.G.; TIMMIS, J.V.; TREWARAS, A.J.** "The plant nucleus" En: The biochemistry of plants, Vol. 1. (Ed: Toldber, N.E.) Academic Press. NY, London (1980)  
pp:489-588

**JULIANO, J.B.; ALCALÁ P.E.** "Floral morphology of *Musa errans* (Blanco) Teodoro var. Botoan Teodoro." Philippine Agr. (1933) 22:91-126

**KARASAKI, S.** "Electron microscopic examination of the sites of nuclear RNA synthesis during amphibian embryogenesis" J. Cell Biol. (1965) 26:322-335

**KESSLER, G.** "Zur Charakterisierung der Siebröhrenkallose" Ber. Schweiz. Bot. Ges. (1958) 68:5-43

**KIERSZENBAUM, A.L.; LIBANATI, C.M.; TANDLER, C.J.** "The distribution of inorganic cations in mouse testis" J. Cell Biol. (1971) 48:314-323

**KNOLL, F.** "Über pollenkit und bestäubungsart". Z. Bot (1930) 23: 610-675

**KNOLL, F.** "Eine strenvorrichtung zur untersuchung der pollenverkittung" Oesterr Bot Z (1936) 85: 161-182

**KNOX, R.B.** "The pollen grain" En: Embryology of angiosperms (Ed: Johri B.M.) Berlin and Heidelberg: Springer and Verlag. (1984) 197-271

**KNOX, R.B. AND HESLOP-HARRISON, J.** "Cytochemical localization of enzymes in the wall of pollen grain" Nature (1969) 223:92-94

**KOLATTUKUDY P.E.** "Cutin, suberin and waxes" En: The biochemistry of plants Vol. 4 (Eds: Stumpf, P.K. ; Conn E.E.) Academic Press New York (1980) pp:571-645.

**KRESS, W.J.** "Exineless pollen structure and pollination system of tropical *Heliconia* (Heliconiaceae)". En Pollen and spores: form and function (Eds: Blackmore,S and Ferguson, I.K.) Academic Press, London (1986) pp:329-345

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**KRESS, W.J. AND STONE, D.E.** "Pollen intine structure, cytochemistry and function in monocots" En: Pollen Biology and implications for plant breeding (Ed: Mulcahy, D.; Ottaviano, E.) Elsevier (1983) pp:159-165

**KYO, H. AND HARADA, H.** "Control of developmental pathway of tobacco pollen "in vitro".  
Planta (1986) 168:427-432.

**LATTER, J.** "The pollen development of *Lathyrus odoratus*" Ann. Bot. (1926) 40:272-314

**LARSON, D.A.** "Fine structural changes in the cytoplasm of germinating pollen" Amer. J. Bot.  
(1965) 52:139-154

**LARSON, A.; LEWIS, C.W.** "Pollen wall development *Parkinsonia aculeata*" Grana Palynol  
(1962) 3:21-27

**LEONARD, R.T.; NAGAHASHI, G.; THOMSOM, W.W.** "Effect of lanthanum on ion  
absorption in corn roots" Plant Physiol (1975) 55:542-546

**LEVENKO, B.A.; KUNAKH, V.; & GALINA, N.Y.:** "Studies on callus tissue from anthers. I  
tomato". Phytomorphology 27: 377-383 (1977).

**LINSKENS,H.F.** "Isolation of ribosomes from pollen" Planta (1967a) 73:193-200

**LINSKENS, H.F.** "Pollen" En Sexuality, Reproduccion, Alteration of Generatons (Ed: Linskens,  
H.F.; Straub, J.; Ruhland, W.) Encyclopedia of Plant Physiology, Vol:18. Springer and Verlag  
Berlin, Heidelberg, New Yok, Tokyo (1967b) pp: 368-406



## **BIBLIOGRAFIA**

---

**LINSKENS, H.J. AND CRESTI, M.** "The effect of the temperature, humidity and light on the dehiscence of tobacco anthers" Proceedings Koninklijke Ned. Akad. Wetensch (1988) 91:369-375

**LUMSDEN, R.D.; OAKS, J.A.; HILLS, R.R.** J. Parasitol (1969) 55:1119-1133

**MAHESHWARI, P.** "The male gametophyte in angiosperms" Bot. Rev. (1949) 15:1-75

**MAHESHWARI, P.** "An introduction to embryology of angiosperms". Mac Graw Hill New York (1950)

**MAHESHWARI, P; TYAGI, A.K.; MALHOTRA, K.** "Induction of haploidy from pollen grains in Angiosperms- the current status" Theor. Appl. Genet. (1980) 58:193-206

**MAJEWSKA-SAWKA, A.; JASSEM,B; RODRIGUEZ-GARCIA, M.I.** "Pollen wall development in *Beta vulgaris*" (En prensa)

**MARGOLIASH, E.; NOVOGRODSKY A.** "A study of inhibition of catalase by 3-amino-1,2,4-triazole" Biochem. J. (1958) 68:468-475.

**MARINOZZI, V.** "Phosphotungstic acid (PTA) as a stain for polysaccharides and glycoproteins in electronmicroscopy" Fourth European Regional Conference in Electron Microscopy (1968) Roma pp:55-56

**MARTINEZ, L.D.; NOHER DE HALAC, I.** "Morfogénesis "in vitro" en callos de *Oenotera hookeri* De Vries" Libro de resúmenes del V Congreso Iberoamericano de Biología Celular, Málaga (1992) pp:144

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**MASCARENHAS, J.P.** "The Biochemistry of Angiosperms pollen development" Bot. Rev. (1975) 41:259-314

**MASCARENHAS, J.P.** "The male gametophyte of flowering plants". The plant Cell (1989) 1:657-664

**MASCARENHAS, J.P.; BELL, E.** "RNA synthesis during development of the male gametophyte of *Tradescantia*" Developmental Biology (1970) 21:475-490

**MATTSON, O.** "The development of dimorphic pollen in *Tripogondra commelinaceae*" En: The evolucionary significance of the exine. (Es: I.K. Ferguson; J., Muller) Linnean Society Simposium series (1979) 1:163-183

**MEAD, J.F.** "Free radical mechanisms of lipid damage and consequences for cellular membranes" En: Free radicals in Biology (Ed: Pryot, W.A.) New York: Academic press. Vol. 1 Capitulo 2 (1983)

**MIKI-HIROSHIGE, M. AND NAKAMURA S.** "growth and differentiation of amiloplast during male gamete development in *Lilium longiflorum*" En: Pollen Biologiy and implications for plant breeding (Eds: Mulchy D. and Ottaviano E.) (1983) 141-147

**MOENS, P.B.** "A new interpretation of meiotic prophase in *Lycopersicum esculentum* (tomato)". Chromosoma (1964) 15:231-242

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**MORENO DIAZ DE LA ESPINA, S.; MEDINA, F.J.; RISUEÑO, M.C.** "Correlation of nucleolar activity and nucleolar vacuolation in plant cells" *European Journal of Cell Biol.* (1980) 22:742-729

**MOSES, M.J.; TAYLOR, J.H.** "Desoxypentose nucleic acid synthesis during microsporogenesis in *Tradescantia*" *Exp. Cell Res.* (1955) 9:474-488

**MÜHLETHALER, K.** "Untersuchungen über die struktur der pollenmembran" *Mikroskopie* (1953) 18

**MÜLLER W.C; BEECKMAN, C.H.** "Ultrastructural localization of polyphenoloxidase and peroxidase in roots and hypocotyls of cotton seedlings" *Can. J. Bot.* (1978) 56: 1578-1587

**MURASHIGE T. AND SKOOG F.** "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures" *Physiol Plant* (1962) 15:473

**MURGIA, M; WILMS, H.J.; CRESTI, M; CESCA, G.** "Ultrastructure of pollen development in *Euphorbia dulcis* L. 1. Diploids plants". *Acta Bot. Neerl* (1986) 35:405-424

**NAKATA, K.; TANAKA, M.:** "Differentiation of embryoids from developing germ cells in anther culture of tobacco" *Japan. J. Genetics.* 43: 65-71 (1968)

**NAWASCHIN, S.C.** "Resultate einer revision der befruchtungsvorgänge bei *lilium artagon* und *Fritillaria tenella*". *Bull Acad Imp Sci. St. Petersburg* (1898) 9:377-387

**OLMEDILLA, A; RISUEÑO, M.C; FERNANDEZ-GOMEZ, E.** "Action of  $\alpha$ amanitin, ethidium bromide, and cycloheximide on rRNA metabolism in plant cells" *Biol. Cell* (1987) 60:183-192

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**OWENS, S.J. AND DICKINSON, H.G.** "Pollen wall development in *Gibasis*" Ann Bot. (1983) 51:1-15

**PACINI, E. AND CRESTI, M.** "Close association between plastids and endoplasmic reticulum cisterns during pollen grain development in *Lycopersicum peruvianum*" J. Ultrastructure research (1976) 260-265

**PACINI, E. AND CRESTI, M.** "Ultrastructural characteristics of tapetum and microspore mother cells in *Lycopersicum peruvianum* during meiotic prophase" Bull. Soc. Bot. Fr. Act. Bot. (1978) 1-2:121-128

**PACINI, E. AND FRANCHI, G.G.** "Amylogenesis and amyolysis during pollen grain development" En Sexual Reproduction in Higher Plants (Eds: Cresti, M.; Gori, P.; Pacini, E.) Springer and Verlag, Berlin (1988) pp:181-186

**PACINI, E. AND JUNIPER, B.** "The ultrastructure of pollen grain development in the olive (*Olea europaea*) I: Proteins in the pore" New phytologist (1979) 83:157-163

**PACINI, E. AND JUNIPER, B.** "The ultrastructure of pollen grain development in *Lycopersicum peruvianum*" Caryología (1984) 37:21-50

**PAIS, M.S.; FEIJOO, J.A.** "Microbial proliferation and lipid catabolism in pollen grains maturation of *Ophrys lutea*" Eur. J. Cell Biol. (1986) 41(supp 14) 32.

**PAIS, M.S.; FEIJOO, J.A.** "Microbody proliferation during the microsporogenesis of *Ophrys lutea* Cav. (Orchidaceae)" Protolasma (1987) 138:149-155.

## **BIBLIOGRAFIA**

---

- PALAU, A.** "Explicación de la Filosofía y fundamentos botánicos de Linneo" Madrid 1778.
- PANKOW, H.** "Über den pollenkitt bei *Galanthus nivalis*" Flora 146:240-253
- PARMLEY, R.T.; SPICER, S.S.; POON, K. AND WRIGHT, J.** "Cytochemical localization of glycoconjugate in mitochondria" J. Histochem. Cytochem. (1976) 24:1159-1168
- PEASE, D.C.** "Polysaccharides associated with the exterior surface of epithelial cells: kidney, intestine, brain" J. Ultrastruct. Res. (1966) 15:555-588
- PEASE, D.C.** "Phosphotungstic acid as a specific electron stain for complex carbohydrates" J. Histochem. Cytochem. (1970) 18:455-458
- PELTRE, G.; CERCEAU-LARRIVAL M.T.; HIDEAUX, M.; ABADIE, M.** "Scanning and transmission electron microscopy related to immunochemical analysis of grass pollen" Grana (1987) 26:158-170
- PFAHLER, P.L.** "Biology of the maize male gametophyte" En: Maize breeding and genetics (Ed: Walden, D.B.) Wiley, New York, (1978) pp:517-530
- PHOL, F.** "Kittstoffreste auf der pollenoberfläche windblütiger pflanzen. Untersuchungen zur morphologie und biologie des pollens II" Beih Bot Zbl Abt A. (1930) 46:286-305
- PLA DALMAU, J.M.** "Polen" (1961) 510pp.

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**POLAK, J.M.; VAN NOORDEN, S.** "An introduction to immunocytochemistry: current techniques and problems" Microscopy Handbooks 11. Oxford University press. Royal Microscopical Society (1988)

**POLOWICK, P.L. AND SAWHNEY, V.K.** "Ultrastructural changes in the cell wall, nucleus and cytoplasm of pollen mother cells during meiotic prophase I in *Lycopersicum esculentum* (Mill.)" Protoplasma (1992) 169:139-147

**POLUNIN, O.** "Guia de campo de las flores de Europa" Ed. Omega (1982) pp:1184-1185

**PURKINJE, J.E.** "De cel-lulis anthera cum fibrosis nec non de granurum pollinarum formis comentatio phytotomica". Eresburgo (1830)

**PRASKASH, J; GILES, K.L.** "Induction and growth of androgenic haploids" International Review of Cytology, Academic Press Vol:107 (1987) pp:273-292

**RAMBOURG, A.** "Morphological and histochemical aspectes of glycoproteins at the surface of animals cells" Int. Rew. Cytol. (1971) 31:57-114

**RECHEIGL, H; EVANS, W.H.** "Role of catalase and peroxidase in the metabolism of leucocytes" Nature (London) (1963) 199: 1001-1002.

**REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S.; HEBERLE,E.:** "Induction of haploid tobacco plants from isolated pollen". Protoplasma (1975) 84: 191-196

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**REVEL, J.P. AND KARNOVSKY, M.J.** "Hexagonal array of subunits in the intercellular junctions of the mouse heart and liver" *J. Cell Biol.* (1967) 33:c7-c12

**REYNOLD, E.S.** "The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy" *J. Cell Biol* (1963) 17: 208-212

**RICK, C.H.** "Genetics and development of nine male-sterile tomato mutants" *Hidlgaria* (1984) 18:599-633

**RISUEÑO, M.C.** "Biología del polen: estructura y función". En: *Polen, esporas y sus aplicaciones*. Ed: G. Blanca; C. Díaz de la Guardia; M.C. Frenandez; M. Garrido; M.I. Rodríguez-García; A. T. Romero García. VII Simposium de Palinología (A.P.L.E., Granada) (1990) pp: 31-42

**RISUEÑO, M.C.; ARQUIAGA, C.; SANCHEZ-PINA M.A.** "Determination of the microspore interphase of *Hyacinthoides non-scripta*" *Rev Biol. Cel*, vol. 5 (1985) 25

**RISUEÑO, M.C.; GIMENEZ-MARTIN G.; LOPEZ SAEZ J.F.; GARCIA, M.I.** "Origin and development of sporopollenin bodies" *Protoplasma* (1969) 67:361-374

**RISUEÑO, M.C.; MEDINA, F.J.** "The nucleolar structure in plant cells" *Revisión sobre Biología celular* Ed: Universidad del País Vasco, (1986) Vol.7

**RISUEÑO, M.C.; MEDINA, F.J.; MORENO DIAZ DE LA ESPINA, S.** "Nucleolar fibrillar centres in plant meristematic cells: ultrastructure, cytochemistry and autoradiography" *J.Cell Sci* (1982a) 58:313-329

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**RISUEÑO, M.C.; TESTILLANO, P.; SANCHEZ-PINA, M.A.** "variations of the nucleolar ultrastructure in relation to transcriptional activity during G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> periods of microspore interphase" en Sexual Reproduction in Higher Plants. M. Cresti, E. Paccini (EDs). Springer and Verlag. Berlin (1988) pp:9-14

**RODRIGUEZ GARCIA, M.I.** "Formación y desarrollo de las microsporas a nivel ultraestructural" Tesis Doctoral, Madrid, (1970)

**RODRIGUEZ-GARCIA, M.I.; GARCIA, A.** "Differentiation of plastids population during microsporogenesis and development of the pollen grain in Liliaceae" *Biologie Cellulaire* (1978) 33:63-70

**RODRIGUEZ-GARCIA, M.I.; RISUEÑO, M.C.; SANCHEZ-PINA, A.** "Estructura y formación de la exina en el grano de polen de Liliaceas" *Actas IV Simposium Palinologia (APLE)* (1983) pp:141-148

**RODRIGUEZ-GARCIA, M.I.; STOCKERT, J.C.** "Localization of the pyroantimoniate-osmium reaction product in plant cell nucleoli". *Journal of Ultrastructure Research* (1979) 67:65-72

**RODRIGUEZ-GARCIA, M.I.; ALCHE, J.D.; FERNANDEZ, M.C.** "Immunolocalization at ultrastructural level of the major allergen of olive pollen (OL-1)" *Electron Microscopy Vol. 3*, Granada (1992) pp:467-468

**RODRIGUEZ-GARCIA, M.I.; FERNANDEZ, M.C.** "Cytoplasmic nucleoloids during microgametogenesis in *Olea europaea* L." *Biology of the Cell* (1987) 60:155-160



## **BIBLIOGRAFIA**

---

**RODRIGUEZ-GARCIA, M.I. AND FERNANDEZ FERNANDEZ, M.C.** "Ultrastructural evidence of endoplasmic reticulum changes during the maturation of the olive pollen grain (*Olea europaea* L. Oleaceae)" *Pl. Syst. Evol.* (1990) 171:221-231

**RODRIGUEZ-GARCIA, M.I. AND MAJEWSKA-SAWKA, A.** "Is the special callose wall of microspocytes an impermeable barrier?" *Journal of Experimental Botany* Vol.43, (1992) (en prensa)

**RODRIGUEZ-GARCIA, M.I.; SIEVERS, A.** "Membrane contacts of the endoplasmic reticulum with plastids and with plasmalemma in the endothecium of *Scilla non-scripta*" *Cytobiologie* (1977) 15:85-95

**ROLAND J.C.; LEMBI,C.A.; MORRE, D.J.** "Phosphotungstic acid-chromic acid as a selective electron-dense stain for plasma membranes of plant cells" *Stain Techn.* (1972) 47:195-200

**ROWLEY, J.R.** "Stranded arrangement of sporopollenin in the exine microspores of *Poa annua*" *Science* (1962) 137:526-528

**ROWLEY, J.R.** "The permeability of the pollen grain wall to exogenous protein tracers" *J. Ultrastructure Research* (1975) 50:394-395

**ROWLEY, J.R.** "Dynamic changes in pollen wall morphology". En: *The evolutionary Significance of the exine*". (Eds: Ferguson, I.K.; Muller, J.) *Linnean Society Symposium Series* n°1 (1976) pp:39-66

**ROWLEY, J.R.; GAMAL-EL-GHAZALY; ROWLEY, J.S** "Microchannels in the pollen grain exine" *Palynology* (1987) 11:1-21

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**ROWLEY, J.R. AND DUMBAR, A.** "Transfer to colloidal iron from sporophyte to gametophyte"  
Pollen et Spores (1970) 12:305-328

**ROWLEY, J.R. AND FLYNN, J.J** "Migration of lanthanum through the pollen wall"  
Cytobiologie (1971) 3:1-12

**ROWLEY, J.R. AND SKVARLA, J.J** "The glycocalix an initiation of exine spinules on  
microspores of *Canna*" Nordic Journal of Botany (1975) 6:39-65.

**ROWLEY, J.R. AND SOUTHWORTH, D.** "Deposition of sporopollenin on lamellae of unit  
membrane dimensions" Nature (1967) 213:703-704.

**RUSSELL, S.D. AND CASS, D.D.** "Unequal distribution of plastids and mitochondria during  
sperm cell formation in *Plantago zeylanica*" En: Pollen Biology and implications for plant breeding  
(Eds: Mulcahy, D.; Ottaviano, E.) Elsevier (1983) pp:135-140.

**SAMPSON, F.B.** "Synchronous versus asynchronous mitosis within permanent pollen tetrads of  
Winteraceae". Grana (1981) 20:19-23

**SANGWAN, R.S.; NORREEL, B.** "Induction of plants from pollen grains of *Petunia* cultured in  
vitro" Nature (1975) 257:222-224

**SANGWAN, R.S.; SANGWAN-NORREEL B.** "Ultrastructural cytology of plastids in pollen  
grains of certain androgenic and no-androgenic plants" Protoplasma (1987) 138:11-22

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**SANGWAN-NORREEL, B.S.; SANGWAN, R.S.; PARE, J.** "Haploidie et embryogennèse provoquée in vitro". Bull. Soc. Fr. 133 Actual Bot. (1986) 4:7-39

**SATO, S.; JONES, K.; ALCHE, J.D.; DICKINSON, H.G.** "Cytoplasmic nucleoloids of *Lilium* mele reproductive cells contain r-DNA transcripts and share features of development with nucleoli" J. Cell Sci. (1991) 100:109-118.

**SAUTER, J.J.** "Histoautographische untersuchungen zur ribonucleinsäure-synthese während der meiosis bei *Paeonia tenuifolia*" Naturwissenschaften (1967) 55:546

**SAUTTER, C.** "Immunolocalization studies in the biogenesis of plant microbodies" Cell Biology International Reports (1989) 13 (1):72

**SAWHNEY, V.K. AND BHADULA, S.K.** "Microsporogenesis in normal and male-sterility stameless-2 mutant of tomato *Lycopersicum esculentum*" Can. J. Bot. (1988) 66:2013-2021

**SCANDALIOS, J.G.** "Tissue-specific isoenzyme variations in maize" J. Hered (1979) 46:435-454

**SCHEER, U.; BENAVENTE, R.** "Funcional and dinamic aspects of the mamalian nucleolus" Bioessays (1990) 12:14-21

**SHARP, W.R.; RASKIN, R.S.:** "The use of nurse culture in the development of haploid clones in tomato". Planta 104:357-361 (1972)

**SHAW, G.** "The chemistry of sporopollenin" En: Sporopollenin. (Eds: Brooks, J.; Grant, P.R.; Huir, H.; Gijssel, P.; Van Shaw) Academic Press London, New York, (1971) pp:305-350

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**SHELDON, J.M. AND DICKINSON, H.G.** "Determination of patterning in the pollen wall of *Lilium henryi*" J. Cell Sci (1983) 63: 191-208.

**SITTE, P.** "Untersuchungen zur submikroskopischen morphologie der pollen und sporenmembranen" Mikroskopie (1953) 8:290-299

**SMITH, O.** "Pollination and life-history studies of the tomato (*Lycopersicon esculentum*)" Cornell Univ. Agric. Exp. Stat. Ment. 184 (1935)

**SKVARLA, J.J. AND LARSON J.A** "Fine structural studies of *Zea mays* pollen. I. Cell membranes and exine ontogeny" Am. J. Bot. (1966) 53:1112-1125

**SOPORY, S.K.; MAHESHWARI, S.C.:** "Development of pollen embryoids in anther cultures of *Datura innoxia*. I General observations and effects of physical factors." Journal of Experimental Botany 27:49-57 (1976)

**SOUTHWORTH, D.** "Cytochemical reactivity of pollen walls" J. Histochem. Cytochem. (1973) 21:73-80

**SOUTHWORTH, D.** "Solubility of pollen exines" Amer. Journal of Bot. (1974) 61:36-44

**SOUTHWORTH, D.** "Exine biochemistry" En: Microspores: evolution and ontogeny (Eds: Blackmore, S.; Knox, R.B.) Academic Press (1990) pp:193-213.

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**SPICER, S.S.; GREENE, W.B.; HARDIN, J.H.** "Ultrastructural localization of acid mucosubstance and antimoniate-precipitate cation in human and rabbit platelets and megakaryocytes" J. Histochem. Cytochem. (1969) 17:781-792

**STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F.** "Pollen" Springer and Verlag. Berlin. Heidelbrg. N. York (1974)

**STEFFENSEN, D.M.** "Synthesis of ribosomal RNA during growth and division in *Lilium*" Exp. Cell Res. (1966) 44:1-12

**STOCKERT, J.C.; BLANCO, J.; FERRER, J.M.; TRIGOSO, C.; TATO, A.; DEL CASTILLO, P.; GOMEZ A.; TESTILLANO, P.; RISUEÑO M.C.** "Tungsten and molybdenum heteropolyacids as staining and contrasting agents: reactivity with epoxiresin-embedded cell and tissue structures". Acta Histochem (1989) 151-158

**STRASBURGER, E.** "Neve Untersuchungen über der befruchtungsvergang bei den phanerogamen". Jena (1884)

**SUNDERLAND, N.** "Anther culture as a means of haploid induction" En: Haploid in higher plants. Advances and potencial. (Ed: K.J. Kasha) Univ. Guelph Press Canada (1974) pp:91-122

**SUNDERLAND, N.** "The concept of morphogenic competence with reference to anther and pollen culture". En: Plant cell culture in crop improvement. (Eds: S.K. Sen and K.C. Giles) Plenum Press. New York (1983) pp:125-129

**SUNDERLAND, N.** "Induction of growth in the culture of pollen" En: Differentiation in vitro. (Ed: Yeoman, M.M.; Truman D.E.S.) Cambridge University Press, Cambridge (1984) pp1-24

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**SUNDERLAND, N.; WICKS, F.M.:** "Embryoid formation in pollen grains of *Nicotiana tabacum*".

Journal of Experimental Botany (1971) 22:213-226

**SKVARLA, J.J AND LARSON J.A** "Fine structural studies of *Zea mays* pollen I. Cell membranes and exine ontogeny" Ame. J. Bot. (1966) 53:1112-1125.

**SWIFF, H.** "The contact of the desoxyrinose nucleic acid in plant nuclei" Proc. Natl. Acad. Sci.

USA (1950) 36:643-654

**TANAKA, I.; TAGUCHI, T.; ITO, M.** "Studies on microspore development in liliaceous plants.

I. The maturation of the cell cycle and developmental aspects in lily microspores" Bot. Mag. (1979)

92:291-298

**TANDLER, C.J.; LIBANATI, C.M.; SANCHIS, C.A.** "The intracellular localization of inorganic cations with potassium pyroantimonate. Electron microscope and microprobe analysis" J. Cell Biol.

(1970) 45:355-366

**TAYLOR, A.R.D. AND HALL, J.L.** "Fine structure and cytochemical properties of tobacco leaves protoplast and comparison with the source tissue" Protoplasma (1978) 96:113-126

**TESTILLANO, P.** "Estudio citoquímico e inmunocitoquímico de la función nuclear durante la interfase postmeiótica del polen" Tesis doctoral Madrid, (1991).

**THIERY, J.P.** "Mise an évidence des polysaccharides sur couper fines en microscopie électronique". J. Microsc. (Paris) (1967) 6:987-1018

**THIRY, M.; SCHEER, U.; GOESENS, G.** "Localization of nucleolarchromatin immunocytochemistry and in situ hybridization at the electron microscopy level" *Electron Microscop. Rev.* (1991) 4:85-110

**TROLL, W.** "Über anthereuban, pollen und pollination von *galatanthus nivalis* ". *Flora* (1928) 23:321-343

**VASIL, I. K.** "The new biology of pollen" *Naturwissenschaften* (1973) 60:247-253

**VIGIL, E.L.** "Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxisomes) and related organelles of castor beam endosperm" *J.Cell Biol.* (1970) 46:435-454

**WACHTLER, f; HARTUNG, M.; DEVICTOR, M.; WIEGANT, J.; STAHL, A.; SCHWARZACHER, H.G.** "Ribosomal DNA is located and transcribed in th dense fibrilar component of human sertoli cell nucleoli" *Expl. Cell Res.* (1989) 184:61-71

**WANNER, G.; VIGIL, E.; THEIMER, R.** "Ontogeny of microbodies (glioxisomes) in cotyledons of dark-grown watermelon (*citrullus vulgaris*, Schard) seedlings" *Planta* (1982) 156:314-325.

**WARNER, J.R.** "The nucleolus and ribosome formtion. Current opinion" *Cell Biology* (1990) 2:521-527

**WATERKEYN, L.** "Les parois microcytaires de nature callosique chez *Helleborous* et *Tradescantia*" *Celule* (1962) 62:225-255

**WATERKEYN, L.; BIENFAIT A.** "On a possible funtion of the callosic special wall in *Ipomoea purpurea* L." *Roth Grana* (1970) 10:13-20

## **BIBLIOGRAFIA**

---

**WEBER M.** "Thiéry test in combination with uranyl acetate-lead citrate staining". *Stain technology* (1989) 64 (3):147-149

**WEBER, M.** "Ultrastructural changes in maturing pollen grains of *Apium nodiflorum* L (Apiaceae) with special reference to the endoplasmic reticulum" *Protoplasma* (1989b) 152:69-76

**WISKICH, J.T.; DRY, I.B.** "The tricarboxylic acid cycle in plant mitochondria: its operation and regulation" En: *Higher plant cell respiration*. (Eds: Douce, R.; Day, D.A.) Springer, Berlin Heidelberg, New York, Tokyo (1985) pp: 297-330

**WODEHOUSE, R.P.** "Pollen grains" McGraw-Hill, New York (1935) pp:1-574

**WODEHOUSE, R.P.** "Handbook of Palynology. An Introduction to the study of pollen grains and spores" (1969)

**WROBEL, B.; GORSKA-BRILASS A.** "Changes in intracellular localization of peroxidase during microsporogenesis in Gymnosperms " *Biologia Plantarum (Praha)* (1988) 30(5): 333-337

**ZAGORSKA, N.; ABADJIEVA, M.; GEORGIEV, C.; GEORGIEVA, R.** "Morphogenesis and plant differentiation in anther cultures of the genus *Lycopersicum* Mill.". *Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture. Plant Tissue Culture* (1982) pp:539-540.

**ZARSKY, V; GARRIDO, D.; RIHOVA, L.; TUPY, J.; VICENTE, O.; HEBERLE-BORS, E.** "Depression of the cell cycle by starvation is involved in the induction of tobacco pollen embryogenesis" *Sexual Plant Reproduction* (1992) 5:189-194



## **BIBLIOGRAFIA**

---

**ZIV, M.; HADARY, D.; KEDAR, N.:** "Diaploids plants regenerated from tomato anthers in vitro".  
Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture. Plant Tissue Culture (1982) pp:549-550.