

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS DOCTORAL

Regulación y cambios metabólicos
durante la germinación del polen de olivo
(*Olea europaea* L.)

MARIA DEL PILAR RODRIGUEZ ROSALES
1988

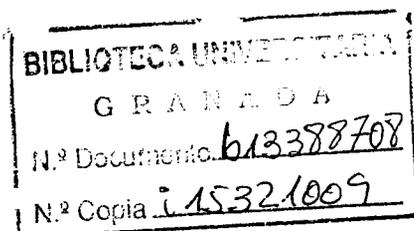
1/30

La lectura y defensa de esta Tesis Doctoral tuvo lugar el 29 de Noviembre de 1988 en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, ante el Tribunal formado por los doctores: D. Luis Rayo Romero, D. Fermín Sanchez de Medina Contreras, D. Ignacio Núñez de Castro, D^a. Carmen Lluch Plá y D^a M^a Isabel Rodríguez García, obteniendo la calificación de Apto *Cum Laude*.

FACULTAD DE CIENCIAS

REGULACION Y CAMBIOS METABOLICOS DURANTE LA
GERMINACION DEL POLEN DE OLIVO (*Olea europaea* L.)

María del Pilar Rodríguez Rosales



UNIVERSIDAD DE GRANADA

1988



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

DON JUAN DE DIOS PEREZ JIMENEZ; PROFESOR
Y SECRETARIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

GRANADA

ciencias

: 1989

: 91

: LA

Núm. 1591

C E R T I F I C O: Que la presente Te
sis Doctoral corresponde a la pre
sentada en ésta Facultad por D^a Pi
lar Rodriguez Rosales y que fue ca
lificada con Apto "Cum Laude" el
dia 29 de Noviembre de 1.988 por
el Tribunal correspondiente, y que
fue aprobado en Comisión de Docto
rado de 2 de Noviembre de 1.988, -
siendo el Titulo de la Tesis: "Re
gulación y cambios metabólicos du
rante la germinación del polen de
olivo (Olea europaea L.)".

Y para que conste expido la presen
te certificación con el V^o.B^o. del Iltm.
Sr. Decano en Granada a quince de Diciem
bre de mil novecientos ochenta y nueve.

V^o.B^o.
EL DECANO,

Antonio Pérez


ada en

a del

spirar

rosales

Fdo. Juan Pedro Donaire Navarro

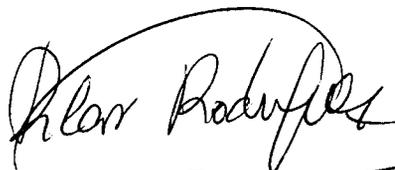
Doctor en Farmacia.

Investigador Científico del C.S.I.C.

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 18 DIC. 1989
SALIDA NUM. 1591

REGULACION Y CAMBIOS METABOLICOS DURANTE LA
GERMINACION DEL POLEN DE OLIVO (*Olea europaea* L.)

Memoria que presenta la Licenciada en
en Ciencias Biológicas D^a María del
Pilar Rodríguez Rosales para aspirar
al grado de Doctora.



Fdo. María del Pilar Rodríguez Rosales

Vº Bº
EL DIRECTOR DEL TRABAJO



Fdo. Juan Pedro Donaire Navarro
Doctor en Farmacia.
Investigador Científico del C.S.I.C.

La presente Memoria ha sido realizada en la Unidad Estructural de Bioquímica Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín con ayuda de una Beca de la Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Andalucía.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Director de esta Tesis Doctoral, Dr. Juan Pedro Donaire Navarro, Investigador Científico del C.S.I.C., no sólo por sus valiosas enseñanzas y amplio significado de la investigación, que han servido como base en mi formación científica, sino también por su constante dedicación al trabajo y por su gran categoría humana. Todo ello, ha hecho posible la realización de esta Memoria, al tiempo que ha constituido una acertada guía de mi labor.

Debo agradecer, igualmente, la colaboración del Dr. Fernando Perán, gracias a la cual ha sido posible llevar a cabo los estudios de determinación de aminoácidos, y del Dr. Miguel Angel Sanchez Caballero, que ha intervenido en los análisis de esteroides.

Así mismo, quiero expresar mi más sincera gratitud a mis compañeros de trabajo, Marta Roldán, Andrés Belver, Nuria Ferrol, Sylvain Unique y Pedro Burgos, por su gran ayuda y sus muestras de compañerismo y amistad.

Deseo expresar un especial agradecimiento a D^{ña}. Concepción Santiago, por su inapreciable colaboración en la tarea de mecanografiar esta Memoria y a D. Manuel Martínez por su gran labor en la confección de las gráficas y figuras de este trabajo.

Agradecer al Dr. Rogelio Nogales, su desinteresada colaboración, a mis compañeros del grupo de Micronutrientes y, en general, a todos los de la Unidad Estructural de Investigación de Bioquímica Vegetal, su ayuda y amistad.

Por último, mi gratitud a todas aquellas personas que de una u otra manera hicieron posible que este trabajo viera la luz. A todos ellos, mi más sincero agradecimiento.

A mis padres

INDICE

I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS.....	1
II. PARTE TEORICA.....	5
A. ESTRUCTURA DEL POLEN MADURO.....	6
B. CAMBIOS CITOLOGICOS QUE SE ESTABLECEN DURANTE LA GERMINACION Y CRECIMIENTO DEL TUBO POLINICO.....	8
C. LIPIDOS DEL POLEN MADURO Y GERMINADO.....	12
D. COMPONENTES BIOQUIMICOS DE LA PARED DEL POLEN.....	17
E. CAMBIOS METABOLICOS DURANTE LA GERMINACION.....	21
1. Biosíntesis de lípidos.....	21
2. Utilización de la reserva glucídica.....	23
3. Síntesis de proteínas y ácidos nucleicos.....	24
F. FACTORES QUE AFECTAN A LA GERMINACION.....	27
1. Iones minerales.....	27
2. Moduladores osmóticos.....	32
3. Reguladores del crecimiento.....	33
4. Efecto del pH.....	36
5. Efecto de la temperatura.....	38
G. UTILIZACION DEL POLEN EN LA TECNOLOGIA VEGETAL.....	40
1. La germinación del polen en el estudio de los estreses ambientales.....	40
2. El polen en la mejora genética de plantas.....	42
III. PLAN GENERAL DE TRABAJO.....	46
IV. MATERIAL Y METODOS.....	48
A. MATERIAL VEGETAL.....	49
1. Recolección y almacenamiento del polen.....	49
B. GERMINACION <i>IN VITRO</i>	49
1. Dispositivo experimental.....	50
2. Composición del medio de germinación.....	52
3. Control de la germinación.....	53
3.a. pH del medio.....	53
3.b. Concentración de CO ₂ en el medio.....	53

3.c. Efectores de la extrusión de H ⁺ al medio de incubación.....	53
4. Cuantificación del porcentaje de germinación.....	54
5. Determinación de la actividad extractora de H ⁺	54
C. COMPONENTES BIOQUIMICOS DE LA PARED.....	54
1. Aislamiento y purificación de paredes celulares.....	54
2. Extracción e hidrólisis de polisacáridos.....	56
2.a. Determinación de monosacáridos.....	58
2.b. Determinación de ácidos urónicos.....	58
3. Extracción de componentes protéicos.....	59
3.a. Análisis de aminoácidos.....	59
D. EXTRACCION DE LOS LIPIDOS DEL POLEN.....	62
1. A nivel del grano de polen.....	62
2. A nivel de la pared celular.....	62
E. SEPARACION DE DIFERENTES CATEGORIAS LIPIDICAS.....	63
1. Separación de fosfolípidos.....	64
2. Separación de lípidos neutros.....	64
3. Purificación de esteroles libres.....	64
F. ANALISIS DE ACIDOS GRASOS.....	65
1. Acidos grasos de lípidos totales.....	65
2. Acidos grasos de diferentes categorías lipídicas.....	65
G. DOSIFICACION DE FOSFOLIPIDOS, GALACTOLIPIDOS Y LIPIDOS NEUTROS..	66
H. ANALISIS DE ESTEROLES LIBRES.....	66
I. BIOSINTESIS DE LIPIDOS.....	66
1. Precursor radioactivo utilizado.....	66
2. Condiciones de incubación.....	67
3. Medida de la radioactividad incorporada.....	67
3.a. A lípidos totales.....	67
3.b. A diferentes categorías lipídicas.....	67
J. COMPONENTES SOLUBLES DEL POLEN.....	68
1. Extracción y análisis.....	68
K. DOSIFICACION DE PROTEINAS.....	68

V. RESULTADOS.....	69
A. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE GERMINACION Y DE LA ACTIVIDAD EXTRACTORA DE H ⁺ EN EL POLEN.....	70
1. Estudios preliminares.....	70
2. Utilización de la técnica del <i>ageing</i> como inductor de la germinación.....	70
3. Efecto del pH del medio de incubación.....	71
4. Efecto de la concentración de CO ₂	73
5. Acción de promotores e inhibidores del crecimiento.....	75
6. Influencia de los iones minerales.....	78
B. COMPONENTES BIOQUIMICOS DE LA PARED.....	82
1. Aislamiento y purificación de la pared.....	82
2. Componentes glucídicos.....	83
3. Componentes proteicos.....	85
C. MODIFICACIONES CONCERNIENTES A LOS LIPIDOS DE RESERVA Y DE MEMBRANA EN EL POLEN MADURO Y GERMINADO.....	88
1. Concentración en lípidos del polen.....	89
1.a. Diferentes categorías de fosfolípidos, lípidos neutros y esteroides libres.....	89
1.b. Composición y contenido en ácidos grasos.....	91
1.b.1. De lípidos totales.....	91
1.b.2. De diferentes categorías lipídicas.....	91
1.c. Lípidos de la pared.....	94
1.c.1. Clases de lípidos.....	94
1.c.2. Composición y contenido en ácidos grasos.....	94
2. Biosíntesis lipídica.....	95
D. ESTUDIO DE COMPONENTES SOLUBLES DEL POLEN.....	97
VI. DISCUSION.....	99
VII. CONCLUSIONES.....	119
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	122
IX. ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	153

I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

El estudio de los mecanismos de adaptación de plantas a condiciones adversas constituye un importante aspecto de la investigación bioquímica, siendo indispensable para la comprensión de los mecanismos de tolerancia el conocimiento de las funciones de transporte y del comportamiento de las células frente a las sustancias ionizadas.

Aunque existen numerosas lagunas en el conocimiento de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos implicados en la tolerancia que impiden o dificultan la mejora vegetal, es cada vez más patente su relación con fenómenos ligados a la membrana. En este sentido, es bien sabido que las propiedades físico-químicas de estas estructuras celulares, zonas de gran actividad biológica donde se ubican procesos fundamentales para la vida de la planta (fotosíntesis, respiración y transporte de nutrientes), se ven afectadas por diversos factores, entre ellos temperatura, luz e iones minerales, por lo que para el estudio de la tolerancia es fundamental disponer de un buen modelo celular donde se establezcan una serie de procesos específicos capaces de relacionar la resistencia con dichas estructuras.

A este respecto, el polen, al igual que los cultivos celulares, constituye una población homogénea, con un gran contenido en estructuras de membrana y de pared, lo que unido a las especiales características de la germinación y desarrollo del tubo polínico, procesos de crecimiento y diferenciación altamente sensibles a la acción de los agentes anteriormente indicados, permitirá su utilización como un modelo experimental adecuado en el estudio de los mecanismos de adaptación de plantas a las condiciones del medio.

La idea de una posible utilización de la germinación del polen para estos estudios de tolerancia, supuso un planteamiento inicial que ha sido la base de este trabajo, el cual ha consistido, esencialmente, en una investigación de los cambios bioquímicos y fisiológicos que tienen lugar durante la germinación del polen de olivo, al objeto de determinar aquellas transformaciones metabólicas que se desencadenan a lo largo del mismo, en relación a la composición de esta célula en su estadio final de maduración.

Desde esta perspectiva, especial relevancia ha tenido en el enfoque del mismo el estudio de la biosíntesis de componentes de membrana y de la pared celular, tanto en polen maduro como germinado, así como de la utilización durante el crecimiento del tubo polínico de sustancias de reserva contenidas en el grano de polen maduro.

Sin embargo, el planteamiento de los objetivos previstos a nivel del grano de polen hizo necesario considerar una serie de aspectos importantes. Así, la recogida del polen en un corto espacio de tiempo, a veces de días, a partir de árboles que, en gran medida, difieren en su estado fisiológico, y la incidencia negativa de estos hechos en el funcionamiento y regulación de la compleja maquinaria bioquímica y fisiológica requerida para la germinación, constituían razones capaces de explicar, por sí mismas, que la viabilidad de esta célula estuviera sometida a una tan elevada variabilidad. Por ello, un requerimiento inicial en nuestro estudio tuvo que ser necesariamente la puesta a punto y optimización de la germinación *in vitro*, lo cual iba a precisar el desarrollo de una metodología rápida y sensible que hiciera posible superar estas dificultades, permitiendo investigar los cambios metabólicos más importantes que se establecen en el polen durante dicho proceso.

La utilización de las condiciones experimentales que dan lugar al *ageing* de los tejidos, cumplía con estos requisitos, y ello, tanto por la operatividad de este sistema en sí, como por la coincidencia que se da entre los procesos metabólicos y citológicos que tienen lugar en los tejidos de reserva sometidos a *ageing* y en el polen durante el crecimiento del tubo polínico.

Finalmente, es importante resaltar que la elección del polen de olivo como material vegetal ha respondido a dos razones principales. Por una parte, debido al enorme interés económico de este cultivo. Por otra, ha sido también muy importante la experiencia previa acumulada en nuestro grupo sobre el estudio de aspectos concretos relacionados con la fructificación de esta planta: maduración, biosíntesis y acumulación de lípidos de reserva y de membrana en el fruto, así como cambios citológicos que tienen lugar durante el desarrollo del grano de polen.

Teniendo en cuenta que los objetivos de este trabajo se han centrado en el estudio de algunos cambios bioquímicos y fisiológicos que se establecen en el polen maduro y a lo largo de la germinación, que nos permita, posteriormente, poder utilizar esta célula para la investigación de aspectos fundamentales del vegetal tales como mecanismos de adaptación de plantas a condiciones adversas, procesos de transporte y regeneración de plantas, nos ha parecido importante estructurar esta parte teórica, describiendo las transformaciones citológicas, bioquímicas y fisiológicas que se desencadenan en el polen durante la germinación.

A. ESTRUCTURA DEL POLEN MADURO

Aunque no ha sido objeto de este trabajo el estudio de los aspectos citológicos relacionados con la germinación, hemos considerado adecuado describir brevemente la estructura del grano de polen maduro y germinado, la cual es fiel reflejo de los cambios metabólicos que tienen lugar durante la germinación y crecimiento del tubo polínico.

Diversos autores han realizado un extenso estudio de la ultraestructura del grano de polen maduro. Fernández-Fernández (1986) ha observado en el citoplasma del polen de olivo una gran abundancia de cuerpos lipídicos, así como la existencia de mitocondrias y retículo endoplasmático rugoso. Estas observaciones también han sido descritas en polen de otras especies, donde las cisternas que constituyen el retículo endoplasmático se presentan apiladas o rodeando a los cuerpos lipídicos, los cuales aparecen frecuentemente asociados a los dictiosomas (Cresti y col., 1983). Esto se ha podido relacionar con la formación de glicoproteínas o glicolípidos, moléculas importantes en el reconocimiento celular polen-estigma (Albersheim y col., 1980). Además, en polen de olivo algunos constituyentes citoplasmáticos (vacuolas, plastidios y granos de almidón) dejan de estar presentes una vez que se alcanza la maduración (Fernández-Fernández, 1986).

En cuanto a la pared celular, la estructura de la exina y la intina se consolidan en el polen maduro, siendo característica en especies como el olivo, la aparición de gotas lipídicas entre las arcadas de la exina

(polenkitt) (Fernández-Fernández, 1986). Este material lipídico, originado a partir del tapetum de la antera, se ha considerado implicado en el reconocimiento polen-estigma (Mattsson, 1983; Fernández-Fernández y Rodríguez-García, 1988). Precisamente, estos autores han puesto de manifiesto la existencia de microcanales en la exina, a través de los cuales tiene lugar el paso de sustancias del exterior al interior del polen (Fernández-Fernández y Rodríguez-García, 1987). Con respecto a la intina, antes de que tenga lugar la dehiscencia de la antera, se origina un abultamiento de esta capa en la zona apertural, desapareciendo en el ápice de la misma cualquier componente de la exina (Fernández-Fernández y Rodríguez García, 1985). La intina protege al gametofito de la desecación, especialmente en la zona apertural, almacena enzimas hidrolíticos relacionados con la emergencia del tubo polínico y libera y reconoce las sustancias implicadas en la interacción polen-estigma (Kress y Stone, 1983).

En lo que se refiere a la organización del material genético, el polen maduro se caracteriza por la presencia de un núcleo vegetativo y una o dos células de menor tamaño ubicadas en el citoplasma de la célula vegetativa. En el primer caso (polen bicelular), una vez que el grano germina, se produce una división mitótica de la célula de menor tamaño o generativa, que conducirá a la formación de los gametos masculinos o células espermáticas. En el segundo caso (polen tricelular), las células espermáticas se originan a partir de la célula generativa antes de que se produzca la dehiscencia de la antera (Bergamini-Mulcahy y Mulcahy, 1983; Fernández-Fernández, 1986).

En el polen de olivo, el núcleo de la célula vegetativa ocupa una posición central, presentando un aspecto lobulado y conteniendo cromatina poco condensada (Fernández-Fernández, 1986). La célula generativa, de forma alargada, aparece casi completamente ocupada por el núcleo, el cual adquiere la forma de la célula, presentando cromatina con un elevado grado de condensación (Fernandez-Fernandez, 1986). Por otra parte, en el citoplasma de esta célula es frecuente observar, durante la activación de la germinación del polen y la emisión del tubo, la aparición de microtúbulos que determinan su forma e intervienen en el movimiento de la misma hacia el poro germinativo (Cresti y col., 1983). En polen de algunas especies, se ha observado la existencia de una asociación núcleo vegetativo-célula generativa, la cual también ha sido puesta de manifiesto en granos de

polen tricelulares, efectuándose entre una de las células espermáticas y el núcleo vegetativo (Mogensen, 1986, McConchie y col., 1987).

La descripción de la estructura del polen maduro revela que ésta célula posee toda la maquinaria bioquímica necesaria para la germinación. No obstante, al ser metabólicamente inactiva, resulta inviable para su utilización como modelo en el estudio de los mecanismos de adaptación de plantas a condiciones adversas. De aquí la importancia de describir las transformaciones estructurales que se desencadenan en el polen durante la germinación, al objeto de facilitar el camino para el estudio de los cambios metabólicos producidos durante este proceso.

B. CAMBIOS CITOLOGICOS QUE SE ESTABLECEN DURANTE LA GERMINACION Y CRECIMIENTO DEL TUBO POLINICO

Una vez considerada la estructura del polen maduro, es importante detallar los cambios citológicos relacionados con la germinación, para lo cual, hemos dividido este proceso en una serie de fases caracterizadas, cada una, por una organización estructural específica.

Como es sabido, la emergencia del tubo polínico está precedida de una fase de hidratación del grano de polen, seguida de otra de activación. La hidratación *in vitro* ocurre inmediatamente después de incubado el polen, caracterizándose por un aumento de volumen del grano, el cual adquiere un aspecto redondeado, apreciándose los poros germinativos como estructuras semiesféricas (Cresti y col, 1977).

En este periodo, no se producen cambios citológicos importantes respecto a la estructura observada en el grano de polen maduro. Así, las observaciones realizadas al microscopio electrónico en polen de diversos orígenes, revelan que la fase de hidratación se caracteriza por la existencia de una gran cantidad de agrupaciones o apilamientos de cisternas de retículo endoplasmático rugoso, presencia de plastidios conteniendo agregados de ferritina, existencia de numerosos cuerpos lipídicos rodeados de cisternas de retículo endoplasmático rugoso, abundancia de ribosomas libres, ausencia de polisomas, así como presencia de mitocondrias con

escasas crestas y de pequeñas vacuolas conteniendo cuerpos electrodensos constituidos por material fibrilar (Cresti y col., 1975, 1983, 1985).

Inmediatamente antes de la emergencia del tubo polínico, tienen lugar una serie de cambios citológicos indicativos de una gran actividad metabólica y biosintética. En este periodo, el análisis citológico pone de manifiesto: una separación de las cisternas del retículo endoplasmático rugoso, las cuales se encontraban apiladas en el grano de polen maduro; el desarrollo de una considerable actividad de los dictiosomas con producción de numerosas vesículas; la agregación de ribosomas para constituir polisomas; la formación de lamelas y granos de almidón en los plastidios, así como la aparición de mitocondrias con numerosas crestas (Linskens y col., 1970; Cresti y col., 1977; Hoekstra y Bruisma, 1979, Cresti y col., 1985).

Por otra parte, la célula generativa y el núcleo vegetativo no experimentan cambios significativos durante esta fase de activación (Cresti y col., 1985), observándose únicamente un desplazamiento de ambas estructuras hacia uno de los poros germinativos. Este desplazamiento coincide con la aparición, en la proximidad de dicho poro, de numerosas vesículas procedentes de los dictiosomas y de algunas cisternas del retículo endoplasmático (Cresti y col., 1977). Es también importante el descenso observado en el número de cuerpos lipídicos, si bien éstos continúan asociados a las cisternas del retículo endoplasmático (Cresti y col., 1985).

Posteriormente, se produce la rotura de la pared celular a nivel del poro germinativo de donde va a emerger el tubo polínico. Dicho proceso se produce en un sólo punto, de forma que la pared del poro se abre hacia el exterior celular permitiendo la salida del tubo (Cresti y col., 1977). Desde este momento, la pared del tubo aparece formada por dos capas bien diferenciadas, una externa pectocelulósica y otra interna calósica, constituyendo, ésta última, una capa continua con la intina del grano de polen. A pesar de que durante los primeros estadios de la germinación, la capa calósica aparece como una estructura continua, el crecimiento del tubo polínico supone la desaparición de pared calósica en la zona del ápice del tubo (Cresti y col., 1977).

Una vez que el tubo polínico alcanza su organización final, se observan cuatro zonas claramente diferenciadas: apical o de crecimiento, subapical, nuclear y zona de vacuolización y formación de depósitos de calosa. Para gran número de investigadores, esta zonación espacial o citológica observada en tubos polínicos de *Petunia*, *Prunus*, *Lycopersicum* y *Nicotiana* es también el resultado de una especialización funcional (Cresti y col., 1979a, 1979b, 1980; Uwate y Lin, 1980).

La zona apical o de crecimiento está restringida al ápice del tubo polínico, donde la pared celular está formada exclusivamente por sustancias de naturaleza pectocelulósica (Cresti y col., 1985), y donde el citoplasma contiene, únicamente, vesículas secretoras que se fusionan con la membrana plasmática (Cresti y col., 1977).

En la zona subapical, la pared del tubo aparece constituida por sus dos capas características. Al contrario que en la zona apical, el citoplasma es rico en organelas dispuestas paralelamente al eje longitudinal del tubo, revelando la observación al microscopio electrónico la existencia de dictiosomas y vesículas derivadas, cisternas del retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias, cuerpos lipídicos y plastidios (Cresti y col., 1977, 1985).

Las vesículas derivadas de los dictiosomas tienen especial importancia durante el desarrollo del tubo polínico, al estar relacionadas con la síntesis de la membrana plasmática y de la pared celular durante el crecimiento del mismo (Rosen y Gawlick, 1966; Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1982; Picton y Steer, 1982). Dichas vesículas son transportadas a lo largo del tubo polínico por acción de corrientes citoplasmáticas en las que están implicadas masas fibrilares, fusionándose con la membrana plasmática en la zona apical (Cresti y col., 1985). Las masas fibrilares descritas por Cresti y col. (1986) en el citoplasma de la célula vegetativa del polen de *Nicotiana tabacum*, se corresponden con estructuras de una fuerte afinidad por la faloidina, compuesto que se une específicamente a la F-actina, estando implicadas en el establecimiento de corrientes citoplasmáticas en el interior del tubo (Franke y col., 1972; Barak y col., 1980).

Detrás de la zona subapical, se localiza la zona nuclear que contiene el núcleo vegetativo y la célula generativa. El núcleo de esta célula adopta forma alargada, presentando cromatina muy electrodensa. Por el contrario, el núcleo vegetativo aparece lobulado y la cromatina se presenta poco condensada (Cresti y col., 1977). El citoplasma de la célula generativa, constituido por estructuras microtubulares, mitocondrias, dictiosomas y ribosomas, aparece rodeado de una pared compleja integrada por dos membranas y componentes de pared (Cresti y col., 1985, 1987). Por último, el citoplasma muestra pequeñas vacuolas y cuerpos lipídicos, destacando un descenso en el número de orgánulos respecto al observado en la zona subapical (Cresti y col., 1985).

Finalmente, detrás de la zona nuclear se sitúa la zona de vacuolización, caracterizada por la existencia de una gruesa pared calósica, de gran cantidad de vacuolas y depósitos intracelulares de calosa, así como de algunas mitocondrias, cisternas de retículo endoplasmático y dictiosomas (Cresti y Van Went, 1976; Kroh y Knuiman, 1982).

La zona de vacuolización representa la transición entre la parte activa e inactiva del tubo polínico, habiéndose establecido que la deposición de calosa conduce al aislamiento y desintegración de parte del citoplasma (Rosen y col., 1964; Sassen, 1964; Tsinger y Petrovskaya-Baranova, 1967; Cresti y Van Went, 1976). El tubo polínico se convierte así en una célula dotada de una fuerte polaridad en cuanto a su estructura y su función. Uno de los polos presenta un crecimiento continuo y una elevada actividad biosintética, mientras que en el otro polo los constituyentes celulares aparecen desorganizados y en proceso de desintegración (Cresti y Van Went, 1976).

Estos cambios citológicos durante la germinación sugieren un intenso metabolismo de transformación bajo la forma de una elevada biosíntesis de proteínas, actividad respiratoria, degradación de las reservas energéticas y transporte iónico. Sin embargo, mientras que el estudio de los aspectos citológicos relacionados con la maduración y germinación del grano de polen ha sido exhaustivamente abordado, se dispone de muy escasa información acerca de los cambios bioquímicos que se inducen durante dichos procesos. A continuación, se incluyen algunos aspectos concretos de la composición y

metabolismo del polen maduro y germinado, haciendo especial hincapié en los componentes relacionados con los objetivos propuestos en este trabajo.

C. LÍPIDOS DEL POLEN MADURO Y GERMINADO

El estudio de la composición lipídica del polen tiene interés en función del estadio de las membranas del grano maduro y de la capacidad germinativa del mismo (Heslop-Harrison, 1979; Shivanna y Heslop-Harrison, 1981). En este sentido, el crecimiento del tubo polínico conlleva una importante síntesis de componentes de membranas, así como la movilización de lípidos y/o azúcares de reserva (Whipple y Mascarenhas, 1975; Bergamini-Mulcahy y Mulcahy, 1983).

El contenido en lípidos totales del polen de diferentes especies vegetales varía entre el 1 y el 20 % del peso de materia seca (Stanley y Linskens, 1974). Así, en polen de *Pinus*, los lípidos sólo representan entre el 1.80 y 2.75 % del peso en materia seca, mientras que en *Taraxacum* y *Brassica* estas moléculas constituyen el 19 % del peso seco (Standifer, 1966; Stanley y Linskens, 1974; Andrikopoulos y col., 1985).

Recientemente, Evans y col. (1987) tras extraer los lípidos de la pared celular del polen de *Brassica napus* con acetona anhidra y, posteriormente, los lípidos citoplasmáticos con cloroformo-metanol, revelaron que los lípidos de la pared representan un 10 % y los citoplasmáticos un 22 % del peso seco. Estos estudios de Evans y col. (1987) han puesto de manifiesto que una parte importante de los componentes lipídicos del polen puede estar ubicada a nivel de la exina, estructura integrante de la pared celular. A este respecto, Stanley y Linskens (1974) habían considerado que esta capa era la principal fuente de variación en el contenido de lípidos extraíbles con éter.

Por otra parte, teniendo en cuenta que una de las principales funciones adscritas a los lípidos acumulados en el grano de polen, es proporcionar la energía necesaria para la germinación y crecimiento del tubo polínico, y que, dependiendo de la especie vegetal, el polen maduro contiene lípidos y/o almidón como reserva energética, la presencia o no de este polisacárido podría justificar la variabilidad en el contenido lipídico entre granos de

polen de diferentes especies. En este sentido, el contenido en ácidos grasos de la fracción lipídica del polen representa entre el 0.75 y el 7.50 % del peso seco (Sosa y Sosa-Bourdouil, 1952; Ching y Ching, 1962). En cuanto a la composición en ácidos grasos, los estudios realizados en polen de *Pinus* revelan que los ácidos palmítico, linolénico y oleico son los principales componentes, representando cada una de estas moléculas entre el 14 y el 31 % de los ácidos grasos totales (Ching y Ching, 1962). En polen de *Petunia*, el contenido en ácidos grasos es 4 veces superior al encontrado en *Pinus*, alcanzando el ácido palmítico el 42 % de los ácidos grasos totales de este polen (Hoeberichts y Linskens, 1968) y el 68 % en polen de *Fapaver rhoeas* (Kwiatkowski, 1964).

Un fenómeno relativamente común en los lípidos del polen es la poliinsaturación. En *Pinus*, el ácido linolénico representa el 30 % del contenido total de ácidos grasos (Stanley y Poostchi, 1962; Standifer, 1966; Stanley y Linskens, 1974). De igual forma, los estudios de Evans y col. (1987) en polen de *Brassica napus* han revelado que el ácido linolénico es el único ácido graso insaturado significativamente importante, representando casi un 60 % de los lípidos citoplasmáticos y un 27 % de los lípidos de la pared.

Por otra parte, se ha mencionado ya la gran abundancia de ácido palmítico en polen de diversas especies. En polen de *Brassica*, Evans y col. (1987) observaron, que éste es el único ácido graso saturado encontrado a nivel de los lípidos citoplasmáticos, mientras que los lípidos de la pared contienen también ácidos mirístico (13 %) y esteárico (18 %). Los mismos autores detectaron un mayor grado de saturación en los constituyentes lipídicos de la pared celular (60 %) que en los ubicados a nivel citoplasmático (25 %).

Aunque, en general, los ácidos grasos de los lípidos del polen contienen un número par de átomos de carbono, en *Petunia* y *Corilus avellana* se ha descrito la presencia de ácidos grasos con número impar (Sosa y Sosa-Bourdouil, 1952). Así mismo, Andrikopoulos y col. (1985) comprobaron en polen de *Pinus halepensis* la existencia de ácidos pelargónico, undecílico y pentadecanoico.

Los ácidos grasos libres de cadena larga y las ceras se ubican fundamentalmente a nivel de la pared celular, mientras que los triacilgliceroles se localizan en el citoplasma, siendo los ácidos linoleico, oleico y palmítico sus ácidos grasos mayoritarios (Scott y Strohl, 1962). Del mismo modo, los terpenos y esteroides están asociados a la pared celular y los lípidos polares a las membranas del polen (Stanley y Linskens, 1974; Sekiya y col., 1988).

Los lípidos polares constituyen una categoría lipídica muy importante en el polen de diversos orígenes. En *Zea mays*, *Typha latifolia* y *Pinus halepensis* representan casi un 40 % de los lípidos totales (Stanley y Linskens, 1974; Andrikopoulos y col., 1985). En polen de *Pinus ponderosa*, McIlwain y Ballou (1966) determinaron la presencia de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina y difosfatidilglicerol, mientras que en polen de *P. halepensis* y *Camellia sinensis*, el análisis cromatográfico reveló que la lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina y, sobre todo, los cerebrósidos, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol, eran los principales lípidos polares (Andrikopoulos y col. 1985; Sekiya y col., 1988).

Los fosfolípidos del polen muestran un importante contenido en ácido palmítico; en *Oenothera missouriensis* y *P. halepensis* este ácido graso llega a constituir cerca del 95 % de los ácidos grasos de estas moléculas (Caron, 1972; Andrikopoulos y col. 1985). De igual forma, destaca el contenido de ácido oleico y linoleico en diferentes fosfolípidos del polen de *P. ponderosa* (McIlwain y Ballou, 1966). En general, puede establecerse que los ácidos linolénico y, sobre todo, palmítico son los ácidos grasos más abundantes de los fosfolípidos del polen (Sekiya y col., 1988).

En lo que respecta a los glicolípidos, el análisis de sus ácidos grasos ha puesto de manifiesto una composición semejante a la de los fosfolípidos. Así, Caron (1972) detectó en polen de *Oenothera missouriensis* un 40 % de palmítico y casi un 60 % de linolénico en estos lípidos. Teniendo en cuenta que en los tejidos vegetales la temperatura de transición de fase disminuye a medida que aumenta el contenido en ácidos grasos poliinsaturados (Chapman, 1984), la elevada insaturación de los lípidos del polen podría

tener una especial importancia al conferir ventajas adaptativas a aquellas plantas polinizadas a bajas temperaturas (Sekiya y col., 1988).

Por otra parte, los lípidos neutros son constituyentes fundamentales de muchos tipos de polen. En *Zea mays*, *Typha latifolia* y *Pinus halepensis*, el fraccionamiento del extracto de lípidos totales rinde un 60 % de lípidos neutros, constituidos principalmente por triacilgliceroles (Stanley y Linskens, 1974; Andrikopoulos y col., 1985). En algunas especies como por ejemplo *P. halepensis*, estos lípidos también muestran un alto contenido en ácidos grasos libres (Andrikopoulos y col., 1985). Sin embargo, además de triacilgliceroles y ácidos grasos libres, que se configuran como los lípidos neutros más abundantes, el análisis de los extractos lipídicos del polen ha puesto de manifiesto la presencia de monoacilgliceroles, diacilgliceroles, esteroides libres y esterificados, alcoholes, ceras e hidrocarburos (Stanley y Linskens, 1974). En *Zea mays*, los hidrocarburos llegan a constituir un 32 % y en *Pinus halepensis*, las ceras un 9 % de los lípidos totales (Stanley y Linskens, 1974; Andrikopoulos y col., 1985).

En cuanto a la composición en ácidos grasos de la fracción saponificable de lípidos neutros, los estudios de Andrikopoulos y col. (1985) en polen de *Pinus halepensis*, han mostrado una marcada diferencia entre los ácidos grasos libres y el resto de las moléculas que integran esta fracción, superando los ácidos grasos saturados el 90 % del total, de los cuales los ácidos palmítico, mirístico y esteárico son los más abundantes. Por el contrario, los triacilgliceroles contienen más de un 50 % de ácido oléico y linoléico.

En general, el contenido y la calidad de los esteroides del polen varía en función de la especie vegetal (Battaglini y col., 1970). El β -sitosterol ha sido descrito como el componente más abundante en la fracción de esteroides libres, representando del 50 al 75 % en el polen de *Pinus* y la casi totalidad de los esteroides libres en *Quercus robur* (Battaglini y col., 1970; Stanley y Linskens, 1974). Además de β -sitosterol, también ha sido descrita en la fracción lipídica del polen la presencia de otros esteroides. Así, en maíz, donde el colesterol es mayoritario, también se ha detectado la existencia de estigmasterol (Goss, 1968). Del mismo modo, en *Pinus*

halepensis el β -sitosterol aparece como principal constituyente de la fracción de esteroides (75.0 %), detectándose así mismo la presencia de ergosterol (12.0 %), estigmasterol (8.0 %) y cantidades menos importantes de colestanol y colesterol (Andrikopoulos y col., 1985). Los mismos autores pusieron de manifiesto en este polen la existencia de ésteres de esteroides y esteril glicósidos, siendo 1 : 3.5 la razón esteroides libres / esteroides esterificados. Esta razón es de gran interés dada la incidencia de estas moléculas en las propiedades de las membranas (Bhattacharyya y Gupta, 1983; Ford y Barber, 1983).

Así mismo, se ha comprobado en otras especies de *Pinus*, la existencia de campesterol, colesterol y metilcolesterol (Stanley y Linskens, 1974), mientras que de forma excepcional se ha detectado en algún tipo de polen la presencia de corticosteroides y de otras hormonas de origen animal como β -estradiol y epitestosterona (Bennett y col., 1966; Säden-Krehula y col., 1971; Amin y Paleologou, 1973; Stanley y Linskens, 1974).

En la investigación bibliográfica llevada a cabo hemos encontrado escasas referencias relacionadas con el estudio de los componentes lipídicos a nivel del polen germinado. Recientemente, Sekiya y col. (1988) en un estudio de los cambios inducidos durante la germinación del polen de té, han observado que la razón entre las diferentes moléculas fosfolipídicas permanecía constante después de la germinación, al tiempo que la composición en ácidos grasos de los fosfatidilinositoles cambiaba sensiblemente. Así, en este fosfolípido, el porcentaje de ácido linolénico disminuía del 45 al 30 % durante las primeras horas de germinación, mientras que el de palmítico aumentaba del 45 al 50 %. Tras 20 h de iniciada la germinación, el ácido linolénico constitutivo de la fosfatidiletanolamina disminuía del 48 al 14 % y el de palmítico aumentaba del 40 al 50 %. Por el contrario, la composición en ácidos grasos de la fosfatidilcolina permanecía constante.

La fosforilación de las moléculas de fosfatidilinositoles y la existencia de una actividad fosfolipasa C específica de estos fosfolípidos es un hecho de gran interés observado en polen de *Lilium* por Helsper y col. (1986) y por Helsper y Pierson (1986). Si se tiene en cuenta que los fosfoinositidos han sido implicados en la regulación de múltiples funciones

celulares, muy especialmente en aquéllas dependientes de la concentración de calcio libre citoplasmático (Hokin, 1985), los resultados obtenidos por Sekiya y col. (1988) en relación a un rápido cambio en la composición de ácidos grasos de estos fosfolípidos durante la germinación del polen de té, podrían sugerir la existencia de una forma fosforilada de fosfatidilinositol capaz de intervenir en la regulación de procesos implicados en el crecimiento del tubo polínico.

D. COMPONENTES BIOQUÍMICOS DE LA PARED DEL POLEN

El interés del estudio de los componentes de la pared celular estriba en su estrecha relación con los procesos de crecimiento y diferenciación. En este sentido, el polen, durante los procesos de germinación y crecimiento del tubo polínico, constituye una de las células vegetales de más rápido crecimiento, por lo que puede representar un buen modelo para el estudio de dichos procesos.

La intina y la exina son las estructuras integrantes de la pared celular del grano de polen. Al ser la exina resistente a la hidrólisis ácida, los azúcares identificados como constituyentes de los polisacáridos de paredes celulares tienen probablemente su origen en la intina, la cual está constituida por una capa de naturaleza celulósica y otra rica en sustancias pécticas (Nakamura y Suzuki, 1981).

Es muy escasa la información disponible acerca de los componentes de la pared celular del polen. Nakamura y Suzuki (1981) realizaron un estudio exhaustivo sobre la composición y contenido en azúcares de esta estructura en polen de *Tulipa gesneriana*, *Lilium longiflorum* y *Camellia*, comprobando que la arabinosa, galactosa, glucosa y ácidos urónicos (galacturónico) eran los componentes mayoritarios. El mioinositol aparecía como un constituyente abundante de los polisacáridos de la pared en *Camellia japonica*, *C. sasanqua* y *Lilium longiflorum*, mientras que la fucosa sólo pudo ser detectada en polen de *Tulipa gesneriana* (Nakamura y Suzuki, 1981).

Por otra parte, Hara y col. (1977) después de aislar y solubilizar la intina del grano de polen de *Cryptomeria japonica*, fraccionaron el extracto obtenido mediante cromatografía en columna de DEAE-celulosa y Sephadex

G-200, purificando de esta forma un componente polisacárido constituido fundamentalmente por galactosa, ramnosa, arabinosa, ácidos urónicos y, en menor cantidad, xilosa. Debido al importante contenido en ácidos urónicos, el componente aislado fué considerado como un polisacárido de naturaleza péctica.

Una vez que el polen germina, la síntesis de la pared celular tiene lugar en la cara interna de la intina, lo que sugiere que la pared del tubo polínico no es una simple prolongación de la intina del grano de polen maduro (Larson, 1965). Por otra parte, el principal componente de la pared del tubo polínico es la calosa, habiendo sido puesto de manifiesto mediante estudios de microscopía electrónica, la presencia de granos de calosa en el citoplasma del tubo polínico, procedentes del retículo endoplasmático (Nakamura y col., 1979).

Un estudio de la composición de los polisacáridos constituyentes de la pared celular del tubo polínico, llevó a Nakamura y Suzuki (1981) a concluir que la glucosa suponía más del 70 % de los azúcares de la pared, mientras que el contenido de arabinosa, galactosa y mioinositol era muy inferior al de glucosa y al encontrado en los polisacáridos de la pared del grano de polen maduro. Los mismos autores detectaron en la pared del tubo polínico de *Camellia japonica*, sustancias pécticas, hemicelulosas y α -celulosas en una proporción del 3, 61 y 19 %, respectivamente. Así mismo, comprobaron que los constituyentes de las sustancias pécticas eran arabinosa, galactosa, glucosa y ácidos urónicos, los de las α -celulosas, glucosa y ácidos urónicos, y que las hemicelulosas estaban constituidas casi exclusivamente por glucosa (97 %). Este glucano hemicelulósico ha sido identificado con la calosa conformadora de la capa interna de la pared del tubo (Roggen y Stanley, 1971).

Nakamura y col. (1980b) estudiaron más detalladamente los constituyentes polisacáridos de los tubos polínicos de *Camellia japonica*, así como la composición de cada uno de ellos. La metodología seguida por estos autores les permitió obtener tres fracciones hemicelulósicas y una de sustancias pécticas. Una de las fracciones hemicelulósicas estaba constituida casi exclusivamente por glucosa, mientras que de las otras dos,

la hemicelulosa A mostraba una composición similar a la anterior y la hemicelulosa B, además de glucosa como componente mayoritario, presentaba cantidades importantes de arabinosa, galactosa y ácidos urónicos. La fracción correspondiente a las sustancias pécticas, estaba constituida por ácidos urónicos y, en menor proporción, por arabinosa y galactosa.

La composición de los polisacáridos de la pared celular del polen germinado parece asemejarse a del polen maduro y a la de los tubos polínicos. Así, los estudio de Rae y col. (1985) pusieron de manifiesto en polen germinado de *Nicotiana glauca* un 65 % de glucosa, porcentaje algo inferior al encontrado en tubos polínicos, y un 25 % de arabinosa, proporción muy similar a la descrita en granos de polen maduro (Nakamura y Suzuki, 1981).

Por otra parte, es bien conocido que el crecimiento del tubo polínico depende del azúcar suministrado exógenamente, habiéndose podido comprobar que la composición en azúcares de la pared del tubo está influenciada por la fuente externa de carbohidratos (Nakamura y col., 1980b). En este sentido, cuando el crecimiento del tubo polínico de *Camellia japonica* era inhibido, bien por la adición de cicloheximida o maltosa, bien por ausencia de un aporte externo de azúcar, el nivel de glucosa en la pared del tubo disminuía, mientras que el de pentosas aumentaba, aproximándose de esta forma a la composición del grano de polen maduro (Nakamura y Suzuki, 1981).

Diversos autores han establecido que el rápido crecimiento de la pared del tubo polínico se relaciona con la flexibilidad y plasticidad de esta estructura a nivel del ápice, lugar donde se produce el crecimiento. A este respecto, Roggen y Stanley (1971) comprobaron que los polisacáridos de naturaleza péctica eran los componentes fundamentales de esta región, lo que unido a la ausencia de hemicelulosas, determina las propiedades de flexibilidad del tubo polínico en dicha zona de crecimiento.

La importancia del estudio de las proteínas del polen ha quedado reflejada en los trabajos de Gay y col. (1986 a y b), quienes mediante técnicas de electroenfoque aplicadas a geles de poliacrilamida conteniendo granos de polen, sugirieron la posibilidad de estimar en una población de granos de polen, algún marcador génico capaz de determinar características

de importancia agronómica, lo que permitiría su utilización como un test rápido en la selección de genotipos vegetales.

Para gran número de investigadores, las proteínas de la pared celular del polen parecen estar implicadas en el crecimiento de dicha estructura (Klis, 1976; Honson y Wada, 1980; Smith, 1981). Debido a la dificultad para el aislamiento de las paredes celulares, y a la problemática que plantea la obtención de grandes cantidades de este material, especialmente en el caso de los tubos polínicos, el estudio de dichas proteínas casi no ha sido abordado. Uno de los pocos trabajos realizados al respecto, fué llevado a cabo en grano de polen de *Lilium longiflorum* por Yi-qin y col. (1983). Estos autores, tras una tediosa metodología, consiguieron aislar y purificar las paredes celulares, determinando en ellas un contenido en proteínas por peso seco de paredes del orden del 4.0 %. La separación electroforética de las proteínas extraíbles con ClNa puso de manifiesto unos pesos moleculares comprendidos entre 12 y 200 Kd, siendo las glicoproteínas los componentes proteicos de mayor peso molecular. Por otra parte, el análisis del contenido en aminoácidos de las proteínas totales reveló que todos los aminoácidos proteínogenéticos se encuentran formando parte de la pared celular del polen de *Lilium longiflorum* (Yi-qin y col., 1983).

Especial atención ha merecido el estudio de las proteínas de la pared del polen germinado. Yi-qin y col. (1983) detectaron un contenido en proteínas del 3.4 % en la pared celular del polen germinado de *Lilium longiflorum*, valor algo inferior al detectado en el polen maduro de la misma especie. Estos autores comprobaron que, al igual que en grano de polen maduro de *Lilium*, la mayoría de dichas proteínas eran extraíbles con álcali. Por otra parte, la electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas extraíbles con ClNa, reveló la desaparición de algunos de los componentes presentes en el polen maduro, así como la aparición de otros nuevos. Así mismo, estos autores pudieron observar que la mayoría las proteínas nuevamente sintetizadas eran glicoproteínas, las cuales podrían estar implicadas en el reconocimiento celular, aspecto de gran importancia en el sistema de incompatibilidad y otras interacciones polen-estilo (Lamport y Catt, 1981).

En lo que concierne a la composición aminoacídica de las proteínas de la pared celular, ha sido puesto de manifiesto en polen germinado de *Lilium longiflorum* una composición y contenido en aminoácidos muy similar a la encontrada en grano de polen maduro. Únicamente es de destacar el mayor contenido de hidroxiprolina en el polen germinado (Yi-qin y col., 1983). Para Honson y Wada (1980), las proteínas, principalmente, aquéllas extraíbles con álcali conteniendo hidroxiprolina, pueden tener un papel importante en la extensibilidad de la pared celular del tubo polínico. En este mismo sentido, Rae y col. (1985) tras examinar la composición en aminoácidos de las paredes celulares de granos de polen germinados de *Nicotiana glauca*, encontraron los mismos aminoácidos descritos para el polen germinado de *Lilium*, si bien en *Nicotiana* eran mayoritarios la glutamina, la asparragina y la glicina, al tiempo que el contenido en hidroxiprolina algo más elevado que el detectado en *Lilium*.

E. CAMBIOS METABOLICOS DURANTE LA GERMINACION

1. Biosíntesis de lípidos

La síntesis de componentes de la membrana plasmática y de la pared celular constituye uno de los principales procesos biosintéticos que tiene lugar durante el crecimiento del tubo polínico, lo cual va acompañado de un intenso flujo de vesículas membranosas, desde el retículo endoplasmático hacia el plasmalema (Mollenhauer y Morré, 1980; Pictou y Steer, 1982).

Wipple y Mascarenhas (1978) en polen de *Tradescantia paludosa* germinado en presencia de acetato [$1-^{14}\text{C}$] y de actinomicina D o cicloheximida, inhibidores de la síntesis de ARN y de proteínas, concluyeron que los enzimas requeridos para la síntesis de fosfolípidos y de lípidos neutros eran sintetizados durante la maduración del grano de polen, permaneciendo activos a lo largo de la germinación y crecimiento del tubo polínico.

Así mismo, los estudios de biosíntesis lipídica en polen de *Crotalaria juncea* en presencia de acetato [$2-^{14}\text{C}$] han revelado que el 20 % de la radioactividad incorporada a lípidos se ubica a nivel de los lípidos

polares, siendo el ácido fosfatídico y, sobre todo, la fosfatidilcolina las moléculas mayoritariamente sintetizadas (Malik y Chawla, 1983). A este respecto, los trabajos antes indicados de Wipple y Mascarenhas (1978) demostraron que cuando el acetato [$1-^{14}\text{C}$] se adicionaba al final del desarrollo del tubo polínico, la biosíntesis de fosfolípidos era más activa, sobre todo, a nivel de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, siendo importante resaltar también la biosíntesis de fosfatidilinositoles y fosfatidilserina.

En polen de *Lilium longiflorum* la biosíntesis de fosfolípidos durante la germinación partiendo de glicerol [$2-^3\text{H}$], ha revelado que casi el 60 % de la radiactividad incorporada a lípidos lo era a fosfatidilinositoles, fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina y, sobre todo, fosfatidilcolina (Helsper y Pierson, 1986). Del mismo modo, cuando se incubaba el polen en presencia de [$^{32}\text{-P}$] ortofosfato durante las primeras horas de germinación, fué observado también un máximo de incorporación en fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (Helsper y col., 1986).

Como era de esperar, en presencia de mioinositol [$2-^3\text{H}$], el polen de *Lilium longiflorum* biosintetizaba principalmente fosfatidilinositoles, aunque cuando la germinación avanzaba, la biosíntesis se dirigía hacia polisacáridos pécticos (Helsper y col., 1986). Entre los fosfatidilinositoles sintetizados, estos mismos autores pusieron de manifiesto la síntesis de fosfatidilinositol-4-monofosfato y fosfatidilinositol-4,5-bifosfato, componentes que, como se ha inicado en otro apartado de esta Memoria, pueden tener especial importancia en la regulación por el Ca^{++} del crecimiento del tubo polínico.

Si bien los estudios de biosíntesis lipídica durante la germinación del polen, han puesto de manifiesto que los fosfolípidos se sintetizan en el mismo grado en polen de diferentes especies vegetales, en el caso de los lípidos neutros, el panorama es muy distinto, lo cual tiene una enorme importancia ya que impide determinar qué tipo de lípido neutro se sintetiza de forma generalizada durante la germinación del polen.

De los resultados obtenidos al respecto, se han podido determinar algunas conclusiones importantes. Así, en polen de *Crotalaria juncea* incubado en presencia de acetato [$2-^{14}\text{C}$] el 80 % de la radioactividad

incorporada a lípidos se detectaba a nivel de los lípidos neutros, siendo los ácidos grasos libres y los triacilgliceroles las moléculas mayoritariamente sintetizadas, siendo mucho menos significativa la biosíntesis de esteroides libres y esterificados (Malik y Chawla, 1983). Posteriormente, Helsper y Pierson (1986) estudiando la incorporación de glicerol [2-³H] en los lípidos del polen de *Lilium longiflorum*, detectaron tras 4 h de germinación, un 42 % del precursor en la fracción de lípidos totales correspondiente a lípidos neutros, principalmente triacilgliceroles y 1-2 diacilgliceroles. Por otra parte, en polen de *Tradescantia*, Wipple y Mascarenhas (1978) habían observado que la incubación con acetato [1-¹⁴C] suponía la síntesis mayoritaria de pigmentos, en relación a los lípidos neutros.

2. Utilización de la reserva glucídica

Teniendo en cuenta que los azúcares del polen pueden ser utilizados como fuente energética para la germinación y el crecimiento del tubo polínico y como precursores de los polisacáridos que conforman la pared celular, nos ha parecido importante conocer los trabajos realizados en este sentido a nivel del polen de distintas especies, debiendo resaltar la muy escasa información existente al respecto.

Los estudios realizados por Nakamura y col. (1980a) han puesto de manifiesto que el principal azúcar del polen de *Camellia japonica* es la sacarosa, aunque también se detectan pequeñas cantidades de glucosa, fructosa, glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato. El contenido en estas moléculas se ve enormemente influenciado durante la germinación en función del azúcar suministrado exógenamente (Nakamura y col., 1980a; Deshusses y col., 1981). Así, la germinación del polen de *Camellia* en presencia de sacarosa, reducía los niveles de glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato en un 50 y 25 %, respectivamente, respecto a los observados en presencia de glucosa (Nakamura y col., 1980a).

A pesar de que la UDP-glucosa es fundamental para la síntesis del β -1,3-glucano constitutivo de las paredes del tubo polínico, en polen de *Camellia* esta molécula no está presente en el grano maduro, aumentando su contenido durante la germinación independientemente de que el polen se

incube en medios con o sin azúcares (Nakamura y col., 1980a; Nakamura y Suzuki, 1985). En este mismo polen, la maltosa inhibía el crecimiento del tubo polínico al bloquear la formación de UDP-glucosa a partir de glucosa; sin embargo, este efecto no se manifestaba en presencia de sacarosa (Wolosiuk y Pontis, 1974; Nakamura y Suzuki, 1985).

3. Síntesis de proteínas y ácidos nucleicos

Los estudios sobre la necesidad de una activación de la síntesis proteica durante el crecimiento del tubo polínico, han sido importantes para poder definir la dependencia del desarrollo del tubo de las proteínas previamente sintetizadas durante la maduración del grano de polen.

A este respecto, Calzoni y Speranza (1986) estudiaron la biosíntesis de estos componentes a partir de L-leucina [$U-^{14}C$] durante la germinación del polen de manzano, comprobando una escasa incorporación del precursor y una fuerte inhibición por cicloheximida. Sin embargo, en presencia de actinomicina D no sólo disminuía la incorporación de leucina sino que también tenía lugar la liberación de proteínas al medio de germinación. Estos autores observaron que la presencia de cicloheximida y de actinomicina D no afectaba a la emergencia del tubo polínico y sí al crecimiento del mismo. Del mismo modo, en polen de otras especies vegetales, Dexeimer (1968) y Mascarenhas (1975) indicaron que tanto la emergencia como el crecimiento inicial del tubo son independientes de la síntesis de proteínas, mientras que los estadios finales de crecimiento requieren la síntesis de proteínas *de novo*. Capková y col. (1983b) explicaron la acción de la actinomicina D en base a una interferencia del antibiótico en la funcionalidad de las estructuras implicadas en la síntesis de la pared del tubo polínico.

Raghavan (1984) en un estudio autorradigráfico de la síntesis proteica durante la germinación de granos de polen de *Hyoscyamus niger* en presencia de arginina, leucina, lisina y triptófano tritiados, observó que la incorporación de estos aminoácidos se producía a los pocos minutos de iniciada la incubación, y que a medida que el tubo polínico crecía, la incorporación tenía lugar tanto en los granos de polen como en los tubos

polínicos y nunca a nivel de las células espermáticas, lo que confirma que estas células son metabólicamente inactivas.

Según se indicó en el capítulo introductorio de esta Memoria, la germinación del polen podría servir como modelo de utilidad en el estudio de los mecanismos de adaptación de plantas a condiciones ambientales adversas. A este respecto, se sabe que la síntesis de proteínas muestra modificaciones importantes en función de dichas condiciones. Así, Xiao y Mascarenhas (1985) analizaron las proteínas totales del polen maduro y germinado de *Tradescantia paludosa* al objeto de determinar si la termotolerancia se inducía como respuesta a la síntesis de proteínas: la electroforesis bidimensional, las pruebas de tinción con plata y la autorradiografía de las bandas radioactivas, indicaron que las proteínas denominadas de choque térmico no están presentes en el polen en el momento de la antesis y que tampoco se sintetizan durante la germinación. Concluyeron estos autores, que la termotolerancia se induce sólo mediante un incremento gradual de las temperaturas de germinación y sin que el choque térmico influya en la síntesis proteica.

En cuanto a la influencia de la biosíntesis de ácidos nucleicos en la germinación, es lógico pensar que ésta tenga que depender del metabolismo de dichos compuestos. Así, numerosos estudios han puesto de manifiesto, durante la germinación y el crecimiento del tubo polínico, una biosíntesis de ARN, de polisacáridos de la pared y de lípidos de membranas (Mascarenhas y Bell, 1970; Tupy, 1977; Kamboj y Jackson, 1985); sin embargo, no existen evidencias que justifiquen una replicación del ADN nuclear durante estos procesos. En este sentido, Kamboj y Jackson (1985), atribuyeron la baja capacidad de absorción de timidina tritiada durante la germinación del polen de *Petunia hybrida* a la escasa demanda del precursor, el cual sólo era requerido a efectos de reparación del ADN alterado como consecuencia de la aplicación de agentes mutagénicos (Jackson y Linskens, 1978, 1979, 1980). Curiosamente, en polen manzano se ha descrito una incorporación de timidina tritiada al citoplasma y no a los núcleos, lo que sugiere una síntesis de ADN a nivel de mitocondrias y plastidios de la célula vegetativa (Avanzi y col., 1980; Tagliasacchi y col., 1985).

Por otra parte, el conocimiento de que la germinación y el crecimiento inicial del tubo polínico en polen binucleado es independiente de la síntesis de ARN (Mascarenhas, 1966; Dexeimer, 1968; Mascarenhas y Bell, 1969), se infiere que el ARN requerido para estos procesos está ya presente en el grano de polen binucleado en el momento de la antesis (Frankis y Mascarenhas, 1980). Sin embargo, el hecho de que la actinomicina D inhiba el crecimiento del tubo, una vez que éste alcanza una cierta longitud, sugiere que una segunda fase de este proceso es dependiente de la síntesis de ARN (Rosen, 1968; Mascarenhas, 1975).

Las anteriores consideraciones permitieron establecer en polen binucleado, que el crecimiento del tubo es un proceso bifásico con una primera etapa autotrófica, en la que se produce la movilización de las sustancias endógenas y, una segunda heterotrófica, dependiente de la síntesis *de novo* de ARN, en la cual se produce la división de la célula generativa (Rosen, 1971; Lafleur y Mascarenhas, 1978; Bergamini Mulcahy y Mulcahy, 1983).

Tagliasacchi y col. (1985) indicaron que la transición de la fase autotrófica a la heterotrófica podía estar marcada por la replicación y transcripción de ADN citoplasmático. En este sentido, los estudios de Avanzi y col. (1980) habían puesto de manifiesto que tras incubar polen de manzano con timidina y uridina tritiadas, la radioactividad se incorporaba en el citoplasma y no a nivel de los núcleos vegetativo y generativo. Estos resultados, confirmados posteriormente por Bellani y col. (1984), eran indicativos de que ambos precursores radioactivos deben incorporarse al ADN y ARN de mitocondrias y plastidios de la célula vegetativa.

Existen evidencias que apoyan una relación entre la síntesis de ARN y el estadio evolutivo del polen. Así, en especies avanzadas filogenéticamente como *Tradescantia paludosa*, únicamente se transcribe ARNm durante el desarrollo del tubo polínico, ya que la síntesis de otras formas de ARN se completa antes de producirse la dehiscencia de la antera (Mascarenhas y Bell, 1970; Mascarenhas y Goralnick, 1971; Peddada y Mascarenhas, 1975). Por el contrario, en especies menos avanzadas como *Nicotiana glauca* o *Malus domestica*, sí existe síntesis de ARNr, ARNt y ARNm durante la germinación (Tupy y col., 1977; Sús y Tupy, 1978; Bagni y col., 1981). Es lógico el establecimiento de que la mayor parte del ARN sintetizado es ARNm, cuyo

contenido es escaso en relación al ARN total, ya que la inhibición de la síntesis por actinomicina D no producía cambios en el contenido total de dicho ácido nucleico (Calzoni y Speranza, 1986).

Un aspecto importante, es la demostración en polen de tabaco, de una relación entre el contenido en ARN y el pH del medio de crecimiento del tubo polínico (Tupy y col., 1986). En medios tamponados a pH óptimo para la germinación (pH 5.9), el contenido en ARN permanecía constante, mientras que en medios no tamponados se producía un descenso en el contenido de este ácido nucleico, lo que se ha atribuido a una desorganización estructural y funcional de los ribosomas, como consecuencia de la acidificación del pH externo provocada por la extrusión de H^+ y la consiguiente disminución del pH citoplasmático.

F. FACTORES QUE AFECTAN A LA GERMINACION

Numerosos son los factores que afectan el proceso germinativo. Por ello, a la hora de abordar el estudio de la influencia de los agentes endógenos y exógenos sobre este proceso, se hace necesario la utilización de técnicas de germinación *in vitro* que mantengan condiciones de incubación bien definidas, a fin de analizar, posteriormente, el efecto del factor en estudio.

Los estudios al respecto han puesto de manifiesto que la germinación está fuertemente influenciada por el aporte exógeno de azúcares, iones minerales y, en algunos casos, reguladores del crecimiento, habiéndose demostrado que algunos agentes físicos, temperatura y pH, afectan también a este proceso. Por todo ello, hemos considerado importante describir el efecto de los factores que influyen en la germinación.

1. Iones minerales

Estudios *in vitro* han puesto de manifiesto la esencialidad de ciertos elementos como boro, potasio y calcio, en la germinación y crecimiento del tubo polínico. No obstante, se desconoce, en gran medida, el efecto de los mismos sobre estos procesos, de manera que los apartados que siguen constituyen una recopilación de la información disponible al respecto.

El potasio es un elemento que habitualmente se adiciona a los medios de germinación, si bien su función en este proceso no ha sido aún dilucidada, debido a las escasas investigaciones realizadas en este sentido. Algunos investigadores han obtenido germinaciones satisfactorias en polen de peral y nogal en ausencia de potasio (Filiti y Marcucci, 1982; Luza y Polito 1985). Del mismo modo, los porcentajes de germinación de polen de *Lilium* y de jojoba en medios con K^+ son equiparables a los obtenidos en ausencia del mismo (Deshusses y col., 1981; Lee y col., 1985; Reiss y col., 1985a; Nobling y Reiss, 1987).

En relación a la concentración intracelular de K^+ , Reiss y col. (1985b) establecieron, mediante técnicas de *scanning* con microsondas de protones, que el K^+ aparecía igualmente distribuido a lo largo del tubo polínico de *Lilium longiflorum*. En el mismo origen vegetal, los estudios de Deshusses y col. (1981) han indicado que la adición de ClK (8.4 mM) al medio de germinación conducía a una liberación de H^+ al medio debido, presumiblemente, a la creación de un antiport K^+/H^+ .

Bashe y Mascarenhas (1984) propusieron que el K^+ actúa a nivel de la síntesis de proteínas al comienzo de la germinación. Estos autores determinaron, mediante espectroscopía de absorción atómica, un elevado contenido de K^+ (280 mM) en polen maduro de *Tradescantia paludosa*, mientras que en el mismo polen una vez hidratado, la concentración intracelular disminuía fuertemente (100 mM). A este respecto, los estudios de Weber y col. (1977) son indicativos de una inhibición de la síntesis proteica cuando el K^+ supera una concentración determinada. Así mismo, los trabajos de Bashe y Mascarenhas (1984) han demostrado que la hidratación del grano de polen conlleva una concentración intracelular de K^+ óptima para la iniciación de la síntesis proteica, lo cual coincide con un incremento en el número de polisomas y con una importante incorporación de aminoácidos en proteínas.

El calcio también ha sido considerado como un elemento esencial en la germinación del polen de muchas especies, habiéndose centrado su función durante el crecimiento del tubo en el mantenimiento de la integridad y/o en el control de la permeabilidad de la membrana. Así, Filiti y Marcucci

(1982), en polen procedente de dos cultivares de peral, observaron porcentajes de germinación entre el 50 y el 60 % a concentraciones de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ comprendidas entre 0 y 250 ppm, mientras que concentraciones superiores provocaban la inhibición del proceso.

En cuanto al crecimiento del tubo polínico, Filiti y Marcucci (1982) observaron también una pauta similar frente al Ca^{++} , si bien el mayor crecimiento del tubo se producía en ausencia de este elemento. Del mismo modo, Lee y col. (1985) obtenían un máximo de germinación en polen de jojoba cuando el medio de incubación era suplementado con 10 ppm de Cl_2Ca , en tanto que en medios sin o con 100 ppm de Cl_2Ca el porcentaje de germinación tendía a disminuir. Por el contrario, Speranza y col. (1983) observaron que la ausencia de Ca^{++} en el medio de germinación del polen de manzano, provocaba una fuerte disminución de la germinación y de la longitud de los tubos polínicos, así como una liberación de proteínas al medio, comprobando estos investigadores que las poliaminas revertían los efectos provocados por la deficiencia en Ca^{++} . En esta misma línea de actuación, Luza y Polito (1985) comprobaron que 1 mM de Cl_2Ca en el medio de incubación del polen de nogal optimizaba la germinación y el crecimiento del tubo polínico, mientras que en ausencia de Ca^{++} se inhibía la germinación, rompiéndose los tubos polínicos a nivel del ápice y liberando su contenido al medio de incubación.

Por otra parte, los estudios de Reiss y col. (1985b) en polen de *Lilium longiflorum* han revelado la existencia de un gradiente de Ca^{++} a lo largo del tubo polínico, el cual al estar asociado a la membrana celular parece determinar el crecimiento del mismo. Cuando dicho gradiente se destruye por acción de ionóforos del calcio como A23187, deja de ser manifiesta la característica distribución polar de organelas a lo largo del tubo polínico. En este sentido, parecía probable que el gradiente se pudiera originar por un influjo del elemento restringido al ápice del tubo (Reiss y Hert, 1978; Reiss y Hert, 1979; Weisenseel y Kicherer, 1981; Polito, 1983; Reiss y col, 1983).

En conexión con estos estudios, Reiss y Hert (1982) después de germinar polen de *Lilium longiflorum* en medios conteniendo clorotetraciclina, observaron que el tratamiento con el antibiótico perturbaba la zonación polar de las diferentes organelas, provocando una acumulación anormal de

vesículas del retículo endoplasmático, irregularidades en la membrana plasmática, la formación de crestas inusuales en las mitocondrias y la pérdida de microtúbulos. Estos autores interpretaron este crecimiento desorientado, en base a una perturbación de la dinámica del equilibrio del Ca^{++} citoplasmático por quelación con el antibiótico. Del mismo modo, Reiss y Hert (1985) pusieron de manifiesto que la presencia de nifedipina en los medios de germinación del polen de *Lilium longiflorum*, provocaba el acortamiento, ramificación y alteración del diámetro de los tubos polínicos, al tiempo que producía una perturbación en el gradiente intracelular de calcio.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto y con las previas aportaciones de Brewbaker y Kwack (1963), la esencialidad del calcio en la germinación del polen podría explicarse en base a la existencia de un gradiente de este elemento capaz de sustentar el crecimiento del tubo polínico, desconociéndose por el momento el mecanismo por el cual dicho gradiente se traduce en una distribución polar de organelas.

A este respecto, la calmodulina también parece estar implicada en la regulación de la acción del Ca^{++} durante la germinación del polen (Haußer y col., 1984). En 1983, Polito había determinado que esta proteína estimulaba la germinación y el crecimiento del tubo en polen de peral y almendro. Estos resultados revelaban que la respuesta a la calmodulina estaba ligada a la concentración de calcio en el medio de incubación, de forma que, a bajas concentraciones del elemento, un aumento en la concentración de la proteína inducía un efecto inhibitorio. Así mismo, la adición de clorpromazina o trifluoperazina (fenotiazinas inhibitorias de la formación del complejo Ca-calmodulina), inhibía fuertemente la germinación y el crecimiento del tubo polínico. El acceso de la calmodulina exógena se efectúa, probablemente, a nivel del ápice del tubo polínico (única región desprovista de calosa), pudiéndose deber su efecto promotor sobre el crecimiento a la activación de una Ca^{++} -ATPasa del plasmalema, tal como ocurre en células animales (Vinzeni y col., 1984). La visualización de la calmodulina, mediante técnicas de fluorescencia a fenotiazinas, en otros sistemas con crecimiento polar como pelos radiculares de *Lepidium sativum* e hifas de hongos de *Achyra* sp., o multipolar como *Micrasterias denticulata*, apoya lo anterior (Haußer y col., 1984).

De lo anteriormente expuesto y de las observaciones de Picton y Steer (1983) es posible concluir un requerimiento de calcio para el crecimiento del tubo polínico, habiéndose sugerido que este elemento juega un importante papel en la funcionalidad de los microfilamentos y en el transporte de vesículas y su posterior fusión a la membrana plasmática.

También ha sido propuesta una actuación del Ca^{++} a nivel de enzimas presentes en el grano de polen. En *Nicotiana glauca*, Polya y col. (1986) han detectado la existencia de proteínas quinasas dependientes del calcio las cuales podrían estar implicadas en la señal de transducción polen-pistilo durante el crecimiento del tubo polínico. Así mismo, se ha demostrado la activación por el calcio de una fitasa en polen de *Lilium longiflorum* (Scott y Loewus, 1986). Para Jackson y Linskens (1982), ésta fitasa intervendría en la degradación del ácido fítico acumulado en el grano de polen maduro de muchas plantas, de forma que el mioinositol originado en este proceso, podría constituir el sustrato para la biosíntesis de fosfatidilinositoles y pectinas, componentes de especial importancia en la elongación del tubo polínico (Helsper y col., 1984).

Los efectos negativos de la omisión de boro en el medio de germinación *in vitro* del polen, fueron ya observados por Schmucker en 1932 al determinar que la ausencia de este microelemento inhibía la germinación y provocaba el acortamiento, malformación y rotura de los tubos polínicos. Posteriormente, otros autores han obtenido una respuesta similar en polen de distintas especies (Filiti y Marcucci, 1982; Ekaratne y Senathirajah, 1983; Luza y Polito, 1985), aunque en manifiesto contraste con lo anterior, el polen de jojoba germinaba adecuadamente en medios desprovistos de boro (Lee y col., 1985)

En cualquier caso, parece evidente que el requerimiento de boro en el medio de germinación es variable y dependiente de la especie vegetal, de forma que concentraciones óptimas en algunos casos resultan inhibitorias en otros.

Los estudios realizados en relación al análisis del contenido de boro en el polen y en los tejidos estigmáticos y estilares, han revelado que la deficiencia del microelemento en el grano de polen está compensada por un alto contenido en el estigma y estilo (Gärtel, 1952; O'Kelley, 1957). Por

otra parte, en algunas especies, la adición de boro al medio de germinación provocaba un efecto inhibitorio, habiéndose demostrado altos niveles del elemento en el grano de polen (Vasil, 1964).

Respecto al mecanismo de acción del boro, ya en 1932 Schmucker propuso una intervención del elemento en la regulación de la síntesis de componentes de pared, lo que atribuyó a la capacidad del boro para acomplejar moléculas ricas en grupos hidroxilos (celulosa y sustancias pécticas). Esta observación fué apoyada más tarde por los estudios de Stanley y Loewus (1964), quienes determinaron el papel esencial del boro en la síntesis de pectinas. En este sentido, recientemente Yamauchi y col. (1986) han observado en otros tejidos, que la deficiencia en boro inducía un descenso en el contenido en calcio asociado a los constituyentes pécticos de la pared celular.

Otro posible efecto del boro ha apuntado hacia una actuación a nivel de la membrana plasmática, donde intervendría en la regulación de la hidratación del polen (Lovatt y Dugger, 1984).

En cuanto a la intervención de otros iones minerales, entre ellos, magnesio, manganeso y nitratos, en la germinación del polen y en el crecimiento del tubo polínico, los escasos datos encontrados al respecto no permiten por el momento nada más que leves matizaciones sobre la actuación en dichos procesos (Masaru y col., 1980; Cox, 1986).

2. Moduladores osmóticos

La adición de una fuente hidrocarbonada, generalmente sacarosa y glucosa, a los medios de germinación del polen responde a la necesidad de regular el equilibrio osmótico durante dicho proceso. Aunque Nakamura y col. (1980a) observaron que el polen de *Camellia japonica* era capaz de germinar en medios desprovistos de azúcares, sin embargo, el crecimiento del tubo polínico se reducía en ausencia de azúcares y en presencia de glucosa, en relación al observado en medios con sacarosa. Por el contrario, la germinación del polen de jojoba y nogal requiere un aporte exógeno de sacarosa (Lee y col., 1985; Luza y Polito, 1985).

Al objeto de determinar la dependencia de la germinación respecto al azúcar adicionado al medio, Nakamura y Suzuki (1985) estudiaron el crecimiento *in vitro* del tubo polínico de *Camellia japonica* en medios diferenciales en oligosacáridos. Estos autores observaron que la sacarosa, rafinosa, melizitosa y celobiosa promovían el crecimiento del tubo, mientras que otros oligosacáridos sólo ejercían un pequeño efecto estimulador. Así mismo, estos investigadores pudieron comprobar que la maltosa inhibía fuertemente el crecimiento del tubo, incluso en presencia de otros azúcares promotores del mismo, excepto de sacarosa.

En este sentido, Nakamura y col. (1980a) y Deshusses y col (1981) propusieron que la sacarosa exógena era absorbida por el polen de *Camellia japonica* en los primeros estadios de la germinación, sugiriendo la existencia de un simporte sacarosa / H⁺. Así, la adición de sacarosa al medio de incubación del polen de *Lilium longiflorum* provocaba una alcalinización del medio proporcional a la concentración del disacárido. En presencia de un ionóforo de protones, quedaba inhibido tanto el aumento del pH iniciado por la adición del azúcar como la absorción de [U-¹⁴C] sacarosa. Para estos autores, una vez absorbida la sacarosa por el polen, la glucosa y la fructosa resultantes de su hidrólisis, son utilizadas como fuente energética y como esqueleto carbonado para la síntesis de las paredes celulares durante el crecimiento del tubo polínico.

En clara contradicción con estos resultados, el hecho de que el polen de determinadas especies vegetales, entre ellas de *Lilium*, germine en presencia de una fuente hidrocarbonada no metabolizable (pentaeritritol), hace muy cuestionable la necesidad del aporte exógeno de un azúcar metabolizable con otra finalidad a la de regulador osmótico (Southworth, 1983).

3. Reguladores del crecimiento

Tanto en polen de angiospermas (Rosen, 1968; Carmichael, 1970; McLeod, 1975; Malik y Chhabra, 1976; Dhawan y Malik, 1981; Pfahler y col., 1982), como en polen de coníferas (Webber, 1988), las hormonas vegetales han sido implicadas en el desarrollo y germinación del polen, así como en el crecimiento del tubo polínico. Sin embargo, no ha sido aún dilucidada la

función específica de dichas hormonas en estos procesos, ya que al tiempo que un efecto promotor, pueden desarrollar una acción inhibitoria sobre la germinación y el crecimiento del tubo, de lo que se deduce que los niveles endógenos de estas sustancias son suficientes para conducir el proceso germinativo.

En cuanto al papel adscrito a las distintas fitohormonas en la germinación, las auxinas han sido detectadas en polen, estilo y ovario de diversas especies, habiéndose asociado su acción al crecimiento del tubo polínico, así como a la fertilización y estimulación del crecimiento del ovario (Nitsch, 1952).

Aunque estas hormonas han sido implicadas en la estimulación de la germinación del polen, en general su aplicación *in vitro* tiene un escaso efecto estimulante. En polen de *Pinus roxburghii* 2.5 ppm de ácido indolacético (AIA) promueve el crecimiento del tubo, mientras que 50 ppm muestra un marcado efecto inhibitorio (Konar, 1958; Dhawan y Malik, 1981). Por otra parte, en *Zea mays*, Dhingra y Varghese (1985b) comprobaron que el AIA no ejercía efecto sobre la germinación del polen obtenido a partir de plantas crecidas en medios no salinos, sin embargo, la aplicación de 10 ppm de AIA a polen de plantas desarrolladas en condiciones de salinidad aumentaba significativamente el crecimiento del tubo polínico. Estos autores interpretaron estos resultados en base a una posible interacción de la hormona con inhibidores presentes en el polen. Para otros investigadores, el efecto estimulante de la hormona era debido a un efecto promotor sobre la síntesis de ARN mensajero (Malik y Chhabra, 1978).

En cuanto al efecto de las giberelinas, la capacidad de germinación del polen en función de la aplicación exógena de estas hormonas también varía según la especie, el genotipo y la concentración de la hormona en el medio (Chandler, 1957; Carmichael, 1970; Pfahler y col., 1982). El análisis mediante cromatografía y espectroscopía de masas reveló la presencia, en polen maduro de *Pinus attenuata*, de giberelinas A₃, A₄, A₇ y A₉, observándose después de la germinación un incremento en la concentración aquéllas de naturaleza polar y un descenso de las no polares (Kamienska y col., 1976). El efecto estimulador de la giberelina A₃ en el crecimiento del tubo

polínico fué atribuido a una acción de la hormona sobre la síntesis de los ácidos nucleicos, α -amilasa e invertasa (Mann,1975).

Por otra parte, el análisis mediante bioensayos de la actividad de las giberelinas, permitió determinar un máximo de actividad en las primeras horas de germinación del polen de *Pinus coulteri* y *P. ponderosa*, y una disminución posterior hasta valores no detectables, lo cual sugirió la intervención de estas hormonas en el crecimiento del tubo polínico (Kamienska y Pharis, 1975).

Aunque no ha sido definida claramente una función para el ácido abscísico en la germinación, esta molécula sí ha sido detectada en polen, estilo y ovario de varias especies de angiospermas y coníferas (Shibuya y col., 1978; Webber, 1988). En polen de plantas de maíz sometidas a estrés salino, la aplicación exógena de ABA provocaba una inhibición en la germinación, al tiempo que aumentaba el crecimiento de los tubos polínicos (Dhingra y Varghese, 1985b). De la misma forma, en polen de *Hippeastrum vitatum*, Shidu y col. (1986) observaron una estimulación del crecimiento del tubo a concentraciones de ABA entre 1 y 10 ppm, a la cual acompañaba un incremento de la fijación no fotosintética del $^{14}\text{CO}_2$ y de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa.

El mecanismo por el cual el ABA estimulaba el crecimiento del tubo polínico también podría estar relacionado con un aumento en la absorción activa de sacarosa acoplada a un incremento de la actividad invertasa (Cherry, 1968; Gaylor y Glasziou, 1969; Saftner y Wyse, 1984). Por otra parte, Sondheimer y Linskens (1974) postularon un papel no esencial para el ácido abscísico en la germinación del polen y en el crecimiento del tubo, y sí de importancia en la regulación de las reacciones de incompatibilidad polen-pistilo. Así, en *Fetunia hybrida* el contenido en ABA a nivel de los estilos aumentaba rápidamente durante el desarrollo floral, mientras que en ovarios y anteras permanecía relativamente constante. Además, tras una polinización cruzada, el contenido en ABA en los estilos y ovarios se reducía significativamente en relación al contenido detectado en una autopolinización (Yang y col., 1985).

También ha sido descrita la presencia de citoquininas en polen de distintas especies vegetales (Webber, 1988), habiéndose observado previamente que la quinetina estimulaba la germinación del polen de *Finus roxburghii* y el crecimiento del tubo polínico de *F. radiata* (Konar, 1958; Sweet y Lewis, 1971). Sin embargo, la aplicación exógena de quinetina no tenía efecto alguno sobre la germinación del polen y crecimiento del tubo polínico de *F. mugo* (Nygaard, 1969).

Así mismo, se ha podido comprobar que la adición de benzilaminopurina (BAP) a medios de incubación de polen de plantas de maíz crecidas bajo condiciones salinas, paliaba los efectos inhibidores de la sal sobre la germinación y el crecimiento del tubo (Dhingra y Varghese, 1985b). Una estimulación tal inducida por BAP podría deberse, según Kahane y Poljakoff-Mayber (1968) y Singh y Singh (1980) a un efecto sobre la incorporación de aminoácidos en proteínas bajo condiciones salinas, o a un incremento de la actividad invertasa, lo que podría proporcionar precursores para la síntesis de la pared del tubo polínico (Rutherford y Bard, 1971; Howard y Witham, 1983).

Otras hormonas vegetales, entre ellas el brasinosteroide, aislado del polen de diversas especies vegetales, también ha mostrado algún efecto promotor de la germinación (Bonetti y col., 1983; Yokota y col., 1987). Sin embargo, curiosamente, no existen estudios acerca del efecto del etileno sobre los procesos fisiológicos en estudio, no habiendo sido identificada esta hormona en polen de gimnospermas (Webber, 1988).

4. Efecto del pH

La germinación es un proceso sensible al pH, habiéndose demostrado en polen de tabaco que la optimización del pH del medio de incubación prolonga el tiempo de crecimiento del tubo polínico (Tupy y col., 1986). Al igual que la de los iones minerales y hormonas, la influencia del pH sobre la germinación es dependiente de la especie vegetal. Así, el polen de jojoba germina satisfactoriamente a valores de pH comprendidos entre 4 y 8, mientras que en otras especies leñosas, un pH de 4.2 inhibe la germinación

en un 50 % respecto a la observada en medios con pH 5.0 (Lee y col., 1985; Van Ryn y col., 1986).

Parece ser que el efecto del pH sobre la germinación puede estar relacionado con la composición del medio de germinación. En este sentido, Cox (1988) ha observado que la incubación del polen de *Oenothera parviflora*, *Trillium glandiflorum* y *Tsuga canadensis* con iones cobre o nitrato, inducía una mayor tolerancia a los pH ácidos, mientras que la presencia de iones zinc y plomo en los medios de incubación de polen de *Pinus strobus* incrementaba la sensibilidad del proceso germinativo a la acidez del medio.

Un hecho muy importante a tener en cuenta es que el pH del medio de incubación también se ve afectado por la germinación y por el crecimiento del tubo polínico. En este sentido, Van Ryn y col. (1986) han observado en polen de *Cornus florida*, *Betula lenta*, *Betula alleghaniensis* y *Acer saccharum*, que a un pH inicial comprendido entre 3.5 y 4.5, a medida que el polen germina, aumenta el pH del medio hasta alcanzar valores próximos a 5.5. Del mismo modo, Southworth (1983) observó que al incubar polen de *Lilium longiflorum* a pH entre 3.0 y 5.0, el medio se alcalinizaba hasta un pH próximo a 5.0, lo cual podía explicarse según Speranza y Calzoni (1980) en base a la liberación de proteínas y poliaminas al medio de germinación.

En contraste con estos resultados, la germinación del polen de *Lilium* en medios con pH comprendido entre 6.0 y 10.0, provocaba una acidificación del medio, lo que sugirió a Southworth (1983) la participación de una bomba de H^+ en la germinación del polen. Tupy y col. (1986) comprobaron que la germinación del polen de tabaco en medios no tamponados provocaba una inhibición del crecimiento de los tubos polínicos y una disminución en el número de ribosomas y/o polisomas, al tiempo que una acidificación del pH externo. Estos mismos autores y Capková y col. (1983a) concluyeron que la estabilidad estructural y funcional de los ribosomas y la continua síntesis de proteínas necesarias para el crecimiento del tubo polínico, precisa de una constancia en el pH citosólico, para lo cual es fundamental un sistema continuo de extrusión de H^+ .

Por otra parte, la absorción y metabolismo de determinados componentes del medio también pueden influenciar los cambios de pH durante

la germinación. Así, Deshusses y col. (1981) comprobaron en polen de *Lilium longiflorum*, que la adición de sacarosa al medio de germinación producía un incremento del pH, el cual fué interpretado en base a un cotransporte sacarosa / H⁺. La adición al medio de D-glucosa, D-xilosa, maltosa, 3-O-metil-D-glucosa o 2-desoxi-D-glucosa también producía este efecto, aunque la respuesta era inferior a la obtenida en presencia de sacarosa (Deshusses y col., 1981). Por el contrario, otros azúcares como trehalosa, L-glucosa y mioinositol no inducían estos cambios en el valor del pH. A este respecto, Nakamura y col. (1980a) observaron una disminución de las reservas endógenas de sacarosa durante la germinación del polen de *Camellia japonica*, lo que les llevó a sugerir que la sacarosa o sus productos de hidrólisis utilizan la fuerza motriz de los protones para acceder al tubo polínico.

De acuerdo con estos resultados parece lógico pensar que el pH debe jugar un importante papel en la germinación del polen *in vivo*. En este sentido, Cox (1988) estudiando, en polen de varias especies de plantas leñosas características de los bosques de Canadá, la germinación y crecimiento del tubo polínico, ha observado una significativa inhibición de ambos procesos a valores ácidos de pH, comúnmente determinados en el agua de lluvia de esta región. Así mismo, son importantes los datos previamente obtenidos por Karnosky y Stairs (1974) en relación a la inhibición por el SO₂ de la germinación del polen de *Populus deltoides*, donde los protones originados por el SO₂ en el medio de incubación constituyen un importante componente en la toxicidad a este gas (Murdy, 1979; DuBay y Murdy, 1983 a y b).

5. Efecto de la temperatura

La temperatura es uno de los factores ambientales que más influyen en la germinación del polen, habiéndose comprobado que a temperaturas entre 20 y 30 °C se alcanzan los resultados más satisfactorios (Herrero y Johnson, 1980; Fernandez-Escobar, 1981; Filiti y Marcucci, 1982; Southworth, 1983; Xiao y Mascarenhas, 1985).

En un estudio detallado del efecto de este factor sobre la germinación del polen de jojoba, Lee y col. (1985) detectaron un máximo de germinación tras incubar el polen entre 25 y 35 °C, mientras que a temperaturas de 5 y

40 °C tenía lugar una inhibición total del proceso germinativo. Por el contrario, Mascarenhas y Altschuler (1983) pudieron observar que la germinación del polen de *Tradescantia paludosa* no se afectaba por temperaturas de 40 °C, aunque el crecimiento del tubo polínico se detenía después de 30 min de incubación a dicha temperatura. Sin embargo, el incremento gradual de la temperatura hacía crecer los tubos polínicos al menos durante 60 min, una vez alcanzada la temperatura final, lo que hizo pensar a estos autores que el incremento gradual de la temperatura de germinación protegía a los tubos polínicos de la inhibición del crecimiento por este factor.

Xiao y Mascarenhas (1985) han obtenido unas conclusiones muy interesantes tras la observación de que el crecimiento del tubo polínico no se recuperaba después de un choque térmico a 37 °C. Este resultado les llevó a pensar que, a diferencia de los tejidos vegetativos de la planta, el polen es incapaz de sintetizar proteínas frente a un aumento súbito de la temperatura.

De los resultados obtenidos al respecto, parece ser que la capacidad de germinación *in vitro* del polen también se ve afectada por las temperaturas a que estén expuestas las flores en el momento de la antesis o previamente a que ésta se produzca. Así, temperaturas de 35 y 40 °C en el momento de apertura de las flores, disminuyen la viabilidad del polen de diversas plantas (Weaver y col., 1985; Iapichino y Loy, 1987).

Pero no sólo las altas temperaturas afectan a la viabilidad del polen. Así, Dickson y Boettger (1984) observaron una inhibición de la capacidad de germinación *in vivo* del polen de plantas de judía mantenidas a una temperatura de 10 °C después de la floración. Así mismo, Patterson y col. (1987) tras someter yemas florales de plantas de tomate en distintos estadios del desarrollo a estrés por bajas temperaturas, observaron que eran los periodos inmediatamente anteriores a la antesis los de más acusada sensibilidad al frío. Los trabajos de Toriyama y col (1987) también han demostrado la alta sensibilidad al frío de las anteras de plantas de arroz. Para estos autores, el factor de sensibilidad venía representado por la existencia, en las anteras, de componentes lipídicos con alta temperatura de transición. Previamente, los estudios de Satake (1976) en cultivos de arroz,

habían puesto de manifiesto que la mayor sensibilidad al frío correspondía al momento en el cual se desarrollan las células madre de los granos de polen.

G. UTILIZACION DEL POLEN EN LA TECNOLOGIA VEGETAL

El estudio del polen no sólo tiene interés desde un punto de vista bioquímico, sino también por la utilidad que esta célula puede tener en la mejora vegetal. Así, el seguimiento del proceso germinativo puede constituir un modelo muy útil y sencillo para el estudio de los mecanismos de adaptación de plantas a condiciones ambientales adversas. Por otra parte, el polen muestra una especial importancia en la mejora genética de plantas, mediante la utilización de técnicas de polinización *in vitro* o en base a la producción de haploides a partir de polen seleccionado o genéticamente transformado.

1. La germinación del polen en el estudio de los estreses ambientales

Durante la germinación, el polen constituye probablemente la célula de crecimiento más rápido en el reino vegetal. Además, el hecho de que tanto la germinación como el crecimiento *in vitro* del tubo polínico sean procesos relativamente simples desde un punto de vista metodológico y que, tras germinar, el polen constituya una población celular homogénea, comparable a los cultivos celulares, son razones importantes como para considerar la germinación *in vitro* como un test rápido y sensible para el estudio de los mecanismos de adaptación de las plantas a los factores ambientales.

De acuerdo con los estudios previamente indicados en relación a la sensibilidad de la germinación y crecimiento del tubo polínico a la temperatura (Xiao y Mascarenhas, 1975; Herrero y Johnson, 1980; Lee y col., 1985; Iapichino y Loy, 1987), el seguimiento de estos procesos podría ser utilizado para identificar los genotipos capaces de crecer bajo condiciones de estrés térmico. Sin embargo, la no inducción de un perfil específico de nuevas proteínas sintetizadas en el polen en función de la temperatura, impide por el momento, la clara utilización de esta célula como un modelo donde estudiar los mecanismos de termotolerancia.

La germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico han sido también considerados indicadores sensibles a la polución atmosférica (Stanley y Linskens, 1974; Feder, 1968, 1981; Cox, 1983, 1984). En este sentido, el efecto de los contaminantes urbanos e industriales sobre la viabilidad del polen de coníferas, tiene lugar a niveles muy inferiores a los requeridos para llegar a detectar un daño visible en la planta (Houston y Dochinger, 1977). Sin embargo, conviene tener en cuenta antes de utilizar la geminación como test de contaminación atmosférica, que en ocasiones el efecto de los contaminantes no es directo. Así, Murdy (1979) comprobó que el efecto negativo del SO_2 sobre la germinación del polen en medios conteniendo una elevada humedad relativa era debido, en gran medida, a la acidez inducida por este gas sobre la superficie estigmática.

No es necesario insistir en la importancia de la salinidad como factor limitante de la producción vegetal y de la capacidad de extensión agrícola. El estudio de los mecanismos de adaptación de las plantas a este agente está siendo objeto de una exhaustiva dedicación tanto por bioquímicos como por fisiólogos, habiéndose indicado diferentes estrategias desarrolladas por la célula como defensa frente a las altas concentraciones salinas: síntesis de osmorreguladores, estimulación de la actividad extractora de Na^+ desde el citoplasma al exterior o a la vacuola y síntesis de proteínas relacionadas con la adaptación.

En este sentido, es bien conocido que el sometimiento de una planta a altas concentraciones de ClNa hace descender la viabilidad del polen, así como la germinación y el crecimiento del tubo polínico (Reddy y Goss, 1971; Abdullah y col, 1978; Dhingra y Varghese, 1985a). Sin embargo, también se ha comprobado que determinadas fitohormonas mejoran la germinación *in vitro* del polen de plantas de maíz crecidas bajo condiciones de estrés salino, lo cual es indicativo de que la salinidad puede modificar el balance hormonal del polen, afectando a la germinación (Dhingra y Varghese, 1985b). De ser esto así, podría existir un paralelismo entre el polen y otros tejidos vegetales donde la salinidad provoca una disminución de promotores y un incremento de inhibidores del crecimiento (Mizrahi y col., 1970, 1972; Naqvi y Ansari, 1974; Tal, 1977; Downton y Loveys, 1981).

Quizá la semejanza entre los tubos polínicos y los pelos radiculares, pueda constituir otra de las razones por las que la germinación del polen y el crecimiento del tubo pueden ser modelos adecuados para el estudio del estrés salino en plantas (Yokota y Konishi, 1981). Por otra parte, Yokota (1986) observó una fuerte inhibición de la germinación del polen de té en medios salinos. Este autor comprobó también que el Ca^{++} y el K^+ impedían la manifestación del efecto inhibitorio del ClNa sobre la germinación. La comparación de estos resultados con los obtenidos en diferentes cultivos, donde la presencia de dichos elementos revierte el efecto inhibitorio del Na^+ (Aycub, 1974; Chavan y Karadge, 1980), permite, así mismo, sugerir que la germinación *in vitro* del polen puede constituir un buen sistema experimental para el estudio de la salinidad.

2. El polen en la mejora genética de plantas

No cabe la menor duda de que la utilización del polen en la mejora genética de plantas está adquiriendo gran importancia. Así, la hibridación sexual es una poderosa herramienta en la producción de plantas superiores capaces de expresar caracteres distribuidos en diferentes miembros de una misma especie o en diferentes especies de un mismo género. La realización de esta técnica requiere la polinización artificial controlada del parental femenino con polen de un parental masculino seleccionado, entendiéndose por polinización artificial o polinización *in vitro*, la aplicación del polen a óvulos aislados (polinización ovular), a óvulos unidos a la placenta (polinización placentar) o a estigmas (polinización estigmática) (Bhojwani y Razdan, 1983b). Como es lógico, la efectividad de esta técnica, que implica la germinación del polen, el crecimiento del tubo polínico y la fertilización y desarrollo del óvulo fecundado en un embrión viable, depende de la composición del medio en que se realizan estos procesos.

La polinización ovular y placentar, parecen constituir técnicas prometedoras en cuanto a la superación de las barreras de incompatibilidad precigóticas, en las que intervienen los tejidos estigmático y estilar, permitiendo, de esta forma, la producción de nuevos genotipos. En relación a ello, se han conseguido, utilizando técnicas de polinización placentar, embriones híbridos procedentes de cruces de diferentes especies (Zenkteler

y Melchers, 1978). En tales casos, la utilización de medios nutritivos adecuados para promover el desarrollo normal del embrión, permitiría la obtención de una planta híbrida. En este sentido, debe destacarse que la inducción de la organogénesis en un embrión híbrido tiene más probabilidades de éxito que la inducción de dicho proceso a partir de un callo derivado de células somáticas (Bhojwani y Razdan, 1983b).

A este respecto, es importante mencionar que aunque el uso de diferentes técnicas de cultivo de tejidos (producción de haploides a partir de cultivo de anteras y polen o fusión y cultivo de protoplastos) hayan disminuido el interés del estudio de la polinización *in vitro*, conviene destacar que la utilización de esta última técnica ha permitido la fertilización de óvulos superando con ello las barreras de autoincompatibilidad (Rangaswamy y Shivanna, 1967, 1971a) e incompatibilidad entre diferentes especies, géneros y familias (Zenkteler y Melchers, 1978; Zenkteler, 1980), así como la producción de haploides mediante partenogénesis (Hess y Wagner, 1974).

Por otra parte, es bien conocida la importancia de los tejidos y plantas haploides en el campo de la genética y mejora vegetal. La producción espontánea de haploides tiene su origen en los procesos de partenogénesis, produciéndose en la naturaleza muy infrecuentemente. Inicialmente, la producción artificial de haploides se conseguía: mediante cruzamientos definidos conducentes a la eliminación de uno de los complementos cromosómicos (Kasha y Kao, 1970), a través de la aplicación de ciertas fitohormonas a flores fertilizadas (Kasha y col., 1978) o mediante fertilización con polen irradiado (Bhojwani y Razdan, 1983a). Ninguna de estas técnicas constituyó un método eficaz de producción de haploides, habiéndose demostrado, sin embargo, que el cultivo de anteras o polen es un método satisfactorio de obtención de plantas haploides (Niizeki, 1977; Hu, 1978).

Numerosos factores afectan la androgénesis, destacando, entre ellos, las condiciones de cultivo y los requerimientos nutritivos. La importancia de este último factor en la inducción de la repuesta embriogénica ha sido puesta de manifiesto por Kyo y Harada (1986) en *Nicotiana tabacum*, donde el

suplemento o no del medio de cultivo del polen con glutamina puede conducir a esta célula hacia un desarrollo gametofítico o esporofítico.

La rápida detección de mutantes recesivos es una de las aplicaciones más importantes de las células haploides. Aunque la selección de estos mutantes y la posterior duplicación de sus cromosomas podría conducir a la obtención de cigotos diploides capaces de expresar dichas mutaciones, la inducción de la diploidia también puede ser efectuada por fusión de protoplastos de células haploides seleccionadas, habiéndose conseguido producir protoplastos a partir de polen de diversas especies (Loewus y col., 1985; Tanaka y col., 1987).

Así mismo, los tejidos haploides derivados de los cultivos de polen tienen una especial importancia en la inducción artificial de mutaciones. Su utilización podría conducir, mediante selección de líneas celulares, a la obtención de plantas resistentes a condiciones adversas (Bhojwani y Razdan, 1983a). Además, cabe destacar la importancia de las células haploides en la obtención de líneas isogénicas puras. En este sentido, mientras que la fijación de un carácter determinado en un cultivo, mediante técnicas convencionales de cruzamiento, puede requerir varios años, las técnicas de obtención de haploides por cultivo de polen permitirían fijar dicho carácter en una sola generación (Bhojwani y Razdan, 1983a).

Por último, es importante significar la gran trascendencia que tiene en la mejora vegetal la posibilidad de transmitir el material genético al polen. En este sentido, la información genética transmitida por virus al polen, puede posteriormente ser trasladada a la planta mediante subsiguiente fertilización con la célula genéticamente transformada o bien mediante la obtención de nuevas plantas por cultivos de haploides (Doy y col., 1973; Ohta, 1986). Por otra parte, estudios recientes en polen de sandía han puesto de manifiesto la posibilidad de fusión de liposomas a los tubos polínicos (Gad y col., 1988). Esta tecnología abre todo un campo en la utilización del tubo polínico como receptor del ADN previamente encapsulado en los liposomas. Así mismo, la posibilidad de permeabilizar la membrana del polen mediante la aplicación de pulsos eléctricos muy cortos y de elevada intensidad, podría permitir la incorporación de macromoléculas al interior de esta célula (Mishra y col., 1987).

En definitiva, los antecedentes expuestos permiten concluir que el polen constituye un buen modelo experimental para el estudio de múltiples procesos fisiológicos y bioquímicos relacionados con el desarrollo vegetal, así como una herramienta muy válida para la investigación de mecanismos de adaptación de plantas a condiciones adversas y para la mejora vegetal. De aquí, la importancia de estudiar en este trabajo aquellos cambios metabólicos que, desde nuestro punto de vista, pueden regular y definir, en alguna medida, la germinación y el crecimiento del tubo polínico.

III. PLAN GENERAL DE TRABAJO

En función de los objetivos marcados en la introducción, de los antecedentes bibliográficos expuestos y de la experiencia previa de nuestro grupo al respecto, se ha planteado el siguiente plan de trabajo, encaminado a conocer las transformaciones metabólicas que acompañan al polen durante la germinación:

1.- Puesta a punto de un método rápido y sencillo de germinar el polen.

2.- Estudio de la relación entre la capacidad de germinación del polen y la actividad extractora de H^+ , así como de la regulación de estos procesos por activadores e inhibidores específicos.

3.- Estudio comparativo de componentes hidrosolubles y de los cambios en el contenido y en el metabolismo lipídico en polen maduro y germinado.

4.- Estudio de componentes glucídicos y protéicos de la pared del polen maduro y germinado, al objeto de obtener índices bioquímicos representativos de los posibles cambios que se inducen en esta estructura durante la germinación y el crecimiento del tubo polínico.

IV. MATERIAL Y METODOS

A. MATERIAL VEGETAL

Se ha utilizado polen maduro de olivo (*Olea europaea* L. cv. Marteño) procedente de árboles de 10 a 15 años, situados en la provincia de Granada y sometidos a un microclima y a unas condiciones de cultivo similares.

1. Recolección y almacenamiento del polen

Se ha efectuado inmediatamente antes de la antesis, siguiendo el método propuesto por Griggs y col. (1975). Para ello, ramas de olivos de las parcelas experimentales en estudio fueron introducidas en bolsas de papel satinado de 30 x 50 cm. plegadas lateralmente, manteniéndose así en los árboles durante 24 h. Transcurrido este tiempo, el polen de las flores abiertas se recogió en dichas bolsas mediante agitación energética de las ramas y, posteriormente, una vez trasladadas las bolsas al laboratorio, se separaron los restos de material contaminante mediante su paso por mallas metálicas de 1, 0.5 y 0.2 mm/mm de luz (C.I.S.A., Barcelona). Finalmente, el polen fué sometido a una temperatura de 37 °C durante 6 h y se almacenó a -20 °C en viales de vidrio, o se transfirió a criotubos, conservándose en nitrógeno líquido hasta su utilización.

B. GERMINACION *IN VITRO*

El conocimiento de que el crecimiento celular es dependiente del mantenimiento de una concentración iónica intracelular adecuada y del aporte energético procedente de las sustancias de reserva ha sido fundamental en este trabajo para llevar a cabo el estudio de la germinación del grano de polen y el desarrollo del tubo polínico. En el polen, estos procesos suponen un acelerado metabolismo, así como un intenso intercambio de iones a través de la pared celular y de la membrana plasmática. De aquí, la importancia de la utilización de los conceptos relacionados con el transporte iónico para la puesta a punto de un método mediante el cual poder estudiar la regulación y los cambios bioquímicos que se establecen en el polen durante la germinación.

Para el estudio de la germinación *in vitro*, se ha tomado como base tecnológica la utilización de una metodología capaz de incrementar la extrusión de H^+ desde el citoplasma al exterior de la célula. En este sentido, un incremento tal del transporte de H^+ entrañó la utilización de una técnica que posibilitara una estimulación del metabolismo celular. El mantenimiento del polen en condiciones de *ageing* cumplía, en gran medida, con estos requisitos, al servir de lanzadera de procesos claves como: respiración, síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos de membranas, así como de la absorción activa de iones.

Las consideraciones previas y la experiencia de nuestro grupo al respecto, permitieron la puesta a punto de esta técnica experimental para la germinación *in vitro* del polen, la cual ha consistido básicamente, en el sometimiento de dicha célula en su medio de incubación, al bombeo continuo de una corriente de aire. Teniendo en cuenta, además, que el funcionamiento y cuantificación del sistema requiere el control de la acidez que el polen aporta en cada momento al medio de germinación, fué necesario la utilización de un dispositivo capaz de mantener de forma automática el pH a un valor constante previamente fijado.

1. Dispositivo experimental

El sistema utilizado para inducir el *ageing* y hacer germinar el polen *in vitro* (figura 1) consta esencialmente de: un embudo Buchner provisto de una placa porosa de vidrio fritado (nº 1), a través de la cual se hace pasar una corriente continua de aire para mantener una elevada concentración de oxígeno en el medio de incubación y los granos de polen en suspensión, un baño termostatzado, que permite mantener constante la temperatura del medio, para lo cual se hace pasar el agua procedente del baño a través de la doble pared del embudo; un equipo Metrohm pH-stat para la regulación del pH durante el proceso germinativo, compuesto por módulos de pH-meter (E-632), multidosimat (655) e impulsomat (614).

Sustancialmente, el funcionamiento del dispositivo indicado se basa en la generación de un impulso derivado del cambio de pH del medio de incubación del polen, respecto al prefijado en el impulsomat, el cual una vez transmitido al multidosimat hace que éste libere al medio volúmenes fijos

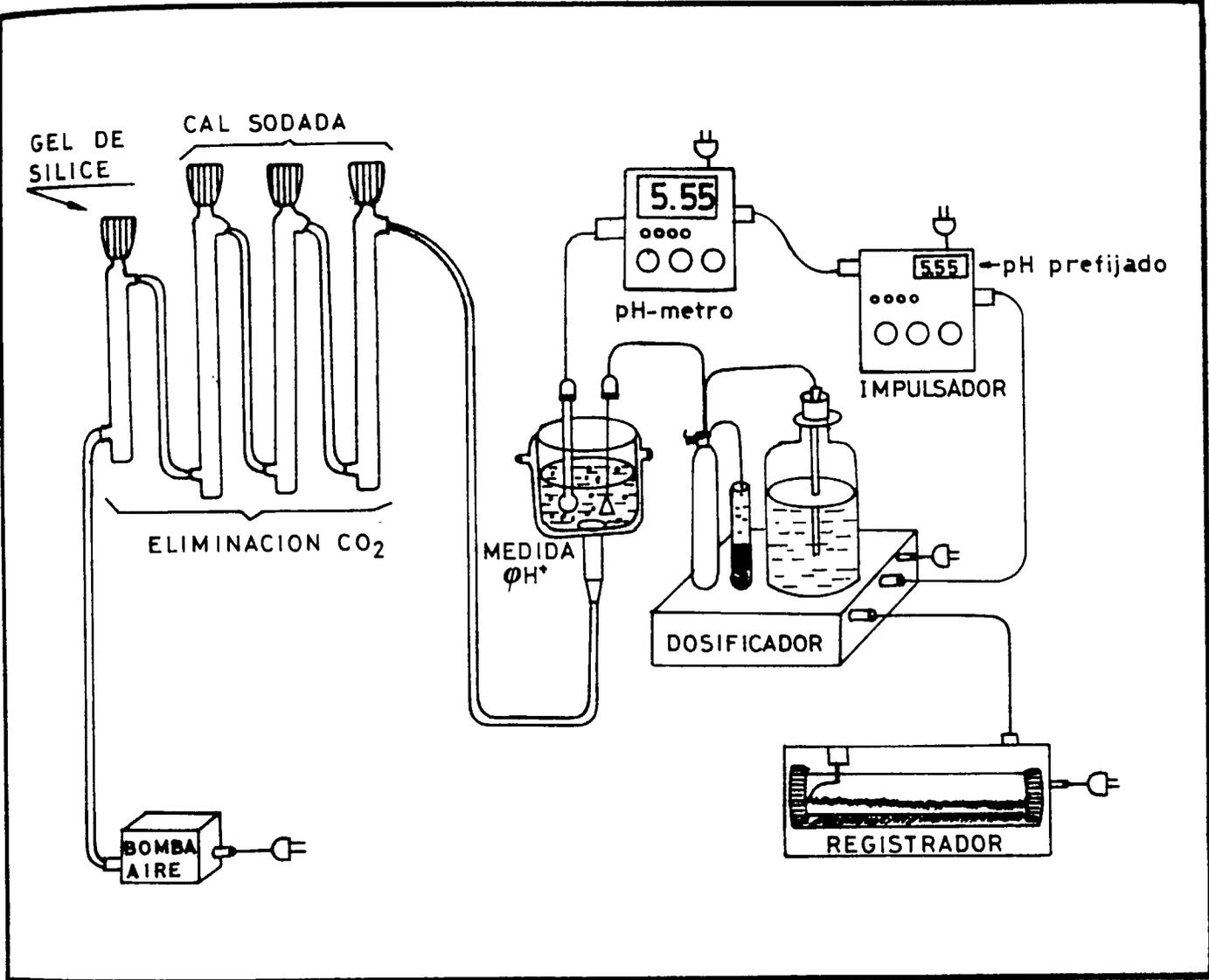


Figura 1. Dispositivo experimental utilizado para germinar el polen *in vitro* y para medir la actividad bombeadora de H⁺.

de solución de KOH o SO_4H_2 de molaridad conocida (2.5 mM). El volumen de solución consumido durante el proceso germinativo, indicado por el multidosimat y reflejado analógicamente en un registrador, es proporcional a la cantidad de H^+ extruidos al medio a través de la membrana plasmática y de la pared del polen.

Por otra parte, en los estudios preliminares llevados a cabo en este trabajo, el polen también se hizo germinar según el procedimiento convencionalmente utilizado por diferentes investigadores consistente en someter al polen a una agitación continua en tubo de ensayo a temperatura constante.

Es, así mismo, importante señalar que todos los experimentos de germinación han sido realizados en un tiempo máximo de 24 h, con una iluminación de 3.0 w/m^2 (Grolux tubes, Sylvania) y manteniendo una relación peso fresco / volumen de medio de germinación de $1\text{g} / 20 \text{ ml}$.

2. Composición del medio de germinación

Básicamente, el medio de germinación del polen ha estado constituido por una solución acuosa de sacarosa (0.3 M) y SO_4K_2 (2.0 mM). En los experimentos llevados a cabo para determinar el efecto del calcio y del boro sobre la germinación y el desarrollo del tubo polínico, se adicionaron al medio cantidades variables de SO_4Ca y/o de BO_3H_3 . Del mismo modo se procedió cuando se determinó el efecto de promotores del crecimiento (ácido indolacético y fusicocina) y de inhibidores específicos de la H^+ -ATPasa de plasmalema implicada en la extrusión de H^+ , sobre dichos procesos fisiológicos.

Por otra parte, para controlar la acción del CO_2 sobre la germinación, fueron utilizados medios de incubación tamponados con tampón MES 50 mM, pH 5.50.

En todos los casos, para evitar la contaminación del medio, se adicionó a éste 1 mg/ml de ampicilina o 0.1 mg/ml de tetraciclina, al no haberse observado diferencias significativas ni en la capacidad germinativa y ni en el crecimiento bacteriano según se utilizara uno u otro antibiótico.

3. Control de la germinación

3.a. *pH del medio*

El estudio del efecto del pH del medio sobre la germinación, requirió la incubación del polen en un medio no tamponado a través del cual se hacía pasar una corriente de aire previamente descarboxado con cal sodada. El pH se mantenía a valores de 4.50, 5.50 o 6.50, mediante el equipo Metrohm, anteriormente descrito. Por otra parte, cuando se determinó el efecto sobre la germinación de las variaciones de pH provocadas en el medio de incubación por el propio polen, éste se hizo germinar en medios no sometidos a regulación alguna de pH.

3.b. *Concentración de CO₂ en el medio*

Para investigar el efecto del CO₂ sobre la germinación, el polen fué incubado en medios conteniendo distintas concentraciones de este compuesto, mediante: flujo constante de aire (15 ml/s), paso de aire descarboxado o de aire enriquecido en CO₂.

La descarboxación del aire se consiguió mediante su paso a través de cal sodada, conteniendo azul de bromotimol como indicador de la posible acidez inducida en el medio por el CO₂. El estudio la germinación en medios enriquecidos en CO₂, requirió el paso a través de dicho medio de una corriente de aire (7.5 ml/s) suplementada con CO₂ al 99.5 % (7.5 ml/s).

Por otra parte, el pH era mantenido a 5.50 con MES 50 mM, en el caso de estudiar el efecto de medios enriquecidos en CO₂ sobre la germinación, o mediante la adición de SO₄H₂ o KOH 2.5 mM, cuando se estudió el efecto de medios descarboxados. Ambas condiciones fueron utilizadas indistintamente siempre que las incubaciones fueran realizadas en presencia de aire.

3.c. *Efectores de la extrusión de H⁺ al medio de incubación*

A fin de determinar una posible relación entre la actividad extractora de H⁺ y la capacidad de germinación del polen de olivo, se estudió dicho proceso en presencia de inhibidores (ortovanadato) o activadores (pomotores

del crecimiento) de la H^+ -ATPasa de plasmalema, enzima cuya actividad regula el bombeo de H^+ y el crecimiento celular (Serrano, 1985). Así, el efecto de la fusicocina y del ortovanadato se determinó por cuantificación, respecto a la germinación patrón, de la actividad extractora de H^+ y del incremento de la germinación.

4. Cuantificación del porcentaje de germinación

El porcentaje de germinación del polen se ha determinado por observación al microscopio óptico (Nikon). Para ello, a distintos tiempos de germinación, se deposita una gota del medio de incubación en un portaobjetos, contándose sistemáticamente de 200 a 300 granos de polen situados en 10 campos diferentes, elegidos al azar.

5. Determinación de la actividad extractora de H^+

La cuantificación de los H^+ extruidos al medio a lo largo del proceso germinativo, se ha llevado a cabo por titulación automática con KOH 2.5 mM, mediante el equipo Metrohm pH-Stat descrito anteriormente, del cambio de pH (prefijado a 5.50 ± 0.02) provocado por estos H^+ en solución. De esta forma, los equivalentes de KOH gastados corresponderán a los H^+ extruidos por el polen, siendo importante resaltar que puesto que el flujo neto de H^+ representa el total de los H^+ extruidos por la célula, mientras que el flujo aparente es el equivalente en H^+ de la cantidad de KOH consumida por el sistema, los resultados obtenidos en el presente trabajo, expresados como microequivalentes de H^+ por g de peso fresco, equivalen lógicamente al flujo aparente.

C. COMPONENTES BIOQUIMICOS DE LA PARED

1. Aislamiento y purificación de paredes celulares

Inicialmente fué necesario aislar y purificar las paredes celulares del polen maduro y germinado a fin de extraer, posteriormente, de las mismas las diferentes fracciones proteicas y polisacarídicas y analizar sus constituyentes.

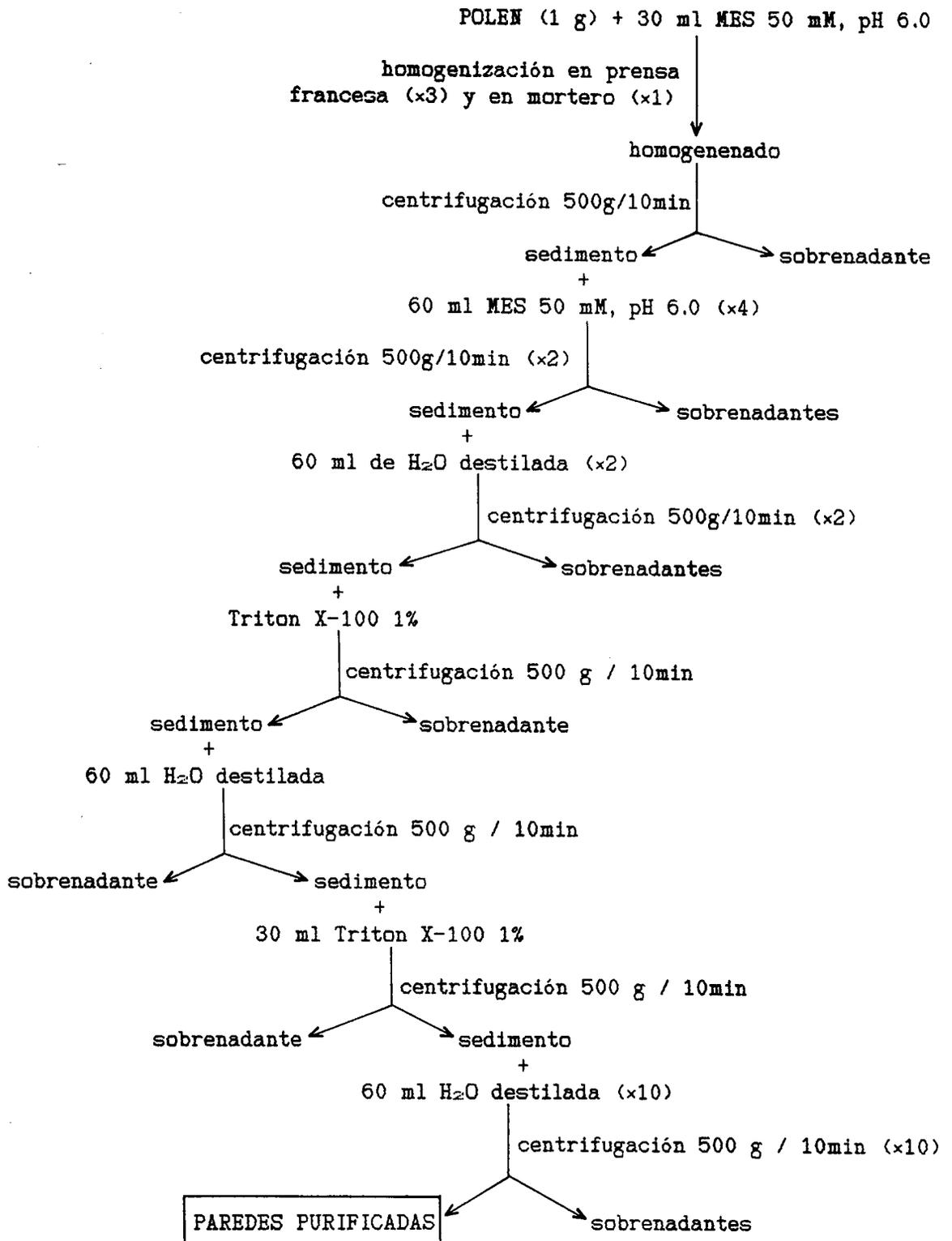


Figura 2. Aislamiento y purificación de la pared celular.

Se ha seguido el método propuesto por Yi-qin y col. (1983), esquematizado en la figura 2. De acuerdo con ello, el polen se suspende en tampón de homogenización constituido por MES 50 mM, pH 6.0 (proporción peso fresco de polen / volumen de tampón, 1 g/30 ml), homogenizándose mediante tres pasos sucesivos en prensa francesa (AMINCO J4 Silver Spring, USA) y otro posterior en mortero.

El homogenado obtenido se somete a sucesivas centrifugaciones a 500 g durante 10 min (centrífuga Sorvall RC5C). La primera centrifugación proporciona un sedimento que incluye las paredes celulares y contaminantes citoplasmáticos, que son posteriormente separados.

El proceso de purificación de las paredes aisladas incluyó cuatro lavados con 60 ml de MES 50 mM, pH 6.0, dos con 60 ml de agua destilada, uno con 30 ml de tritón X-100 al 1 %, uno con 60 ml de agua destilada, uno con 30 ml de tritón X-100 al 1 % y, finalmente, diez con 60 ml de agua destilada. Cada lavado estuvo seguido una centrifugación, determinándose en los sobrenadantes resultantes el contenido en proteínas, a fin de asegurar que el sedimento de paredes celulares estuviera desprovisto de contaminantes del citoplasma.

2. Extracción e hidrólisis de polisacáridos

Los polisacáridos de las paredes celulares aisladas han sido extraídos de acuerdo con Wada y Ray (1978). Básicamente, se han realizado nueve extracciones seguidas de centrifugaciones a 25.000 g durante 15 min. Las tres primeras con 15 ml de DMSO durante 24 h a 20 °C, otras tres con 20 ml de oxalato amónico al 0.5 % durante 1 h a 96 °C y las tres últimas con 20 ml de KOH 4 N durante 24 h a 20 °C (figura 3).

Los tres extractos de DMSO unidos han constituido la fracción de polisacáridos de naturaleza hemicelulósica (fracción DM). Los extractos de oxalato amónico, reunidos y dializados contra agua destilada durante 24 h a 20 °C, corresponden a las sustancias pécticas (fracción OX). Finalmente, de los extractos alcalinos, llevados a pH 5.6 con ácido acético en baño de hielo, se obtiene un precipitado, el cual es separado por centrifugación a

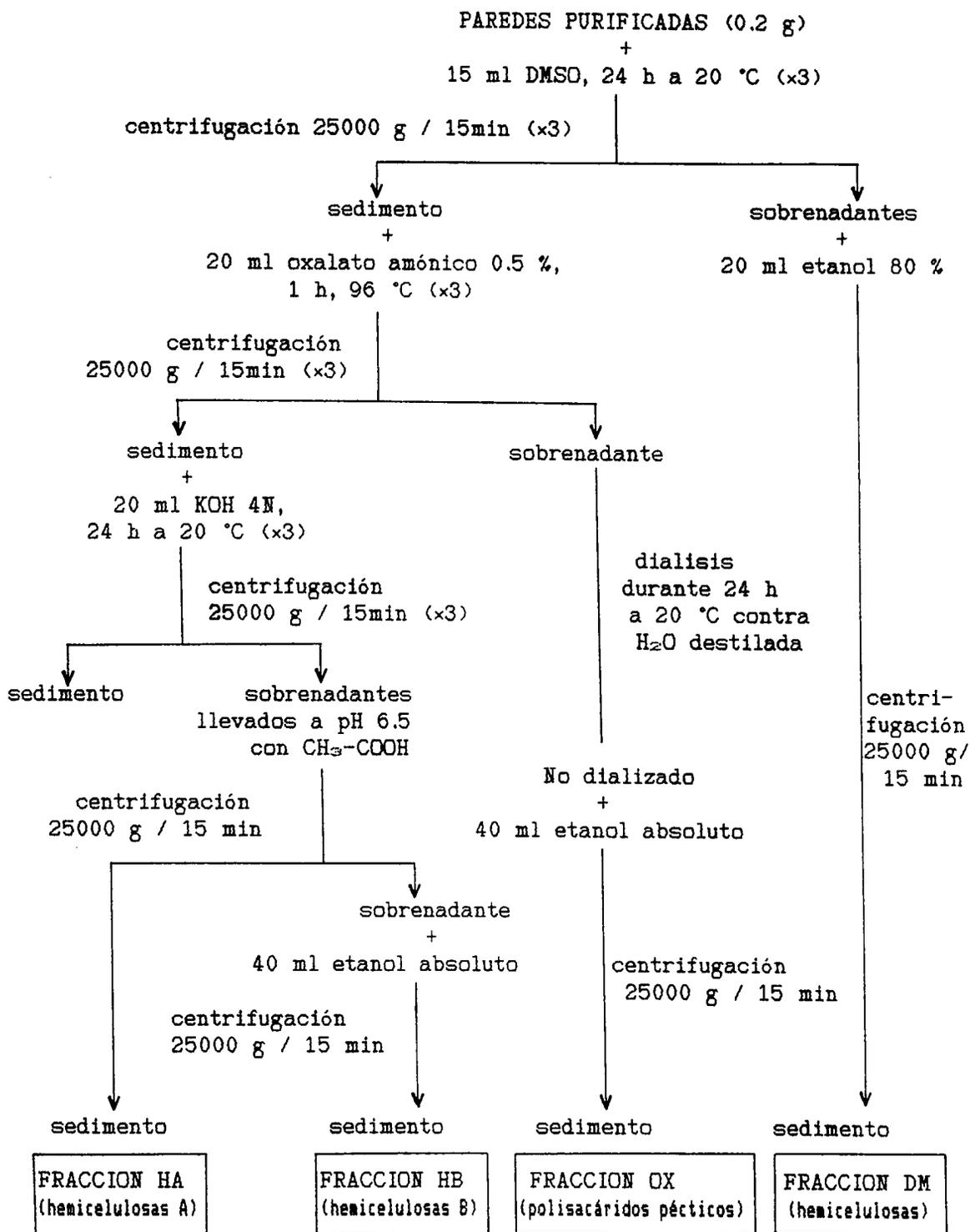


Figura 3. Proceso de extracción de polisacáridos de la pared celular.

25.000 g durante 15 min. Dicho precipitado corresponde a la hemicelulosa A (fracción HA) y el sobrenadante a la hemicelulosa B (fracción HB).

Las tres fracciones solubles (DM, OX y HB) se precipitan con etanol: la fracción DM con 20 ml de etanol al 80 % y las fracciones OX y HB con 40 ml de etanol absoluto. Los precipitados así obtenidos y el correspondiente a la fracción HA, se lavan sucesivamente con 10 ml de etanol, 10 ml de acetona y 10 ml de éter etílico, siendo posteriormente secados a vacío e hidrolizados con 2 ml de ácido tricloroacético 2 N a 123 °C durante 2 h. Tras evaporar el ácido, bajo presión reducida en rotavapor, se obtiene un residuo seco que se lleva a un volumen conocido de agua destilada y se congela a -20°C hasta su utilización.

2.a. Determinación de monosacáridos

La composición en monosacáridos de los polisacáridos de la pared celular se determinó a partir de alícuotas de las fracciones polisacarídicas previamente hidrolizadas. Una vez evaporados los hidrolizados a sequedad, se silan a 100 °C durante 45 minutos con 0.1 ml de BSTFA.

Los componentes silados se determinan por cromatografía de gases, utilizando una columna de OV-101 sobre Chromosorb W-HP (80-100 mesh) a temperatura programada de 80 a 160 °C (2° C / min). La identificación y cuantificación de cada uno de los componentes se realizó frente a patrones silados y desarrollados en las mismas condiciones que las muestras problema.

2.b. Determinación de ácidos urónicos

La dosificación de ácidos urónicos en las distintas fracciones de polisacáridos de la pared se ha realizado según Bitter y Muir (1962). A cada una de dichas fracciones, previamente hidrolizadas, se adicionan 5 ml de tetraborato sódico (25 mM) en SO_4H_2 concentrado. Tras agitar vigorosamente la mezcla, se calienta ésta durante diez minutos en baño María de agua hirviente y se adicionan 0.2 ml de una solución de carbazol al 0.125 % en etanol, calentándose de nuevo durante otros 15 minutos. El contenido en ácidos urónicos se determina espectrofotométricamente a 530 nm

frente patrones constituidos por distintas concentraciones de ácido galacturónico.

3. Extracción de componentes protéicos

La extracción de proteínas de la pared celular del polen maduro o germinado se ha efectuado a partir de las paredes purificadas. Se ha seguido el método de Yi-qin y col. (1983), basado en sucesivas extracciones salinas y alcalinas. Según indica en la figura 4, las paredes purificadas se suspenden dos veces en ClNa 1 M (relación peso fresco de polen de partida / volumen de ClNa, 2 g/80 ml). Transcurridas tres horas, se centrifuga el extracto a 12.100 g durante 10 min a 4 °C. El sedimento resultante se somete a otras tres extracciones con 80 ml de KOH 1 M bajo constante burbujeo de nitrógeno. La primera se realiza a 0 °C durante 3 h, la segunda a temperatura ambiente durante 3 h, y la tercera a temperatura ambiente durante 12 h.

Los extractos salinos obtenidos fueron reunidos, filtrados y dializados contra agua destilada a 0 °C durante 48 h, mientras que los extractos alcalinos se llevaron a pH 6.5 con ácido acético en baño de hielo y, posteriormente, se centrifugaron de la misma forma que se indicó para los extractos salinos, dando lugar a un sobrenadante, que fué dializado contra agua destilada durante 48 h a 0 °C.

Los extractos salino y alcalinos, una vez dializados, fueron concentrados con ayuda de un sistema AMICON CECI y de cartuchos CENTRICON-10, siendo finalmente congelados a -20°C hasta su análisis.

3.a. Análisis de aminoácidos

Para determinar la composición en aminoácidos de las paredes purificadas y de las proteínas extraídas de las mismas, se parte de 0.2 g de peso seco de las paredes o de una alícuota del extracto proteico. A este material, pesado y transferido a un tubo pirex con cierre hermético a rosca, se adicionan 5 ml de ClH 6 N y al tiempo que se hace burbujear en el tubo una corriente de nitrógeno, al objeto de mantener una atmósfera inerte durante el proceso de digestión, el cual transcurre a 110 °C durante 24 h.

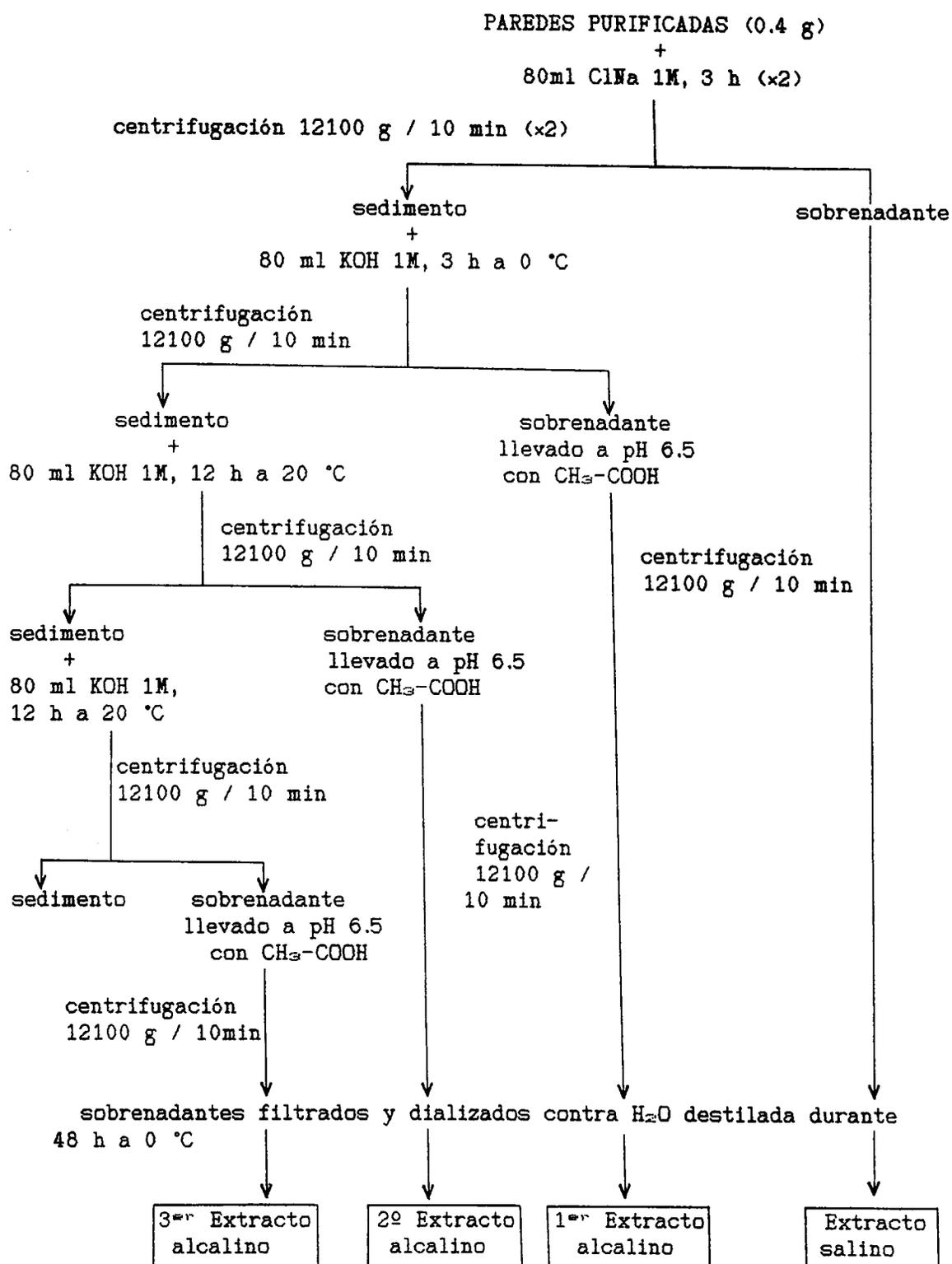


Figura 4. Proceso de extracción de proteínas de la pared celular.

Finalizada la hidrólisis, se separa el material insoluble por centrifugación a 2.000 g durante 10 min, evaporándose el sobrenadante a 60 °C en rotavapor. Se lava el residuo seco resultante sucesivas veces con agua destilada y se lleva a un volumen conocido de agua destilada, conservándose a -20°C hasta su uso.

Los aminoácidos resultantes de la hidrólisis proteica anterior han sido identificados y cuantificados por cromatografía líquida de alta presión. Para ello, a una alícuota de 0.5 ml de la muestra problema se adiciona una cantidad conocida de ácido cisteico (utilizado como *standard* interno). Así mismo, a fin de precipitar las proteínas que pudieran existir en la muestra problema, se añaden otros 0.5 ml de una solución de ácido sulfosalicílico al 4 % en ClH al 1 % y se centrifuga a 2.000 g durante 10 min.

Finalmente, para la derivación de las muestras, a 0.5 ml del sobrenadante anterior se adicionan 70 µl de NaOH 1.6 M, al objeto de alcanzar el pH alcalino necesario para obtener los correspondientes derivados de los aminoácidos, lo cual se lleva a cabo en 25 µl de la solución anterior. Para ello, se adiciona un volumen idéntico de una solución de SDS al 2 % en tampón borato 0.4 M, pH 9.5, y 50 µl de una mezcla constituida por O-ptalaldehído al 0.41 % y 2-mercaptoetanol al 0.41 % en metanol-tampón borato (10:90, v/v), capaz de reaccionar con los grupos amino primarios de los aminoácidos. El conjunto se agita durante 1 min en la oscuridad y a 37 °C, inyectándose una alícuota en un cromatógrafo Beckman modelo 342 con columna Ultrasphere ODS RP-18 de 250 mm de longitud y 4 mm de diámetro, estando constituida la fase móvil por tampón acetato 0.05 M, pH 5.9, metanol y tetrahydrofurano (808:150:2.5, v/v/v) y tampón acetato 0.05 M, pH 5.9 y metanol (200:800, v/v). Los picos correspondientes a los aminoácidos problema se identifican por comparación con sus correspondientes patrones.

D. EXTRACCION DE LOS LIPIDOS DEL POLEN

1. A nivel del grano de polen

Se ha utilizado básicamente el método propuesto por Bligh y Dyer (1959). Para ello, el polen maduro o germinado (2 y 1 g de peso fresco, respectivamente) es adicionado sobre 12 ml de metanol hirviente, manteniéndose 10 minutos a fin de inactivar las fosfolipasas (Douce, 1964). Transcurrido este tiempo, se rompe el polen en una prensa francesa a una presión de 200 Kg / cm² durante dos minutos. Sobre el homogenado así obtenido se adicionan 10 ml de cloroformo y 10 ml de una solución de ClNa al 1.0 %, siguiendo a cada adición una nueva homogenización en las condiciones anteriores. Posteriormente, se efectúa una nueva homogenización en mortero durante un minuto, al objeto de completar la rotura del polen. Después de lavar el mortero con 5 ml de cloroformo, se somete el homogenado final a una centrifugación de 2000 g durante 10 minutos, obteniéndose una capa inferior clorofórmica de color amarillento y otra superior metanólico-acuosa. Separada la fase inferior lipídica, con ayuda de una pipeta Pasteur, se evapora el cloroformo a 28 °C y a presión reducida. Al residuo resultante, se le adiciona un volumen conocido de benzeno-etanol (4:1, v/v), conservándose a -20 °C sin alteración importante (Vorbeck y Martinetti, 1965). Es importante significar que todo el proceso se debe llevar a cabo en atmósfera de nitrógeno.

2. A nivel de la pared celular

Se ha utilizado básicamente el método propuesto por Evans y col. (1987). Para ello, las paredes celulares aisladas se someten a dos extracciones acetónicas sucesivas, las cuales proporcionan fundamentalmente los lípidos neutros y, posteriormente, a una cloroformo-metanólica, que posibilita una mejor extracción de los lípidos polares.

Se parte de 0.3 g de material de pared, el cual es adicionado sobre 6 ml de acetona anhidra, manteniéndose en agitación durante 10 min a 20 °C. El extracto acetónico se separa de los restos de pared por centrifugación a 2000 g / 10 min, suspendiéndose el sedimento resultante en otros 6 ml de

acetona anhidra, repitiéndose el proceso de extracción. Se unen los dos extractos acetónicos así obtenidos, evaporándose la acetona a 20 °C bajo corriente de nitrógeno. Sobre el residuo seco obtenido se adiciona un volumen conocido de una mezcla de benzeno-etanol (4:1, v/v), almacenándose a -20 °C hasta su utilización.

Una vez realizadas las extracciones acetónicas, los restos de paredes secadas a vacío se suspenden en 4 ml de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1, v/v), manteniéndose en agitación durante 12 h a 0 °C. Posteriormente, se adicionan 2 ml de ClNa al 1.0 %, se homogeniza el conjunto en prensa francesa y se centrifuga el homogenado resultante a 2000 g / 10 min. Tras separar la fase inferior lipídica con pipeta Pasteur, se evapora el cloroformo bajo corriente de nitrógeno a 20 °C, llevándose el residuo así obtenido a un volumen conocido de benzeno-etanol (4:1, v/v) y conservándose a -20 °C.

E. SEPARACION DE DIFERENTES CATEGORIAS LIPIDICAS

La separación de las diferentes clases lipídicas, así como de las moléculas constituyentes de las mismas, se ha realizado por técnicas de cromatografía en capa fina.

Para ello, se deposita, bajo una corriente continua de nitrógeno, una alícuota de los extractos de lípidos totales en el origen de una placa de gel de sílice de 0.25 o 0.5 mm de espesor (silicagel G, Merk) y se introduce la placa en una cubeta de vidrio que contiene la fase móvil o el líquido de desarrollo, cuya composición determinará la separación de los diferentes lípidos.

La identificación de cada una de las bandas que aparecen en la placa se realiza mediante revelado con agentes no destructivos (pulverización con rodamina 6G al 0.1 % y observación a la luz ultravioleta). Así mismo, una breve exposición a vapores de yodo permite una mejor observación de las bandas, al fijarse el yodo de forma reversible en las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos.

1. Separación de fosfolípidos

La separación de las diferentes moléculas fosfolípídicas se ha realizado por cromatografía en capa fina de acuerdo con Nichols (1964), que utiliza como líquido de desarrollo una mezcla de cloroformo / metanol / ácido acético / agua (85/12.5/12.5/2) (v/v/v/v) y posterior revelado de las bandas según se ha indicado anteriormente. La identificación de cada uno de los fosfolípidos se ha llevado a cabo mediante el desarrollo cromatográfico de los lípidos problema frente a patrones.

2. Separación de lípidos neutros

Se ha llevado a cabo por cromatografía en capa fina según la técnica de Mangold (1961). La utilización como líquido de desarrollo de una mezcla de hexano / éter etílico / ácido acético (90/10/1) (v/v/v) permite separar los lípidos neutros en: monoacilgliceroles, diacilgliceroles + esteroides libres, ácidos grasos libres, triacilgliceroles e hidrocarburos + ceras. Los fosfolípidos y los galactolípidos permanecen en el origen de la placa.

3. Purificación de esteroides libres

Los esteroides libres del polen han sido purificados a partir de la banda enriquecida en estos compuestos obtenida tras separar por cromatografía en capa fina los lípidos totales, según la técnica de Mangold (1961) anteriormente descrita. Para ello, la banda correspondiente a los esteroides libres es separada de la placa, eluida con cloroformo-metanol (2:1, v/v) y, una vez evaporado el disolvente, saponificada a 80 °C durante 20 minutos con 3 ml de una solución de NaOH-metanólica (0.5 M).

Posteriormente, se realiza la extracción del material insaponificable de la solución metanólica con 15 ml de una mezcla de benceno-hexano (1:1, v/v). Después de repetir el proceso dos veces y lavar sucesivamente con agua destilada, se comprueba la ausencia de jabones en las aguas de lavado con fenoftaleína al 1 %. Seguidamente, a fin de eliminar la humedad residual, se adiciona al extracto SO_4Na_2 anhidro, separándose el SO_4Na_2 por filtración y evaporándose a sequedad el extracto conteniendo la fracción

insaponificable, el cual es llevado a un volumen conocido de benzeno-etanol (4:1, v/v).

F. ANALISIS DE ACIDOS GRASOS

La extracción y metilación de los ácidos grasos de lípidos totales se ha efectuado utilizando la técnica de Metcalfe y col. (1966), modificada por Lechevallier (1966). Se toma una alícuota de la solución de lípidos totales, la cual, previa evaporación en corriente de nitrógeno, es saponificada, en tubos pirex con tapón a rosca, con 3 ml de NaOH-metanólica 0.5 M a 70 ° C, durante 20 min. Posteriormente, se adicionan 3 ml de una solución de trifluoruro de boro en metanol (14 %), manteniéndose de nuevo a 70 °C otros 20 minutos. Una vez enfriados los tubos, se extraen los ésteres metílicos de los ácidos grasos con 5 ml de pentano. Para la cuantificación de los ácidos grasos se adiciona a la fase pentánica, un volumen conocido de una solución metanólica del éster metílico del ácido heptadecanoico (utilizado como patrón interno, al no estar presente en la muestra problema), evaporándose la mezcla a 20 °C y a vacío.

1. Ácidos grasos de lípidos totales

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos son separados, identificados y determinados por cromatografía en fase gaseosa utilizando una columna de etilen-glicol-succinato al 20 % sobre Kielselguhr (60-100 mesh) de 2 m de longitud y a una temperatura constante de 175 °C. La cuantificación de los ácidos grasos se efectúa por comparación del área de cada uno de los picos correspondientes a los ácidos grasos problema, con la proporcionada por el éster metílico del ácido heptadecanoico.

2. Ácidos grasos de diferentes categorías lipídicas

Para determinar la composición y contenido en ácidos grasos de los diferentes lípidos separados por cromatografía en capa fina, las zonas de sílice correspondientes a cada una de las bandas (Mangold, 1961 o Nichols, 1964) son raspadas de la placa y los ácidos grasos de los correspondientes lípidos son metilados con 3 ml de trifluoruro de boro en metanol (14 %)

(Grenier y col., 1973). A continuación se adicionan unas gotas de agua destilada y 5 ml de pentano, separándose la fase pentánica. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos extraídos en el pentano son, posteriormente, analizados por cromatografía en fase gaseosa, en presencia de una cantidad conocida de metil heptadecanoato, utilizado como patrón interno.

G. DOSIFICACION DE FOSFOLIPIDOS, GALACTOLIPIDOS Y LIPIDOS NEUTROS

La dosificación de las moléculas lipídicas presentes en una solución de lípidos totales, así como la determinación de los contenidos relativos de los diversos fosfolípidos, galactolípidos y lípidos neutros se ha realizado a partir del contenido en ácidos grasos de cada una de dichas moléculas (Tremolieres, 1970; Tremolieres y Lepage, 1971; Grenier y col., 1973). Para ello, se estima que los ácidos grasos representan el 95 % de la masa de los lípidos neutros, el 70 % de los fosfolípidos y el 60 % de los galactolípidos.

H. ANALISIS DE ESTEROLES LIBRES

La composición y cuantificación de los esteroides libres del polen, se ha realizado a partir de una alícuota del extracto de benzeno-etanol antes obtenido. Un volumen de dicho extracto evaporado a sequedad, se sila a 60 ° C durante 30 min con 0.1 ml de BSTFA. Los derivados silados de los esteroides se determinan por cromatografía gaseosa (Cromatógrafo Hewlett-Packard, mod. 5730A) a temperatura constante de 255 °C, utilizando una columna de OV-17 sobre Chromosorb-W-AW-DMCS, 100-120 mesh. La cuantificación de las distintas moléculas de esteroides se lleva a cabo frente a patrones de concentración conocida.

I. BIOSINTESIS DE LIPIDOS

1. Precursor radioactivo utilizado

Como precursor de la biosíntesis de ácidos grasos se ha utilizado acetato sódico [$1-^{14}\text{C}$] (actividad específica, 58.1 mCi/mmol) suministrado por *The Radiochemical Centre, Amersham*. Mediante este precursor es posible seguir la biosíntesis de ácidos grasos, así como la formación de las

diferentes moléculas de lípidos acílicos, según la ubicación en las mismas de los ácidos grasos sintetizados.

2. Condiciones de incubación

Para la incorporación del presursor radioactivo, 2 g de polen maduro o germinado son suspendidos en 40 ml del medio óptimo de germinación, incubándose con 30 nmoles de acetato sódico-1-¹⁴C, a 27 °C, bajo constante burbujeo de aire descarbonatado y control de pH con KOH 2.5 mM.

Finalizado el tiempo de incubación (2 h y 30 min), se separa el medio por filtración a vacío, se somete el polen a sucesivos lavados con agua destilada a fin de eliminar la radioactividad no absorbida y se procede a la extracción de los lípidos totales y a la separación de las moléculas lipídicas, como se ha indicado previamente.

3. Medida de la radioactividad incorporada

3.a A lípidos totales

Una alícuota de la solución de lípidos totales se adiciona sobre 10 ml de una mezcla que contiene PPO (0.5 %) y dimetil POPOP (0.03 %) en tolueno, determinándose la radioactividad incorporada a dichos lípidos por centelleo líquido en un contador Packard Tri-Carb, modelo C2425.

3.b. A diferentes categorías lipídicas

Para determinar la radioactividad incorporada a cada categoría y molécula lipídica, las bandas de gel de sílice separadas por cromatografía en capa fina (Mangold, 1961 o Nichols, 1964) se eluyen de la sílice con cloroformo-metanol (2:1, v/v), midiéndose la radioactividad por centelleo líquido.

J. COMPONENTES HIDROSOLUBLES DEL POLEN

1. Extracción y análisis

Se ha seguido la técnica propuesta por Weimberg y col. (1981). Para ello, 2 g de polen maduro o germinado durante 24 h, se introducen en un erlenmeyer conteniendo 50 ml de agua destilada y 0.25 ml de tolueno. El conjunto se somete a agitación constante durante 3 h y 30 minutos en un baño mantenido a 25 °C, separándose el líquido de extracción por filtración a vacío. El proceso de extracción se repite otras dos veces, con tiempos de incubación de 2 y 20 h, respectivamente. Finalmente, se unen los tres extractos y se evaporan a sequedad en rotavapor a 40 °C. El residuo seco resultante se lleva a un volumen fijo de agua destilada y se congela a -20 °C hasta su análisis.

El análisis de los componentes hidrosolubles se ha realizado a partir de una alícuota del extracto acuoso anteriormente obtenido, llevada a sequedad y silada a 100°C durante 45 min con 0.1 ml de BSTFA en tubo cerrado a rosca. Los compuestos silados se determinan por cromatografía de gases, en las mismas condiciones indicadas para el análisis de los constituyentes polisacarídicos de la pared celular.

K. DOSIFICACION DE PROTEINAS

Las proteínas han sido dosificadas por el método de Bradford (1976). En aquellos casos en que las proteínas estaban contenidas en disolventes que interferían con la determinación anterior, se utilizó la técnica de Schaffner y Weissmann (1973).

V. RESULTADOS

A. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE GERMINACION Y DE LA ACTIVIDAD EXTRACTORA DE H⁺ EN EL POLEN

Para llevar a cabo el objetivo principal de este trabajo, el cual ha consistido en la determinación de algunos cambios bioquímicos implicados en la germinación del polen de olivo, ha sido necesario poner a punto un sistema de germinación *in vitro* capaz de proporcionar resultados satisfactorios.

1. Estudios preliminares

Los resultados preliminares obtenidos tras incubar los granos de polen en tubo de ensayo conteniendo el medio de germinación, metodología comúnmente utilizada en los estudios de germinación *in vitro* de diferentes tipos de polen, no revelaron, en ningún caso, porcentajes de germinación superiores al 1 %. Además, el pH del medio, inicialmente de 5.40, alcanzaba un valor de 6.0 después de 2 h de incubación, no llegando a recuperar su valor inicial.

2. Utilización de la técnica del *ageing* como inductor de la germinación

Los resultados preliminares revelaron la falta de operatividad, en polen de olivo, del sistema de germinación en tubo de ensayo. Ello, hizo necesario la puesta a punto de un modelo experimental que permitiese incrementar los bajos porcentajes de germinación conseguidos. Como se indica en el capítulo de Material y Métodos, el sistema utilizado, basado en la aplicación del concepto de *ageing*, ha hecho posible la obtención de buenos índices de germinación, regulando el pH y mediante el constante burbujeo de una corriente de aire en el medio de incubación en el cual el polen es mantenido en suspensión.

Es importante indicar que todos los resultados presentados en esta Memoria, han sido obtenidos tras germinar durante 24 h el polen de olivo en dicho dispositivo experimental, y que las condiciones de incubación utilizadas para investigar los cambios bioquímicos y fisiológicos propuestos

en el plan de trabajo han sido aquéllas que resultaron óptimas en cuanto a los porcentajes de germinación previamente alcanzados. Así mismo, mientras no se especifique otra composición, el medio basal de germinación ha estado constituido por una solución acuosa conteniendo sacarosa al 10 %, SO_4K_2 2 mM, SO_4Ca 0.2 mM, BO_3H_3 1.5 mM y ampicilina 1 mg/ml o tetraciclina 100 $\mu\text{g/ml}$.

3. Efecto del pH del medio de incubación

El estudio del efecto del pH del medio de incubación sobre la germinación del polen, ha requerido la determinación inicial de los porcentajes de germinación incubando el polen en un medio basal no tamponado, sometido o no a una regulación del pH a un valor constante, en nuestro caso de 5.50.

Los resultados presentados en la tabla 1 muestran como la adición del polen al medio de germinación provoca un rápido incremento de pH, desde un valor inicial de 5.40 hasta aproximadamente 6.40. Transcurrida 1 h de iniciado el proceso, se observa un descenso en el pH, el cual alcanza valores próximos a 5.50, no experimentando variaciones significativas a partir de este momento. Como puede observarse por los resultados obtenidos, los porcentajes de germinación difieren en función de que el pH haya sido mantenido o no a un valor de 5.50 durante todo el proceso. Así, cuando se mantiene el medio a dicho pH, la germinación comienza a ser significativa después de 1 h de iniciada la incubación. Por el contrario, cuando el pH no se regula, no sólo se produce un retraso en la germinación, sino que además, los porcentajes obtenidos en este segundo caso son muy inferiores a los observados en medios con pH fijado a 5.50.

Por otra parte, en la tabla 2 se muestra el efecto de distintos valores de pH sobre la germinación y actividad extractora de H^+ del polen, ésta última expresada en $\mu\text{equiv. de H}^+$ por gramo de peso fresco del material de partida. Al objeto de conseguir respuestas más significativas, estos resultados han sido obtenidos utilizando el medio óptimo de incubación, el cual estaba suplementado con promotores del crecimiento (ácido indolacético y fusicocina), cuyas respuestas específicas se indican más adelante. Los datos demuestran que las incubaciones realizadas a pH 4.5

y, sobre todo, a pH 6.5 inducen un fuerte descenso en el porcentaje de germinación, respecto al observado a pH 5.5, siendo, sin embargo, máxima la extrusión de H⁺ a pH 6.5.

TABLA 1

Efecto del pH del medio de incubación sobre la germinación del polen. Los resultados, expresados en porcentaje de germinación \pm DS, son media de tres experimentos independientes.

Tiempo (h)	a		b	
	pH	germinación (%)	pH	germinación (%)
0.00	5.40	n.d.	5.40	n.d.
0.01	6.40	"	6.42	"
0.08	5.75	"	6.42	"
0.16	5.55	"	6.41	"
0.50	"	tr	6.23	"
1.00	"	1.63 \pm 0.04	6.02	"
2.00	"	2.10 \pm 0.03	6.00	"
3.00	"	3.36 \pm 0.45	6.00	0.82 \pm 0.16
4.00	"	5.04 \pm 0.07	5.63	1.17 \pm 0.23
6.00	"	6.72 \pm 1.56	5.55	1.46 \pm 0.39
7.00	"	6.88 \pm 1.64	5.52	1.63 \pm 0.26
10.00	"	10.08 \pm 1.54	5.45	1.63 \pm 0.18
11.00	"	14.36 \pm 2.57	5.48	5.04 \pm 0.71
24.00	"	23.92 \pm 0.98	5.61	7.58 \pm 0.50

a Medio basal en el cual el pH es mantenido a 5.50 mediante adición de SO₄H₂ 2.5 mM o KOH 2.5 mM.

b Medio basal no sometido a regulación de pH.

En a y b, se hace pasar a través del medio de incubación aire decarbonatado (15 ml s⁻¹).

n.d.; no detectado; tr, < 0.5 %.

TABLA 2

Efecto del pH sobre la germinación y extrusión de H⁺ del polen. El medio de incubación contenía, en un volumen final de 20 ml, sacarosa al 10 %, 0.75 mM de BO₃H₃, 2mM de SO₄K₂, 1.25 μM de AIA, 0.25 μM de fusicocina y 100 μg ml⁻¹ de tetraciclina (medio óptimo de incubación). El pH de la solución fué mantenido a 4.50, 5.50 o 6.50 con 2.5 mM de SO₄H₂ o KOH. Los resultados, expresados como porcentaje de germinación (A) y como μeq. de protones extruidos por 1 g de peso fresco de polen durante 24 h de incubación (B), son media de dos experimentos independientes, que no difieren en más de un 10 % del valor medio. n.d., no detectado

Tiempo (h)	Valores de pH					
	4.50		5.50		6.50	
	A	B	A	B	A	B
1	5.00	n.d.	7.03	2.32	2.13	6.70
2	12.31	n.d.	17.00	8.93	3.05	20.11
3	18.05	n.d.	21.72	23.79	4.50	35.57
4	21.93	n.d.	26.15	31.29	6.45	45.34
5	25.16	n.d.	31.05	36.82	7.45	52.84
6	27.12	n.d.	37.56	40.57	10.12	60.00
7	29.84	n.d.	42.00	42.30	12.09	63.18
24	34.85	n.d.	62.14	42.80	17.28	65.25

4. Efecto de la concentración de CO₂

El efecto de la concentración de CO₂ en el medio sobre la capacidad de germinación se indica en la tabla 3. Estos resultados han sido obtenidos incubando el polen en el medio basal, sometido a un constante burbujeo de aire, de aire descarbonatado, o de aire enriquecido en CO₂, habiéndose mantenido en todos los casos el pH a un valor de 5.50, utilizando para ello tampón MES 50 mM o la adición continua y automática de SO₄H₂ o KOH 2.5 mM. Los resultados revelan que el mayor índice de germinación se obtenía cuando se hacía pasar aire a través del medio de incubación, mientras que el paso

de aire descarbonatado y, sobre todo, de aire enriquecido en CO₂ provocaba una disminución de la germinación.

TABLA 3

Efecto de la concentración de CO₂ en el medio de incubación sobre la germinación del polen. Los resultados, expresados en porcentaje de germinación \pm DS, son media de tres experimentos independientes. n.d., no detectado; tr, <0.5 %.

Tiempo (h)	a		b	c
	a ₁	a ₂		
0.00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0.01	"	"	"	"
0.08	"	"	"	"
0.16	"	"	"	"
0.50	tr	"	tr	"
1.00	1.63 \pm 0.04	"	4.16 \pm 0.43	tr
2.00	2.10 \pm 0.03	2.00 \pm 0.07	7.14 \pm 0.27	0.50 \pm 0.11
3.00	3.36 \pm 0.45	3.79 \pm 0.79	10.34 \pm 2.00	0.74 \pm 0.25
4.00	5.04 \pm 0.07	6.06 \pm 2.06	9.90 \pm 1.82	1.15 \pm 0.49
6.00	6.72 \pm 1.56	6.13 \pm 1.11	10.19 \pm 1.73	1.25 \pm 0.35
7.00	6.88 \pm 1.64	6.23 \pm 0.86	12.57 \pm 2.48	1.59 \pm 0.13
10.00	10.08 \pm 1.54	10.00 \pm 0.92	20.24 \pm 3.79	2.73 \pm 0.28
11.00	14.36 \pm 2.57	14.28 \pm 2.14	25.30 \pm 4.30	3.12 \pm 0.41
24.00	23.92 \pm 0.98	21.09 \pm 1.26	32.22 \pm 1.32	3.51 \pm 0.18

a Incubación del polen en medio basal no tamponado (a₁) o tamponado (a₂), a través del cual se hace pasar aire descarbonatado (15 ml s⁻¹).

b Incubación del polen en medio basal no tamponado al que se hace pasar una corriente de aire (15 ml s⁻¹).

c Incubación del polen en medio basal tamponado al que se hace pasar 7.5 ml s⁻¹ de aire más 7.5 ml s⁻¹ de CO₂ al 99.5 %.

En a₁ y b, el pH fué mantenido a 5.50 mediante adición de SO₄H₂ o KOH.

5. Acción de promotores e inhibidores del crecimiento

Dos promotores del crecimiento (ácido indolacético y fusicocina) y un inhibidor específico de la H⁺-ATPasa de plasmalema (ortovanadato) han sido utilizados en nuestro trabajo para investigar la relación entre la germinación y la actividad extractora de H⁺ del polen. Los porcentajes de germinación y la actividad extractora de H⁺, expresada en μ equiv. de H⁺ por gramo de peso fresco del material de partida, tras 3, 7 y 24 h de incubado el polen en el medio basal conteniendo diferentes concentraciones de AIA y de fusicocina se muestran en la tabla 4 y figura 5.

TABLA 4

Efecto del ácido indolacético (AIA) y la fusicocina (FS) sobre la germinación y extrusión de H⁺ del polen. Estos promotores del crecimiento eran adicionados a distintas concentraciones al medio basal, manteniéndose el pH del mismo a 5.50 con KOH 2.5 mM. Los resultados, expresados como porcentaje de germinación y μ eq. de protones extruidos por un gramo de peso fresco de polen después de 3, 7 y 24 h de incubación, son la media de tres experimentos independientes, que no difieren en más de un 8 % del valor medio.

Medio de incubación	Germinación (%)			Extrusión de H ⁺ (μ eq. H ⁺ /g de peso fresco)		
	3 h	7 h	24 h	3 h	7 h	24 h
Basal	3,36	6,88	23,92	0,60	1,25	2,15
+ 1,25 μ M AIA	9,13	17,34	26,50	0,58	2,07	2,32
+ 2,50 μ M AIA	8,50	15,08	26,13	0,23	1,17	2,26
+ 10,00 μ M AIA	7,90	9,00	10,02	1,64	6,41	8,23
+ 0,25 μ M FS	19,05	38,09	44,85	12,12	24,08	26,41
+ 0,50 μ M FS	23,10	38,36	41,89	12,46	24,96	26,68
+ 1,25 μ M AIA + 0,25 μ M FS	26,54	44,06	50,44	12,98	26,37	27,86
+ 1,25 μ M AIA + 0,25 μ M FS - 2 mM SD ₄ K ₂	4,18	9,79	15,25	0,20	0,64	1,04

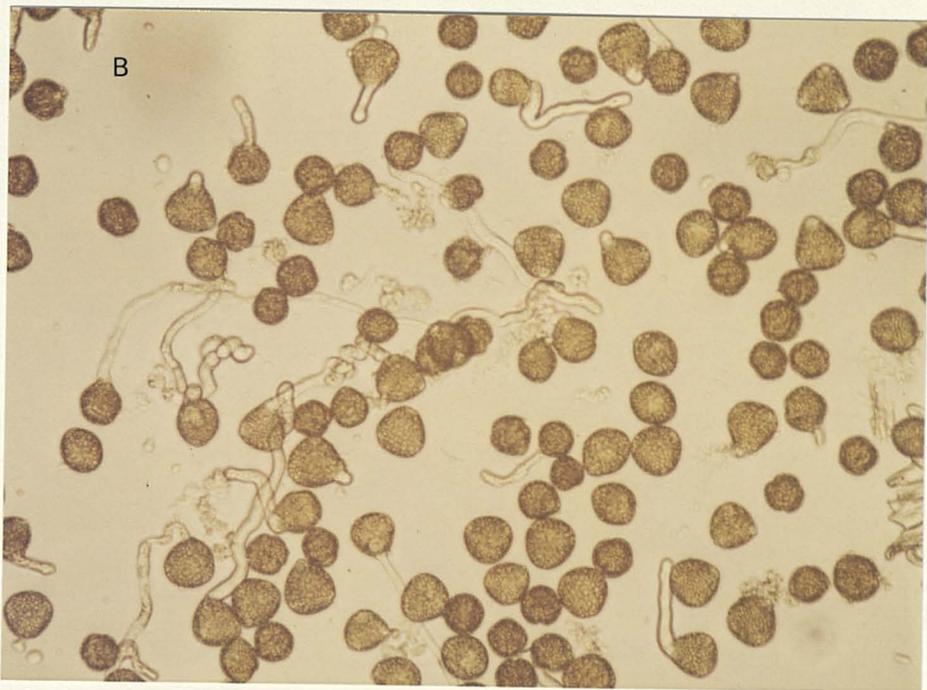
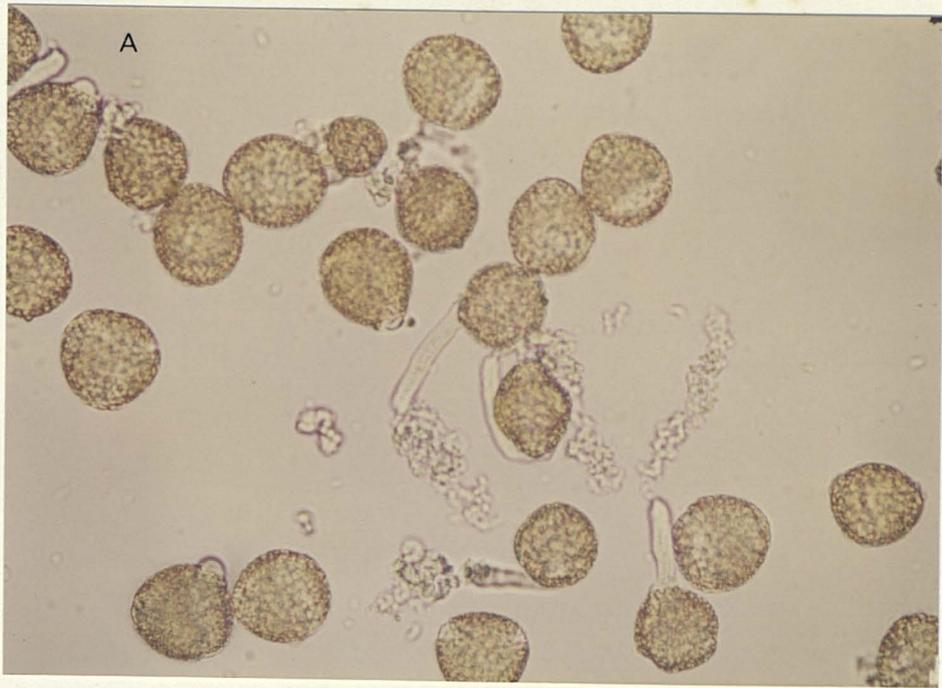


Figura 5. Observación al microscopio óptico de la inhibición de la germinación por el ácido indolacético, tras mantener incubado el polen a pH 5.50 durante 1 h (A, $\times 400$) o 4 h (B, $\times 200$) en un medio de cultivo constituido por sacarosa al 10 %, 2.0 mM de SO_4K_2 , 0.2 mM de SO_4Ca , 1.5 mM de BO_3H_3 , 0.25 μM de fusicocina, 100 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ de tetraciclina y 10 μM de AIA.

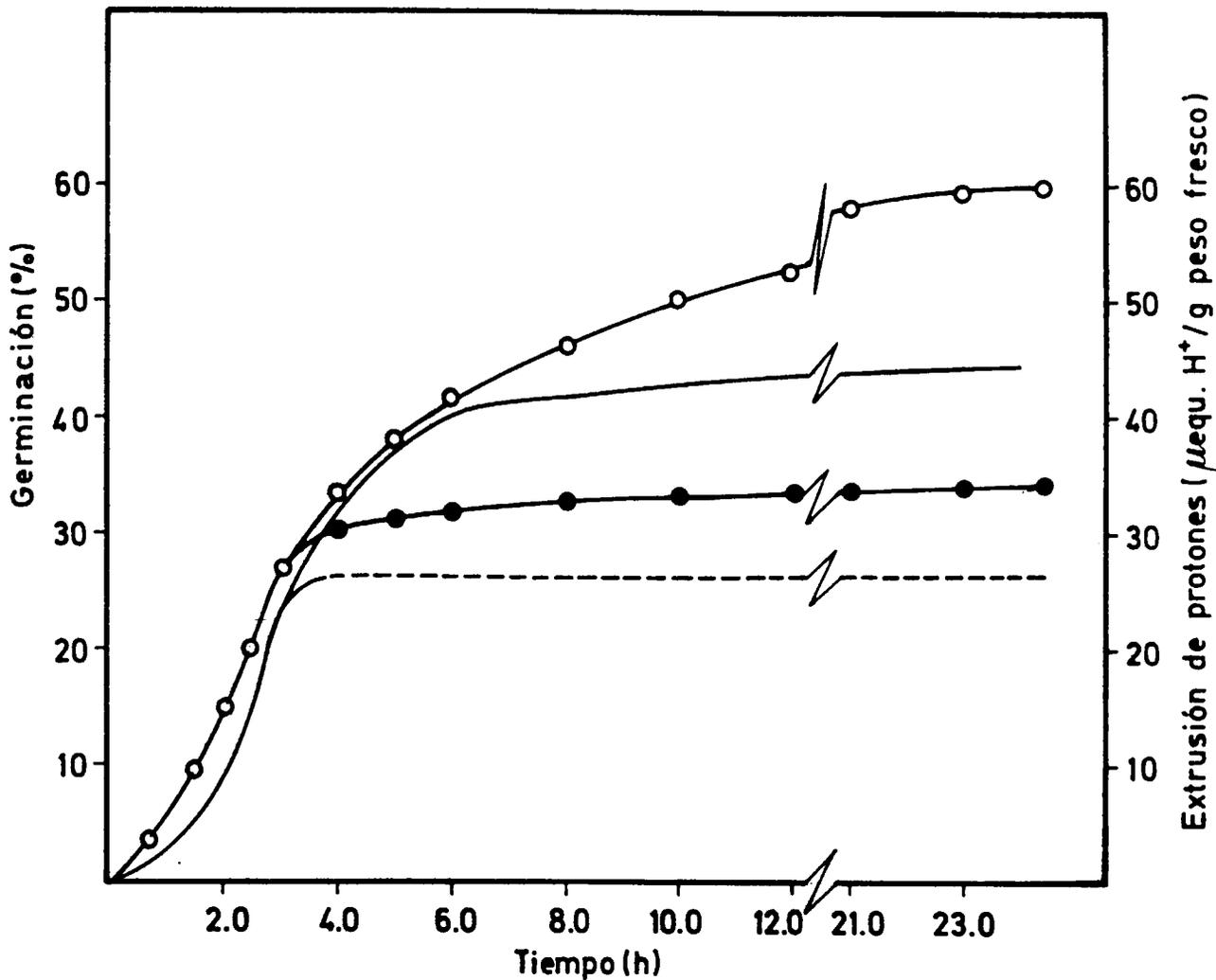


Figura 6. Capacidad de germinación y extrusión de H^+ del polen de olivo incubado en el medio óptimo de cultivo (ver apartado A.6. de Resultados) en ausencia y en presencia de vanadato (1 mM) adicionado después de 3 h de iniciada la incubación. Germinación en ausencia de vanadato (○); germinación en presencia de vanadato (●); extrusión de H^+ en presencia de vanadato (- - -); extrusión de H^+ en ausencia de vanadato (—).

Bajas concentraciones de AIA en el medio de germinación (1.25 o 2.50 μM) inducen un aumento en la germinación, sobre todo, en las 7 primeras horas del proceso, no difiriendo la tasa de germinación obtenida a las 24 h de la alcanzada en ausencia de AIA. Así mismo, una concentración de 10 μM en AIA tiene un efecto inhibitorio sobre la germinación del polen, habiéndose podido concluir a partir de las observaciones realizadas al microscopio óptico, que a esta concentración de AIA se induce la rotura de los tubos polínicos.

Por otra parte, la incubación del polen en medios suplementados con 0.25 o 0.5 μM de fusicocina supone un significativo incremento tanto de la actividad extractora de H^+ , como del porcentaje de germinación. Dicha respuesta, es aún más importante cuando se incuba el polen con fusicocina 0.25 μM + AIA 1.25 μM .

En la figura 6, donde se representa puntualmente en el tiempo la germinación y extrusión de H^+ del polen en condiciones óptimas de incubación, es posible observar cómo concentraciones 1 mM de ortovanadato inhiben la germinación del polen y el bombeo de H^+ .

6. Influencia de los iones minerales

El efecto de los iones minerales sobre la germinación y actividad extractora de H^+ , se determinó utilizando el medio basal de incubación suplementado con AIA (1.25 μM) y fusicocina (0.25 μM). La exclusión de K^+ del medio de germinación del polen, provoca una importante disminución en los porcentajes de germinación y en la actividad bombeadora de H^+ (tabla 4).

La tabla 5 incluye los resultados sobre el efecto de distintas concentraciones de boro (adicionado como BO_3H_3) en estos procesos. Entre las concentraciones de boro ensayadas, 0.75 mM de BO_3H_3 proporciona los mayores porcentajes de germinación y la más elevada actividad extractora de H^+ . Por otra parte, tanto la ausencia de este microelemento en el medio de incubación, como concentraciones de 1.50 y 6.00 mM de BO_3H_3 , provocan una clara inhibición.

En cuanto al efecto del calcio, en la tabla 5 se muestran los porcentajes de germinación y los μmoles de H^+ extruidos al medio en función de la concentración de este elemento. La adición de Ca^{++} al medio de incubación, el cual contenía 0.15 o 0.75 mM de BO_3H_3 , suponía siempre una disminución de la germinación y del bombeo de H^+ , de lo que parece deducirse que el efecto inhibitor del calcio puede estar ligado a la concentración de boro, ya que cuanto menor es la concentración de boro en el medio, mayor es la inhibición ejercida por el Ca^{++} .

TABLA 5

Efecto del boro y del calcio sobre la capacidad de germinación y extrusión de H^+ del polen. El medio de incubación contenía, en un volumen final de 20 ml, sacarosa al 10 %, 2.0 mM de SO_4K_2 , 1.25 μM de AIA, 0.25 de μM fusicocina y 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de tetraciclina (medio *standard*). El pH de la solución fué mantenido a 5.50 con KOH 2.5 mM. Los resultados, expresados como porcentaje de germinación y como $\mu\text{eq.}$ de protones extruidos por un gramo de peso fresco de polen después de 3, 7 y 24 h de incubación, son la media de tres experimentos independientes, que no difieren en más de un 10 % del valor medio.

Medio de incubación	Germinación (%)			Extrusión de H^+ ($\mu\text{eq. H}^+/\text{g}$ de peso fresco)		
	3 h	7 h	24 h	3 h	7 h	24 h
<i>Standard</i>	7,09	11,80	13,00	0,70	1,48	1,48
+ 0,15 mM BO_3H_3	20,80	36,51	53,40	20,40	34,50	36,02
+ 0,75 mM BO_3H_3	21,72	42,00	62,14	23,79	42,00	42,30
+ 1,50 mM BO_3H_3	20,03	42,74	47,66	14,22	30,31	32,03
+ 6,00 mM BO_3H_3	23,21	29,44	32,51	11,40	22,46	22,46
+ 0,15 mM BO_3H_3 + 50 μM SO_4Ca	20,85	42,91	44,00	5,23	14,45	14,54
+ 0,15 mM BO_3H_3 + 200 μM SO_4Ca	4,30	13,11	16,89	0	23,33	26,49
+ 0,75 mM BO_3H_3 + 50 μM SO_4Ca	18,52	32,62	39,92	15,96	27,40	27,40
+ 0,75 mM BO_3H_3 + 200 μM SO_4Ca	20,70	31,64	37,80	9,23	17,02	17,02
+ 0,75 mM BO_3H_3 + 400 μM SO_4Ca	23,11	35,80	41,78	13,56	22,11	22,11

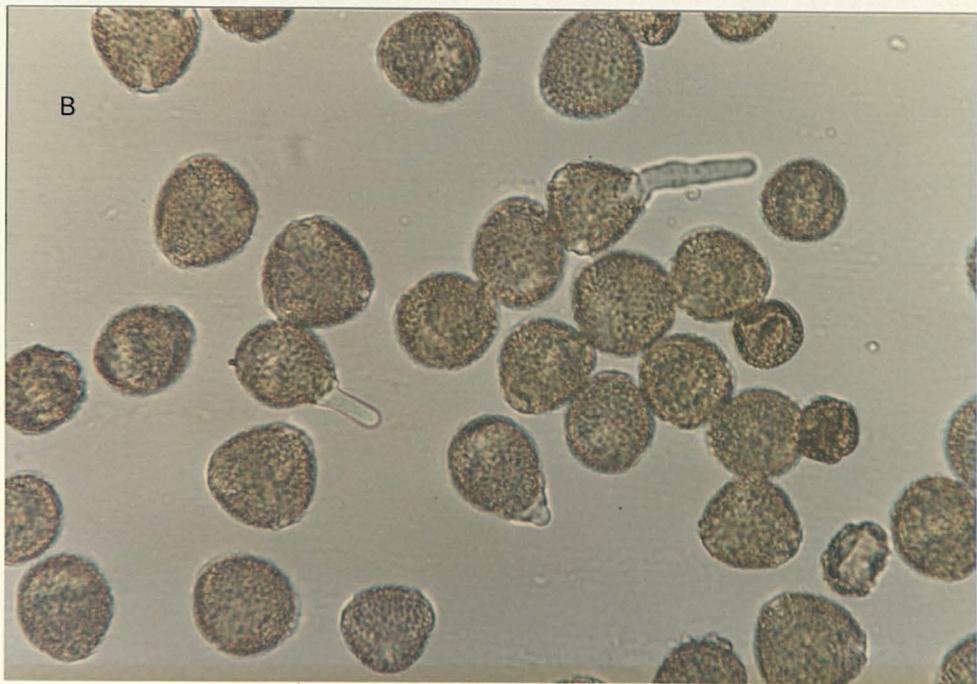
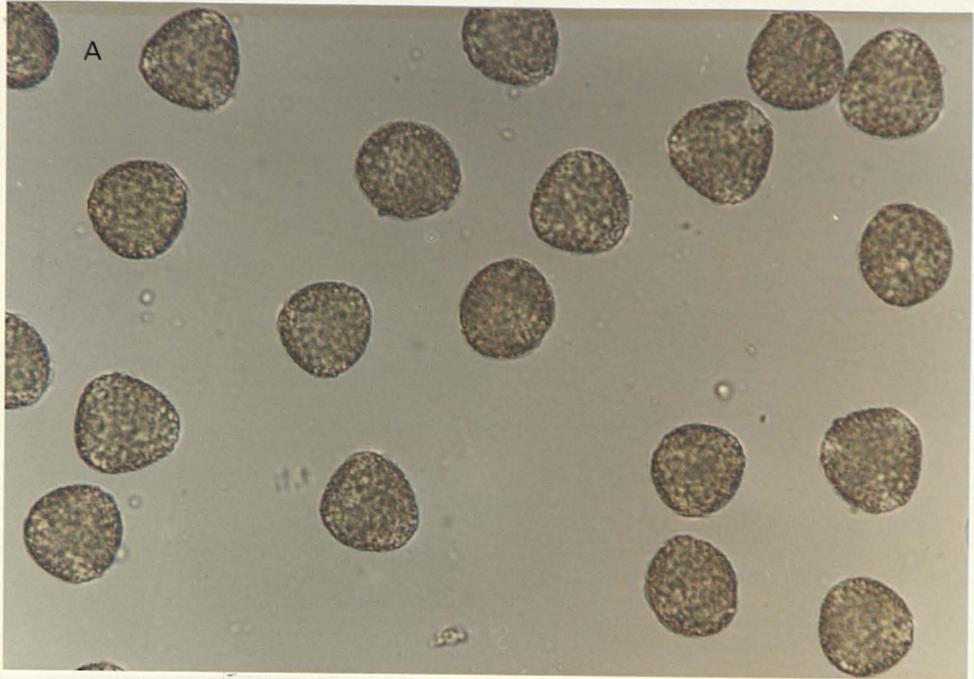


Figura 7. Observación al microscopio óptico del polen germinado en el medio óptimo de cultivo (ver apartado A.6 de Resultados) al inicio (A, $\times 400$) y después de 1 h de incubación (B, $\times 400$).

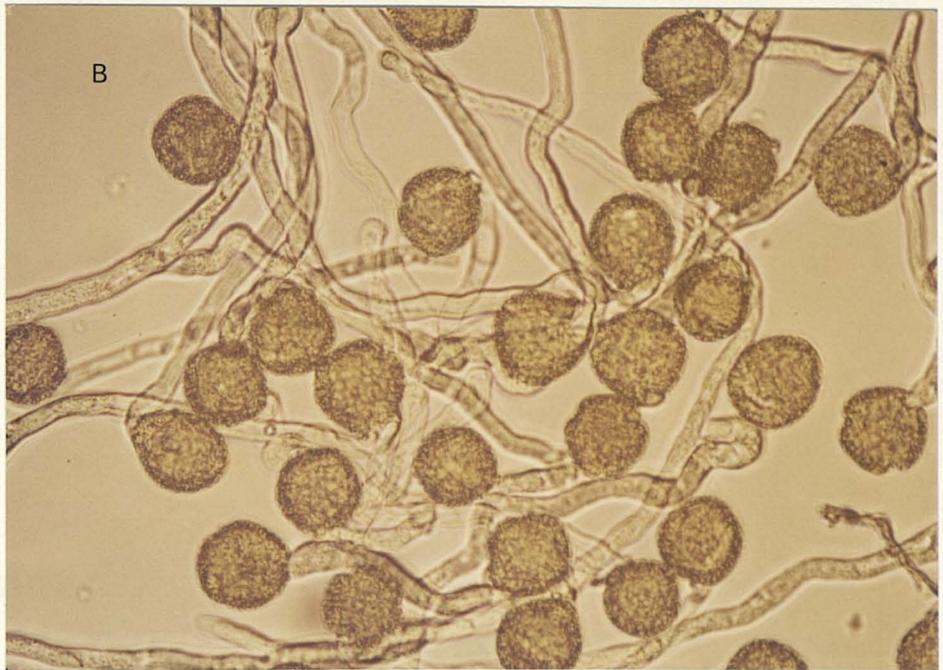


Figura 8. Observación al microscopio óptico del polen germinado en el medio óptimo de cultivo (ver apartado A.6. de Resultados) durante 4 h (A, $\times 400$) y 24 h de incubación (B, $\times 400$).

Los resultados obtenidos al estudiar la capacidad de germinación y la actividad extractora de H⁺, revelaron una optimización de ambos procesos cuando el polen era incubado en medios constituidos por sacarosa al 10 %, 2.0 mM de SO₄K₂, 0.75 mM de BO₃H₃, 1.25 μM de AIA, 0.25 μM de fusicocina y 100 μg / ml de tetraciclina, siendo sometido dicho medio a regulación del pH mediante la adición continua y automática de SO₄H₂ o KOH 2.5 mM (figura 7 y 8). Es importante significar que todos los resultados presentados en esta Memoria en relación a los componentes bioquímicos del polen germinado, se han obtenido después de incubar el polen durante 24 h en las condiciones que se han descrito como óptimas.

B. COMPONENTES BIOQUIMICOS DE LA PARED

1. Aislamiento y purificación de la pared

En la tabla 6 se muestra el contenido en proteínas de los extractos correspondientes a los diferentes lavados a que se han sometido las paredes del polen maduro y germinado en el proceso de purificación. Los resultados, expresados en miligramos de proteínas por gramo de peso fresco, indican una eliminación de contaminantes citoplasmáticos y, por consiguiente, una progresiva purificación de dichas paredes.

TABLA 6

Contenido en proteínas de los extractos procedentes de los diferentes lavados a que se someten las paredes celulares del polen maduro y germinado hasta llegar a su purificación. Los resultados son la media de tres experimentos independientes ± DS. (xn)= número de lavados.

	<u>Maduro</u>	<u>Germinado</u>
Proteínas de los extractos los diferentes lavados con:		
- MES 0.05 M, pH 6.0 (x4)	13.7 ± 2.0	9.4 ± 0.7
- Agua destilada (x2)	0.4 ± 0.1	1.9 ± 0.3
- Tritón X-100 al 1 % (x1)	3.8 ± 1.0	0.7 ± 0.2
- Agua destilada (x1)	1.8 ± 0.4	2.5 ± 0.6
- Tritón X-100 al 1 % (x1)	2.4 ± 0.3	0.4 ± 0.1
- Agua destilada (x9)	2.6 ± 0.7	3.1 ± 0.5
Total	24.7	18.0

2. Componentes glucídicos

La germinación implica un incremento en el contenido de las distintas fracciones polisacarídicas aisladas, fundamentalmente de aquellas constituidas por hemicelulosas, fracciones DM, HA y HB, la última de las cuales se identifica con los polisacáridos hemicelulósicos no presentes en el polen maduro (tablas 7 y 8). En cuanto a la composición en monosacáridos, las fracciones hemicelulósicas están constituidas mayoritariamente por arabinosa, en el polen maduro, y por glucosa, en el polen germinado; así mismo, la germinación induce un incremento en el contenido de ramnosa y de xilosa de dichas fracciones.

TABLA 7

Composición en azúcares de diferentes fracciones polisacarídicas de la pared del polen maduro. Los resultados, expresados en μg de azúcar por gramo de peso seco de pared y en porcentaje del total de azúcares, son la media de tres experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio. n.d., no detectado; DM, hemicelulosas extraíbles con DMSO; OX, polisacáridos pécticos extraíbles con oxalato amónico; HA, hemicelulosas extraíbles con KOH.

Azúcar	Fracción					
	DM		OX		HA	
	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%
Arabinosa	401.0	64.2	167.8	44.7	28.4	26.7
Ramnosa	5.0	0.8	33.8	9.0	8.7	8.2
Xilos	20.6	3.3	7.5	2.0	6.3	5.9
Manosa	33.7	5.4	26.3	7.0	14.1	13.3
Galactosa	35.6	5.7	22.1	5.9	9.1	8.6
Glucosa	114.3	18.3	19.9	5.3	39.6	37.3
Ac. urónicos	14.4	2.3	98.0	26.1	n.d.	-
Total	624.6		375.4		106.3	

Por otra parte, mientras que la manosa y la galactosa representan conjuntamente en el polen maduro el 11 % de la fracción hemicelulósica DM y el 21 % de la HA, estos monosacáridos no son detectables tras 24 h de germinación. Es también significativa la localización casi exclusiva de los ácidos urónicos a nivel de la fracción de sustancias pécticas (OX) de la pared del polen maduro, y, sobre todo, del germinado. Además de ácidos urónicos, la fracción de polisacáridos pécticos del polen maduro contiene más de un 40 % de arabinosa, cuyo contenido al igual que el de ramnosa, xilosa y glucosa, representa sólo un 13 % del polen germinado.

TABLA 8

Composición en azúcares de diferentes fracciones polisacarídicas de la pared del polen germinado. Los resultados, expresados en μg por gramo de peso seco de pared y en porcentaje del contenido total de azúcares, son la media de tres experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio.

Azúcar	Fracción							
	DM		OX		HA		HB	
	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%
Arabinosa	1168.7	15.1	76.3	12.7	751.4	18.0	5559.5	25.5
Ramnosa	232.2	3.0	95.0	15.8	718.0	17.2	2986.9	13.7
Xilosa	750.8	9.7	65.5	10.9	718.1	17.2	3248.5	14.9
Manosa	n.d.	-	7.2	1.2	n.d.	-	n.d.	-
Galactosa	n.d.	-	47.5	7.9	n.d.	-	4251.4	19.5
Glucosa	5588.3	72.2	89.1	14.8	1886.9	45.2	5755.8	26.4
Ac. urónicos	n.d.	-	220.6	53.2	100.2	2.4	n.d.	-
Total	7740.0		601.2		4174.6		21802.1	

n.d., no detectado

DM, hemicelulosas extraíbles con DMSO

OX, polisacáridos pécticos extraíbles con oxalato amónico

HA y HB, hemicelulosas extraíbles con KOH

3. Componentes protéicos

En las paredes purificadas a partir del polen maduro y germinado, la mayor parte de las proteínas son extraíbles con alcali, no observándose una diferencia importante en el contenido total entre ambos orígenes (tabla 9).

La composición y contenido en proteínas de las paredes celulares purificadas del polen maduro y germinado, estimada a partir de sus aminoácidos constituyentes, se indica en la tabla 10. Dichas proteínas representan, en función del peso seco de pared, el 2.7 y 3.8 % en el polen maduro y germinado, respectivamente, siendo su composición en aminoácidos muy similar en ambos orígenes. Destaca el contenido de leucina, serina, treonina, alanina y, sobre todo, ácido aspártico y prolina, así como el bajo nivel de metionina e hidroxiprolina.

Por otra parte, el análisis de aminoácidos de las proteínas extraídas con ClNa y con KOH 1 M ha puesto de manifiesto, como hecho diferenciable más significativo, un mayor contenido de lisina en las proteínas de pared extraíbles con ClNa (tablas 11 y 12).

TABLA 9

Contenido en proteínas de los extractos salino y alcalinos de paredes purificadas del polen maduro y germinado. Los resultados, expresados en mg de proteína por g de pared, son la media de tres experimentos independientes \pm DS.

Extracto	mg / g	
	Maduro	Germinado
ClNa, 1M		
0 °C, 6h	1.2 \pm 0.2	0.5 \pm 0.1
KOH, 1 M		
0 °C, 3 h	3.3 \pm 0.8	4.3 \pm 1.0
20 °C, 3 h	2.2 \pm 0.4	2.3 \pm 0.2
20 °C, 12 h	2.6 \pm 0.4	2.8 \pm 0.5
Total	9.3	9.9

TABLA 10

Composición y contenido en aminoácidos de las proteínas totales de la pared del polen maduro y germinado. Los resultados, expresados en μ moles por gramo de peso seco de pared y en porcentajes respecto al contenido total de aminoácidos, son la media (\pm DS) de tres experimentos independientes.

Aminoácido	Porcentaje		μ mol / g	
	Maduro	Germinado	Maduro	Germinado
Ac. Aspártico	8.6	10.0	20.7 \pm 1.7	29.6 \pm 3.7
Ac. Glutámico	5.6	5.4	13.5 \pm 2.4	16.0 \pm 2.4
Hidroxiprolina	0.5	1.0	1.2 \pm 0.2	3.0 \pm 0.3
Serina	7.1	7.8	16.9 \pm 0.5	23.1 \pm 1.2
Asparragina	3.8	4.5	9.2 \pm 1.6	13.3 \pm 2.0
Glicina	4.5	4.1	10.8 \pm 1.9	12.1 \pm 1.8
Histidina	3.0	4.0	7.2 \pm 0.5	11.8 \pm 1.3
Treonina	6.6	7.0	15.7 \pm 0.9	20.7 \pm 2.1
Alanina	7.7	6.9	18.3 \pm 1.9	20.4 \pm 3.0
Arginina	5.3	5.5	12.8 \pm 0.9	16.3 \pm 1.2
Prolina	10.6	10.8	24.9 \pm 1.8	31.8 \pm 3.2
Tirosina	2.2	2.5	5.3 \pm 0.6	7.4 \pm 1.0
Valina	5.7	6.2	13.7 \pm 1.2	18.3 \pm 1.2
Metionina	0.7	1.5	1.7 \pm 0.2	4.4 \pm 0.5
Cisteína	5.8	0.9	14.0 \pm 1.4	2.7 \pm 0.3
Isoleucina	5.5	5.9	13.3 \pm 0.7	17.5 \pm 1.1
Leucina	9.0	9.3	21.2 \pm 0.9	27.5 \pm 2.3
Fenilalanina	3.7	3.2	8.9 \pm 1.2	9.5 \pm 1.0
Lisina	4.9	3.6	11.8 \pm 1.1	10.6 \pm 1.2
Total			241.1	296.0

TABLA 11

Composición en aminoácidos de proteínas de la pared del polen maduro y germinado extraíbles con ClNa. Los resultados se expresan en porcentajes respecto al contenido total en aminoácidos y son la media de dos experimentos que no difieren en más de un 10 % del valor medio.

Aminoácido	Porcentaje	
	Maduro	Germinado
Ac. Aspártico	7.8	7.5
Ac. Glutámico	5.0	4.3
Hidroxiprolina	1.4	2.3
Serina	7.8	7.7
Asparragina	-	-
Glicina	4.8	4.4
Histidina	1.1	0.9
Treonina	8.0	7.1
Alanina	7.7	6.2
Arginina	4.6	3.3
Prolina	12.1	12.8
Tirosina	1.1	1.3
Valina	3.7	3.6
Metionina	1.6	2.6
Cisteína	-	-
Isoleucina	3.6	4.1
Leucina	5.1	4.7
Fenilalanina	1.5	1.8
Lisina	22.9	25.5

TABLA 12

Composición en aminoácidos de proteínas de la pared del polen maduro y germinado extraíbles con KOH. Los resultados, expresados en porcentajes respecto al contenido total de aminoácidos, son la media de dos experimentos independientes que no difieren en más de un 10 % del valor medio.

Aminoácido	Porcentaje	
	Maduro	Germinado
Ac. Aspártico	8.8	7.7
Ac. Glutámico	7.7	8.6
Hidroxiprolina	3.0	1.3
Serina	9.3	7.9
Asparragina	-	-
Glicina	5.4	4.4
Histidina	1.9	2.1
Treonina	7.2	5.8
Alanina	7.7	13.0
Arginina	5.0	1.2
Prolina	12.8	9.6
Tirosina	2.6	3.6
Valina	6.3	7.7
Metionina	2.5	2.2
Cisteína	3.1	-
Isoleucina	4.0	7.0
Leucina	4.6	9.4
Fenilalanina	1.8	1.8
Lisina	6.1	6.7

C. MODIFICACIONES CONCERNIENTES A LOS LÍPIDOS DE RESERVA Y DE MEMBRANA EN EL POLEN MADURO Y GERMINADO

Los resultados derivados de las observaciones citológicas efectuadas por diferentes autores en polen de diversos orígenes a lo largo de la germinación y crecimiento del tubo polínico, han sugerido la existencia de una biogénesis de membranas intracelulares y la degradación de la reserva (lipídica o azucarada) acumulada durante la maduración.

Para estudiar las transformaciones bioquímicas asociadas a las membranas del polen de olivo y, teniendo en cuenta, que en este origen los constituyentes de reserva son lípidos neutros, en este trabajo hemos seguido cuantitativamente los cambios en los componentes lipídicos del polen mediante técnicas bioquímicas complementarias

1. Concentración en lípidos del polen

El polen de olivo es relativamente pobre en lípidos; la concentración en materia grasa representa, aproximadamente, el 1.4 % en polen maduro y el 1.1 % en polen germinado, lo que equivale a 14.0 y 11.0 mg, respectivamente, de lípidos por gramo de peso fresco (tabla 13). Teniendo en cuenta la enorme diferencia en el grado de hidratación entre el polen maduro y germinado, en el caso del polen germinado, los resultados se han expresado en relación al peso fresco del material de partida. Ello, facilita la interpretación de los resultados al permitir comparar los datos obtenidos en el polen germinado con los obtenidos en el grano maduro.

1.a. *Diferentes categorías de fosfolípidos, lípidos neutros y esteroides libres*

Los lípidos neutros constituyen la clase lipídica más importante del polen maduro (74.8 %) y tras 24 h de germinación (67.7 %). Los fosfolípidos, componentes esenciales de las membranas celulares, también son muy abundantes, detectándose, aunque en mucha menor proporción la presencia de galactolípidos (tabla 13). En esta misma tabla se indica la importancia relativa de las distintas moléculas de fosfolípidos y lípidos neutros, aisladas mediante técnicas de cromatografía en capa fina. Así, los fosfolípidos porcentualmente importantes son la fosfatidiletanolamina y, sobre todo, la fosfatidilcolina, siendo componentes relativamente minoritarios los fosfatidilinositoides y el ácido fosfatídico. La germinación induce un aumento de los fosfolípidos (excepto fosfatidilcolina) y de los diacilgliceroles, al tiempo que una disminución en triacilgliceroles y, sobre todo, de ácidos grasos libres.

TABLA 13

Composición y contenido en lípidos del polen maduro y germinado. Los resultados, expresados en μg por g de peso fresco y en porcentaje respecto al total de moléculas lipídicas, son media (\pm DS) de cuatro experimentos independientes.

Molécula	%		$\mu\text{g} / \text{g}$	
	Maduro	Germinado	Maduro	Germinado
FI	2.4	3.8	307.3 \pm 11.8	400.2 \pm 31.6
FC	21.3	21.6	2672.2 \pm 308.4	2275.2 \pm 252.7
FE	5.6	7.0	712.4 \pm 98.7	737.3 \pm 115.8
AF	1.6	3.5	209.5 \pm 39.5	368.6 \pm 5.2
MG	5.4	7.2	684.4 \pm 109.1	758.4 \pm 136.9
DG	16.3	24.6	2053.4 \pm 176.8	2591.1 \pm 379.2
AGL	25.7	15.6	3226.9 \pm 146.5	1643.2 \pm 210.6
TG	18.8	13.6	2374.7 \pm 111.6	1432.5 \pm 200.1
Est	8.6	6.7	1188.2 \pm 124.1	752.2 \pm 55.3
GL	2.9	3.1	363.2 \pm 55.9	326.5 \pm 73.7
Total			13792.2	11285.2

La composición y contenido en esteroides libres del polen se muestra en la tabla 14. Comparativamente a la cantidad de fosfolípidos y lípidos neutros saponificables, estos esteroides son componentes minoritarios del polen maduro y germinado, provocando la germinación una disminución en el contenido de los diferentes esteroides que constituyen esta fracción y siendo el β -sitosterol, tanto en el polen maduro como en el germinado, el componente mayoritario. Por otra parte, el análisis de los porcentajes relativos de estas moléculas, revela que la germinación induce una disminución de los porcentajes de colesterol y estigmasterol y un leve incremento de los de campesterol y β -sitosterol.

TABLA 14

Composición y contenido en esteroides libres del polen maduro y germinado. Los resultados, expresados en μg por g de peso fresco y en porcentaje respecto al contenido total de esteroides, son media de tres experimentos independientes ($\pm\text{DS}$). tr, $< 5 \mu\text{g} / \text{g}$.

Molécula	%		$\mu\text{g} / \text{g}$	
	Maduro	Germinado	Maduro	Germinado
colesterol	3.5	2.2	41.9 \pm 15.6	16.4 \pm 1.8
brassicasterol	-	-	tr	tr
campesterol	6.1	6.6	72.2 \pm 4.3	49.8 \pm 11.1
stigmasterol	5.8	2.2	68.9 \pm 2.6	16.2 \pm 3.0
β -sitosterol	84.6	89.0	1005.2 \pm 42.5	669.8 \pm 6.6

1.b. *Composición y contenido en ácidos grasos*

1.b.1. *De lípidos totales*

En los lípidos del polen maduro y germinado, los ácidos grasos más abundantes son los ácidos laurico, mirístico y, sobre todo, palmítico, siendo el ácido linoleico (diinsaturado) el más importante entre los ácidos grasos insaturados. También cabe destacar la presencia de los ácidos estearico (saturado), oléico (monoinsaturado) y linolénico (triinsaturado). La composición en ácidos grasos del polen germinado es muy similar a la del polen maduro, detectándose, únicamente, una leve disminución en los porcentajes de los ácidos laurico y mirístico, así como un aumento en el de ácido linoléico (tabla 15).

1.b.2. *De diferentes categorías lipídicas*

Los fosfolípidos del polen maduro y germinado son particularmente ricos en ácidos linoleico y palmítico, los cuales representan normalmente más del 70 % del total de ácidos grasos (tablas 16 y 17). Entre los diferentes fosfolípidos, conviene distinguir dos grandes grupos: los de

carácter básico o neutro, tales como fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina, que contienen importantes proporciones de ácido linoléico y linolénico, y los fosfolípidos ácidos, como el fosfatidilinositol y ácido fosfatídico, que son más saturados. Así mismo, mientras que los triacilgliceroles tienen una composición más parecida a los fosfolípidos y galactolípidos, los monoacilgliceroles, diacilgliceroles y ácidos grasos libres muestran un mayor grado de saturación, al tiempo que una disminución en ácidos grasos poliinsaturados.

Cuando se compara la composición en ácidos grasos de los diferentes lípidos analizados en polen maduro y germinado, se observa que la germinación induce una disminución en el porcentaje de los ácidos laurico y mirístico a nivel de mono-, diacilgliceroles y ácidos grasos libres, al tiempo que un aumento en los porcentajes de ácido linoléico y linolénico.

TABLA 15

Composición y contenido en ácidos grasos de lípidos totales de polen maduro y germinado. Los resultados, expresados en μg por g de peso fresco y en porcentajes respecto al total de ácidos grasos, son media (\pm DS) de cuatro experimentos independientes.

Ácidos grasos	% de ácidos grasos		μg / g peso fresco	
	Maduro	Germinado	Maduro	Germinado
12:0	12.0	9.1	1240.3 \pm 16.5	747.6 \pm 82.2
14:0	16.0	13.0	1653.8 \pm 39.3	1068.1 \pm 87.1
16:0	35.8	36.4	3700.3 \pm 106.5	2990.7 \pm 59.1
18:0	2.2	2.2	227.4 \pm 31.3	180.7 \pm 16.4
18:1	3.7	4.3	382.4 \pm 40.2	353.3 \pm 12.1
18:2	21.0	25.3	2170.6 \pm 126.1	2078.7 \pm 42.8
18:3	9.3	9.7	961.2 \pm 75.4	796.0 \pm 15.1
Total			10366.0	8216.0

TABLA 16

Composición en ácidos grasos de diferentes lípidos del polen maduro. Los resultados, expresados como porcentaje de ácidos grasos, son la media de cuatro experimentos independientes (\pm DS). n.d., no detectado; tr, < 0.5 %.

Lípidos	Porcentaje de ácidos grasos						
	12:0	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
FI	n.d.	1.4 \pm 0.1	48.3 \pm 4.8	3.6 \pm 0.2	5.3 \pm 0.5	29.0 \pm 4.1	14.1 \pm 2.6
FC	n.d.	tr	29.6 \pm 1.7	2.7 \pm 0.2	4.1 \pm 0.5	45.4 \pm 1.9	18.2 \pm 1.8
FE	n.d.	1.7 \pm 0.1	26.9 \pm 1.0	2.9 \pm 0.1	3.6 \pm 0.8	48.6 \pm 2.7	16.3 \pm 2.9
FA	n.d.	5.3 \pm 0.3	25.5 \pm 2.4	3.1 \pm 0.1	5.2 \pm 1.5	47.4 \pm 9.8	13.5 \pm 6.1
GL	2.9 \pm 0.2	5.5 \pm 0.9	43.6 \pm 5.1	3.8 \pm 0.1	4.4 \pm 0.7	24.5 \pm 0.7	15.3 \pm 3.0
MG	18.2 \pm 3.1	24.8 \pm 2.1	38.2 \pm 2.8	1.3 \pm 0.3	3.3 \pm 0.3	9.9 \pm 1.6	4.3 \pm 0.6
DG	17.9 \pm 1.9	24.6 \pm 2.6	39.5 \pm 5.3	1.6 \pm 0.2	3.1 \pm 0.3	6.6 \pm 1.0	6.7 \pm 0.9
AGL	27.0 \pm 2.1	24.0 \pm 1.3	34.5 \pm 1.8	1.0 \pm 0.1	2.6 \pm 0.5	7.7 \pm 1.7	3.2 \pm 0.7
TG	1.9 \pm 0.2	2.9 \pm 0.5	36.5 \pm 3.2	3.0 \pm 0.4	4.3 \pm 0.7	30.4 \pm 2.7	21.0 \pm 3.0

TABLA 17

Composición en ácidos grasos de diferentes lípidos del polen después de 24 h de germinación. Los resultados, expresados como porcentaje de ácidos grasos, son la media de cuatro experimentos independientes (\pm DS).n.d.,no detectado; tr,< 0.5 %.

Lípidos	Porcentaje de ácidos grasos						
	12:0	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
FI	tr	1.3 \pm 0.2	50.2 \pm 1.9	3.3 \pm 0.1	3.5 \pm 0.5	29.3 \pm 2.8	12.4 \pm 1.4
FC	tr	0.8 \pm 0.1	35.0 \pm 1.5	2.2 \pm 0.1	5.1 \pm 0.8	41.7 \pm 4.0	15.2 \pm 1.9
FE	tr	0.6 \pm 0.1	33.9 \pm 2.5	2.0 \pm 0.1	4.2 \pm 0.5	46.2 \pm 3.1	13.1 \pm 1.6
AF	n.d.	0.9 \pm 0.2	35.4 \pm 2.9	2.5 \pm 0.1	5.6 \pm 1.3	44.6 \pm 3.7	11.0 \pm 2.9
GL	1.1 \pm 0.2	3.9 \pm 0.7	43.6 \pm 6.2	5.2 \pm 0.4	5.9 \pm 1.1	30.1 \pm 1.6	9.8 \pm 1.4
MG	12.2 \pm 2.9	16.1 \pm 4.3	38.5 \pm 2.2	1.3 \pm 0.2	2.1 \pm 0.3	21.1 \pm 1.8	8.7 \pm 2.1
DG	14.0 \pm 3.3	18.8 \pm 2.9	33.0 \pm 2.2	2.3 \pm 0.3	5.0 \pm 0.9	17.8 \pm 2.9	9.1 \pm 1.2
AGL	17.8 \pm 1.8	17.3 \pm 2.7	39.0 \pm 3.1	1.4 \pm 0.2	3.9 \pm 0.7	15.4 \pm 2.3	5.2 \pm 0.5
TG	0.9 \pm 0.2	1.5 \pm 0.2	35.3 \pm 3.1	3.6 \pm 0.6	5.6 \pm 0.8	33.8 \pm 0.2	19.3 \pm 2.8

1.c. Lípidos de la pared

1.c.1. Clases de lípidos

En este trabajo hemos analizado el contenido en lípidos de la pared del polen maduro y después de 24 h de germinación, siendo significativo tras la germinación, el descenso en el contenido de todas las moléculas lipídicas detectadas en la pared celular, fundamentalmente de lípidos polares (tabla 18).

TABLA 18

Composición y contenido de diferentes lípidos de la pared del polen maduro y después de 24 h de germinación. Los resultados, expresados en μg por g de peso fresco de polen y en porcentajes respecto al contenido total en lípidos de la pared, son la media (\pm DS) de tres experimentos independientes.

Lípido	Porcentaje		$\mu\text{g} / \text{g}$	
	Maduro	Germinado	Maduro	Germinado
FL+GL	13.9	4.3	645.8 \pm 85.4	115.7 \pm 17.7
MG	6.9	5.7	321.1 \pm 50.6	150.9 \pm 11.9
DG	21.8	20.0	1009.9 \pm 133.9	523.0 \pm 78.2
AGL	45.8	57.3	2116.1 \pm 197.9	1520.0 \pm 179.8
TG	11.6	12.7	538.1 \pm 76.0	338.4 \pm 46.9
Total			4631.0	2657.0

1.c.2. Composición y contenido en ácidos grasos

La riqueza en ácidos grasos saturados de pequeño peso molecular (laurico y mirístico) y de ácidos palmítico, linoleico y linolénico detectada en los lípidos totales tanto del polen maduro como del germinado, es la misma imagen observada a nivel de los lípidos de la pared celular (tabla 19). Los lípidos de la pared del polen maduro muestran un mayor porcentaje de ácidos grasos saturados, así como la existencia de ácidos eicosenoico y

cis-9-eicosenoico. Estos últimos ácidos grasos no son observables ni en los lípidos que conforman las paredes celulares del polen germinado, ni a nivel de la célula entera.

TABLA 19

Composición y contenido en ácidos grasos de los lípidos de la pared del polen maduro y germinado. Los resultados, expresados en μg por g de peso fresco de polen y en porcentajes respecto al contenido total en ácidos grasos, son la media (\pm DS) de tres experimentos independientes. n.d., no detectado.

Acidos grasos	Porcentaje		$\mu\text{g} / \text{g}$	
	Maduro	Germinado	Maduro	Germinado
12:0	10.2	6.0	394.0 \pm 70.9	171.3 \pm 25.8
14:0	14.8	11.2	568.4 \pm 73.8	316.1 \pm 40.6
16:0	31.9	38.9	1225.8 \pm 139.9	1100.2 \pm 85.5
18:0	4.3	5.3	166.1 \pm 24.1	149.8 \pm 12.7
18:1	11.1	6.8	425.9 \pm 60.9	193.6 \pm 15.8
18:2	16.9	23.7	646.7 \pm 72.5	666.4 \pm 65.7
20:0	2.0	-	77.2 \pm 9.0	n.d.
18:3	6.8	8.1	262.3 \pm 24.7	228.2 \pm 16.2
20:1	2.0	-	76.6 \pm 8.4	n.d.
Total			3843.0	2825.0

2. Biosíntesis lipídica

Los datos bioquímicos reseñados a nivel del polen entero y de la pared celular han mostrado que durante la germinación tiene lugar un aumento en el contenido de lípidos de membranas y una disminución en el de lípidos neutros. Para verificar la hipótesis según la cual dicho incremento en la masa debe corresponder a la aparición de constituyentes neoformados en las fracciones celulares, procedimos al estudio en el polen maduro y germinado de la biosíntesis de lípidos con ayuda de precursores radioactivos.

En este sentido, los estudios llevados a cabo tras incubar ambos tipos de células, polen maduro y después de 24 h de germinación, en presencia de acetato sódico [$1-^{14}\text{C}$], han permitido determinar los lípidos nuevamente sintetizados en su medio celular. En la tabla 20 se observa como la absorción del precursor es superior en el polen maduro que en el germinado; sin embargo, la incorporación del ^{14}C a los lípidos totales, en pmoles de acetato por gramo de peso fresco del material de partida, es superior una vez que el polen germina.

TABLA 20

Incorporación de acetato- $1-^{14}\text{C}$ a los lípidos totales del polen maduro y germinado. Los resultados, en pmoles por g de peso fresco y en porcentaje respecto al total absorbido, son la media de tres experimentos independientes que no difieren en más de un 12 % del valor medio.

	pmoles / g peso fresco		Porcentaje	
	Maduro	Germinado	Maduro	Germinado
Radioactividad total en el medio de incubación	33659	33659		
Absorción del precursor	16841	13166	100.0	100.0
Incorporación del precursor a lípidos totales	2494	2890	14.8	21.9

El análisis de la radioactividad a nivel de los distintos lípidos muestra que la fosfatidiletanolamina, triacilgliceroles, ácidos grasos libres y, sobre todo, fosfatidilcolina son los lípidos mayoritariamente sintetizados (tabla 21). Aunque, una vez que el polen germina, el incremento en la síntesis de lípidos interesa tanto a los fosfolípidos como a los lípidos neutros, cabe destacar el aumento en la síntesis de fosfatidilinositol.

TABLA 21

Incorporación de acetato-1-¹⁴C a diferentes lípidos del polen maduro y germinado. Los resultados, en pmoles por gramo de peso fresco y en porcentajes respecto al ¹⁴C total incorporado, son la media de tres experimentos independientes, que no diferían en más de un 10 % del valor medio.

	pmol / g		%	
	Maduro	Germinado	Maduro	Germinado
FI	73.9	193.1	4.2	7.3
FC	577.3	663.9	32.8	25.1
FE	174.2	296.2	9.9	11.2
MG	86.2	190.4	4.9	7.2
DG	161.9	343.8	9.2	13.0
Est	49.3	87.3	2.8	3.3
AGL	362.6	478.7	20.6	18.1
TG	198.9	309.5	11.3	11.7
Total	1684.3	2562.9		

D. ESTUDIO DE COMPONENTES SOLUBLES DEL POLEN

Como ya se ha mencionado en otros apartados de esta memoria, los procesos biosintéticos que se desencadenan durante el crecimiento del tubo polínico requieren la utilización de la reserva energética del polen, almacenada bajo la forma de lípidos y/o azúcares. A este respecto, una vez conocida la importante disminución en el contenido de triacilgliceroles que tiene lugar tras la germinación, en este capítulo se estudian los cambios producidos en el contenido de azúcares solubles y de ácidos orgánicos, componentes fundamentales en el metabolismo vegetal y de interés en la célula como osmorreguladores.

De los componentes solubles analizados en el polen maduro, los azúcares representan casi el 90 % (tabla 22). Sin embargo, después de la germinación, el contenido en azúcares disminuye drásticamente, llegando a representar menos del 15 % del total.

Desde un punto de vista cualitativo, los azúcares solubles más importantes son la glucosa y la fructosa, aunque en polen maduro también se detectan pequeñas cantidades de galactosa, arabinosa y xilosa.

Contrariamente al polen maduro, los ácidos orgánicos y el glicerol son los constituyentes solubles analizados más abundantes en el polen germinado.

TABLA 22

Contenido en componentes solubles del polen maduro y germinado. Los resultados, en mg por g de peso fresco del material de partida y en porcentajes respecto al total de componentes solubles detectados, son la media de cuatro experimentos independientes que no diferían en más de un 12 % del valor medio. n.d., no detectado; tr < 0.1 mg / g.

Molécula	mg / g		Porcentaje	
	Maduro	Germinado	Maduro	Germinado
Ac. Pirúvico	2.58	0.57	5.12	9.27
Ac. Oxálico	n.d.	0.13	-	2.11
Glicerol	0.42	1.57	0.83	25.53
Ac. Succínico	n.d.	1.22	-	19.84
Ac. Fumárico	0.40	tr.	0.79	-
Ac. Máfico	1.20	0.40	2.38	6.50
Ac. Cis-aconítico	n.d.	0.13	-	2.11
Ac. Cítrico	0.17	0.87	0.34	14.15
Ac. Aspartico	tr	0.48	-	7.80
Ac. Glutámico	1.67	n.d.	3.31	-
Arabinosa	0.29	n.d.	0.57	-
Xilosa	0.48	n.d.	0.95	-
Fructosa	30.51	0.36	60.51	5.85
Galactosa	2.48	n.d.	4.92	-
Glucosa	10.22	0.41	20.28	6.67
Total	50.42	6.14		

VI. DISCUSSION

La metodología seguida habitualmente por diferentes autores (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1985; Lee y col., 1985; Luza y Polito, 1985; Kyo y Harada, 1986) para inducir la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico, basadas en la incubación del mismo en un medio conteniendo reguladores osmóticos e iones minerales, no nos ha permitido conseguir resultados satisfactorios en polen de olivo. Quizá, la propia maquinaria biológica que debe ponerse en funcionamiento durante la germinación y el hecho de que la recogida del mismo tenga lugar en un corto espacio de tiempo, a veces días, a partir de árboles que, inevitablemente, difieren en su estado fisiológico, pueden constituir razones capaces de justificar la gran variabilidad a que está sometida su viabilidad.

En este sentido, la utilización de la técnica de *ageing* para el estudio de los cambios bioquímicos y fisiológicos que acompañan a la germinación del polen de olivo, como un sistema mediante el cual poder acelerar el curso fisiológico normal de estos procesos, ha ofrecido un enorme interés para nosotros. Así, los cambios metabólicos y estructurales que se desencadenan en muchos tejidos de reserva cuando se someten a las condiciones experimentales determinadas por el *ageing*, muestran una estrecha relación con aquéllos otros que se establecen durante la germinación del polen.

Desde un punto de vista metodológico, el *ageing* consiste en mantener los tejidos de reserva en medio húmedo y con abundante aireación durante horas e incluso días. Ello, provoca toda una serie de transformaciones metabólicas, de las cuales la más espectacular es una estimulación de la intensidad respiratoria, acompañada de una desaparición de almidón y de una acumulación de azúcares solubles (Laties, 1967). Esta respiración difiere esencialmente de aquella otra presente inicialmente en el tejido fresco, tanto por su insensibilidad al cianuro, CO y dinitrofenol (Hackett y col., 1960), como por su sensibilidad al malonato (Lee y Chasson, 1966) y fué explicada como el resultado de un incremento del número de mitocondrias por célula o de una mayor actividad metabólica en dichos orgánulos. Efectivamente, primero Hackett y col. (1960) y, posteriormente, Asahi y col. (1966) comprobaron en diferentes tejidos sometidos a *ageing*, un aumento del 70 % de las proteínas mitocondriales solubles, así como de las

actividades citocromo oxidasa y succinato citocromo c-reductasa, y de la fosforilación oxidativa.

Por otra parte, los trabajos de Click y Hackett (1963) y de Sato y col. (1980) han permitido demostrar en tejidos así tratados una incorporación importante de uracilo- ^{14}C en ácidos nucleicos y de leucina- ^{14}C en proteínas, habiendo sugerido estos autores tras la adición al medio de inhibidores de la síntesis proteica, que la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos podría ser necesaria para el desarrollo de la respiración inducida antes indicada.

La exaltación de la síntesis lipídica, la cual se traduce en modificaciones importantes en el contenido de fosfolípidos y de ácido linoleico (Willemot y Stumpf, 1967; Dizengremel y Kader, 1980), y la potenciación de los fenómenos de absorción y transporte iónico son otros de los cambios metabólicos que se desencadenan durante el *ageing* (McDonald y Laties, 1962; Bielaki y Laties, 1963; Laties, 1967).

El conjunto de los fenómenos metabólicos reseñados, potenciados en el curso del *ageing*, ha sido relacionado por algunos investigadores con la estimulación del crecimiento que tiene lugar por la acción de ciertas hormonas vegetales como la giberelina y las auxinas (Sperling y Laties, 1963). En efecto, la adición de estas hormonas a tejidos mantenidos en *ageing* inducía un aumento de la respiración (Coutrez-Greerinck, 1970), de la síntesis de enzimas como la invertasa (Edelman y Hall, 1965) y del crecimiento rápido sin divisiones celulares, lo que podía atribuirse a una síntesis de proteínas de *novo* (Masuda, 1966).

Estos cambios metabólicos observados durante el *ageing*, van ligados a una serie de transformaciones estructurales, las cuales se inducen desde el momento en que se produce la entrada de agua en los tejidos con posterior aumento del peso fresco y de la turgencia de las células. Así, el estudio morfológico al microscopio óptico mostró una neta disminución del número de granos de almidón en tejidos en *ageing* (Benabdelkader, 1971), al tiempo que la observación al microscopio electrónico pudo definir una conversión de ribosomas en polisomas, habiéndose considerado la abundancia de membranas del retículo endoplasmático portadoras de ribosomas asociados, como un indicador suplementario de una importante actividad de

proteínogénesis durante el *ageing* (Leaver y Key, 1967). En esta misma línea, Morré y col. (1970) observaron, trabajando con rodajas de patata, un desarrollo apreciable de las membranas del retículo, así como la presencia de dictiosomas, estructuras celulares indicativas de una intensa actividad metabólica relacionada con la síntesis y transferencia de polisacáridos, con la formación de estructuras pectocelulósicas y con la distribución de los constituyentes de las membranas intracelulares.

Los estudios citológicos llevados a cabo en el curso del *ageing*, han demostrado, así mismo, la existencia de crestas mitocondriales y la presencia de dos zonas perfectamente diferenciadas en estos orgánulos, lo que, de acuerdo Verleur (1969), podía sugerir una posterior inducción de la división del mismo. En cuanto a los cambios a nivel de la membrana plasmática de las células en *ageing*, Whaley y col. (1971) observaron que dichas estructuras presentaban placas ecuatoriales definitivas de una preparación para la división celular (Whaley y col., 1971).

Para poder utilizar esta técnica en la investigación de los cambios fisiológicos y bioquímicos más importantes que se desencadenan durante la germinación del polen de olivo, era importante conocer las transformaciones metabólicas y citológicas que se establecen en esta célula haploide durante dicho proceso. El conocimiento de la similitud o no de dichos cambios a lo largo del crecimiento del tubo polínico con aquéllos otros que se producen en los tejidos sometidos a *ageing*, nos iba a permitir una aplicación de esta técnica en nuestro estudio.

En este sentido, las investigaciones citológicas en polen de olivo han definido la existencia de mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso, dictiosomas y cuerpos lipídicos, así como la ausencia de plastidios, vacuolas y granos de almidón (Fernández-Fernández, 1986). Además, es también frecuente en polen maduro que las cisternas del retículo endoplasmático se presenten apiladas y que, tanto estas estructuras como los dictiosomas, se encuentren asociadas a cuerpos lipídicos (Cresti y col., 1983).

Por otra parte, como ocurre en los tejidos sometidos a *ageing*, la germinación también supone la hidratación inicial del polen, lo que conlleva una entrada masiva de agua y un aumento del volumen celular (Cresti y col., 1977). Posteriormente, antes de que se produzca la emergencia del tubo

polínico, tienen lugar una serie de cambios citológicos, indicativos de una gran actividad metabólica: separación de las cisternas del retículo endoplasmático rugoso, agregación de estructuras ribosomales en polisomas (relacionable con una activación de la síntesis proteica), producción de gran cantidad de vesículas a partir de los dictiosomas (indicativo de una considerable biosíntesis de estructuras de membrana), desarrollo de numerosas crestas mitocondriales (reflejo de una intensa actividad respiratoria), descenso en el número de cuerpos lipídicos (lo que pone de manifiesto la utilización de estas moléculas como reserva energética durante la germinación) (Linskens y col., 1970; Cresti y col., 1977; Hoekstra y Bruinsma, 1979; Cresti y col., 1985).

Todos estos cambios citológicos que se desencadenan durante el crecimiento del tubo polínico, se corresponden con una serie de transformaciones metabólicas: biosíntesis de fosfolípidos (Whipple y Mascarenhas, 1978, Helsper y Pierson, 1986; Helsper y col., 1986), biosíntesis proteica activa (Raghavan, 1984; Calzoni y Speranza, 1986), intensa actividad respiratoria, sobre todo, en polen trinucleado y en algunos tipos de polen binucleado, acompañada, en ambos casos, de la existencia de mitocondrias completamente desarrolladas en el momento de la dehiscencia (Hoekstra y Bruinsma, 1979) y procesos de absorción iónica. En este último tipo de acción, la adición de ClK al medio de germinación del polen de *Lilium* conduce a una liberación de H⁺, debida, presumiblemente, a un antiport K⁺/H⁺ (Deshusses y col., 1981; Southworth, 1983).

En cuanto a las hormonas, estos componentes celulares también desempeñan un importante papel en la germinación. Así, las auxinas, la giberelina A₃ y el ABA estimulan el crecimiento posterior del tubo polínico, al tiempo que algunas citoquininas incrementan tanto la germinación como el crecimiento del tubo (Konar, 1958; Sweet y Lewis, 1971; Dhawan y Malik, 1981; Shidu, 1986). En estos procesos, las giberelinas y las auxinas parecen actuar promoviendo la síntesis de ácidos nucleicos, mientras que el ABA y las citoquininas podrían actuar incrementando la actividad de enzimas como la invertasa, con lo cual proporcionarían precursores para la síntesis de la pared del tubo (Mann, 1975, Malik y Chhabra, 1978; Webber, 1988).

TABLA 23

Características bioquímicas y citológicas comunes a los tejidos mantenidos en *ageing* y al polen durante la germinación.

	Referencia	
	<i>Ageing</i>	Germinación
Cambios Metabólicos:		
-Estimulación de la intensidad respiratoria	Laties, 1967 Hackett y col., 1960 Lee y Chasson, 1966	Hoekstra y Bruinma, 1979
-Síntesis activa de proteínas	Masuda, 1966	Raghavan, 1984
-Síntesis de ácidos nucleicos	Click y Hackett, 1963 Sato y col., 1980	Tupy y col., 1985
-Síntesis lipídica	Willemot y Stump, 1967 Dizengremel y Kader, 1980	Halsper y Pierson, 1986
-Degradación de sustancias de reserva	Laties, 1967	Nakamura y col., 1980
Potenciación de fenómenos de absorción y transporte iónico	McDonald y Laties, 1962 Bielaki y Laties, 1963 Laties, 1967	Deshusses y col., 1981 Sothworht, 1983
Cambios Estructurales:		
-Desarrollo de numerosas crestas mitocondriales	Verleur, 1969	Hoekstra y Bruinma, 1979
-Agregación de ribosomas en polisomas	Leaver y Key, 1967	Cresti y col., 1985
-Desarrollo de las membranas del retículo	Morré y col., 1970	Cresti y col., 1985
-Producción de vesículas a partir de dictiosomas	Morré y col., 1970	Cresti y col., 1977
-Estimulación del crecimiento por acción de hormonas	Sperling y Laties, 1963 Coutrez-Greenick, 1970	Dhawan y Malik, 1981 Shidu, 1986

El estudio comparativo del comportamiento metabólico y de las modificaciones estructurales observables en los tejidos sometidos a *ageing* y en el polen durante la germinación (tabla 23), nos indujo a la utilización de esta técnica experimental para potenciar, en un principio, y poder investigar, después, los cambios bioquímicos y fisiológicos más significativos que se desencadenan en el polen de olivo a lo largo del proceso de germinación y crecimiento del tubo polínico.

De la utilización de esta técnica para germinar el polen de olivo, se ha derivado una mejora sustancial de dicho proceso. Sin embargo, teniendo en cuenta que la tasa de germinación continuaba siendo baja, se hizo necesario estimular los mecanismos de absorción de nutrientes fundamentales para el crecimiento del tubo polínico, al objeto de obtener un mayor porcentaje de germinación.

En este sentido, el hecho de que la germinación del polen de olivo disminuyera a medida que aumentaba el pH, sugirió la posible implicación de un mecanismo de extrusión de H^+ en dicho proceso. De ser esto así, la fuerza motriz generada por la extrusión de H^+ podría ser utilizada en la absorción de cationes, aniones y azúcares, componentes necesarios para el crecimiento del tubo polínico. Nuestros resultados demuestran que el incremento inducido por la fusicocina, activador específico de las H^+ -ATPasas de plasmalema y tonoplasto, tanto en la actividad bombeadora de H^+ como en la germinación del polen de olivo, así como la inhibición de ambos procesos por el ortovanadato, inhibidor específico de la H^+ -ATPasa de plasmalema, permite sugerir una correlación entre el bombeo de H^+ y la capacidad germinativa del polen. En apoyatura de estos hechos, Deshusses y col. (1981) y Southworth (1983) apuntaron la participación de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática en la germinación del polen de *Lilium*. En este mismo orden de cosas y en contradicción con los resultados obtenidos por Lee y col. (1985) en polen de jojoba, donde la germinación tenía lugar en un amplio margen de pH (entre 4 y 8), nuestros datos, han demostrado una clara

inhibición de la germinación cuando los medios de incubación no se sometían a regulación del pH, lo cual indica que la germinación del polen de olivo es dependiente del mantenimiento de un estrecho rango de pH.

No ha sido posible un estudio sistemático del efecto de la concentración de CO_2 en el medio de incubación sobre el bombeo de H^+ y la germinación, derivado del propio concepto en que se funda la determinación de la extrusión de H^+ a nivel celular. Así, la concentración de CO_2 en el medio interfiere la cuantificación de la extrusión de H^+ generada durante el crecimiento del tubo polínico, al provocar la acidificación del mismo. No obstante, los resultados han revelado una estimulación de la germinación con la concentración del CO_2 del aire. En este sentido, Stafioistakis y col. (1972) y Dhaliwal y col. (1981) propusieron que el CO_2 promovía el crecimiento del tubo polínico en distintas especies, así como la incorporación del precursor acetato [$1-^{14}\text{C}$] a los lípidos polares y a los esteroides del polen de *Crotalaria juncea*, lo cual sugirió, posteriormente, a Malik y Chawla (1983) la participación del CO_2 en la estimulación de la síntesis de lípidos de membrana.

El estudio conjunto de la capacidad germinativa y de la actividad bombeadora de H^+ en función del aporte exógeno de iones minerales, ha revelado que ambos procesos son dependientes de la concentración de K^+ , lo que apoya la posible implicación de una H^+ -ATPasa de plasmalema en la germinación. El no requerimiento de la adición de K^+ para la germinación en polen en otras especies vegetales, podría explicarse en base a una suficiencia del elemento en esos orígenes (Deshusses y col., 1981; Filiti y Marcucci, 1982; Lee y col., 1985; Luza y Polito, 1985; Reiss y col., 1985a; Nobling y Reiss, 1987).

Los resultados de este trabajo han demostrado también que la germinación y la actividad de la bomba de H^+ en polen de olivo son procesos dependientes del aporte de boro. Una inhibición de la germinación como consecuencia de la deficiencia en boro ha sido descrita por numerosos autores (Filiti y Marcucci, 1982; Ekaratne y Senathirajah, 1983; Luza y Polito, 1985). Únicamente el polen de jojoba es capaz de germinar en ausencia de este elemento (Lee y col., 1985). A este respecto, Gärtel (1952) y O'Kelley (1957) habían propuesto que el efecto negativo de la deficiencia

de boro en el grano de polen sobre la germinación *in vivo*, podría estar compensada por un alto contenido del elemento en el estilo y en el estigma.

El análisis del nivel de actividad extractora de H^+ y del poder germinativo del polen de olivo en función de la presencia de calcio en el medio de incubación sugiere, de acuerdo con Reiss y col. (1985b), que esta célula contiene el calcio necesario para sustentar la germinación, de forma que toda absorción exógena podría alterar su concentración citoplasmática, inhibiendo el crecimiento del tubo polínico.

Estos resultados sobre la acción del boro y del calcio en la germinación del polen, sitúan a estos elementos como importantes reguladores del proceso. En conexión con este hecho, diversos estudios llevados a cabo en tejidos de plantas superiores han mostrado que la deficiencia en boro inhibe la translocación del calcio, induciendo cambios anormales en su metabolismo a nivel de la pared celular (Yamauchi y col., 1986). Del mismo modo, es bien conocida la influencia del boro y del calcio en el transporte y acción de las auxinas en plantas (Tang y De la Fuente, 1986). En este sentido, la comprobación de que concentraciones de 1.25 y 2.50 μM de ácido indolacético (AIA) estimulan la germinación y el bombeo de H^+ en polen de olivo, al tiempo que concentraciones elevadas (10 μM) inhiben ambos procesos, contrasta con los resultados obtenidos por Dhingra y Varghese (1985b) en polen de maíz, donde el AIA no muestra efecto alguno sobre la germinación. Por otra parte, aunque previamente algunos autores como Rayle y Cleland (1980) habían sugerido, en otros orígenes vegetales, una implicación del AIA en la regulación del transporte de H^+ en base a una actuación de la hormona sobre una ATPasa de membrana, nuestros resultados en polen de olivo son aún insuficientes como para apuntar una acción directa de la hormona sobre el enzima.

Respecto a la evolución de la germinación en función del pH del medio de incubación, se ha demostrado una fuerte inhibición de ésta a pH 6.5. Esta disminución en la capacidad de germinación a este pH, la cual va acompañada de un mayor bombeo de H^+ , resulta difícil de interpretar. Sin embargo, ello hace pensar en la generación de un potencial eléctrico transmembranario a nivel del plasmalema del polen de olivo, al igual que en otras células vegetales (Poole, 1978), cuando el pH se desplaza desde 5.5. a 6.5, lo cual podría facilitar la difusión no electrogénica de H^+ .

En su conjunto, todos estos hechos permiten sugerir la hipótesis de la posible actuación de una H⁺-ATPasa a nivel del plasmalema con implicación en la germinación del polen y en el crecimiento del tubo polínico.

En cuanto a los datos obtenidos en relación a los cambios en el contenido lipídico tras la germinación del polen, éstos están de acuerdo con las transformaciones fisiológicas y estructurales que se establecen en esta célula durante dicho proceso. Así, durante el crecimiento del tubo polínico, los lípidos totales disminuyen por dos motivos principales: por una parte, debido al requerimiento continuo de aporte energético, el cual es proporcionado por la degradación de los lípidos de reserva, fundamentalmente triacilgliceroles y, por otra, debido al importante descenso que tiene lugar en los lípidos conformadores de la pared celular. Esto último sugiere que la pared del tubo o está desprovista de lípidos o posee un bajo contenido en estos componentes.

Los análisis bioquímicos aquí presentados indican una biogénesis de membranas intracelulares durante la germinación. Aunque este hecho, había sido sugerido en polen de otras especies en función de múltiples observaciones microscópicas (Picton y Steer, 1982), sin embargo, estos resultados no habían sido suficientemente interpretados. Una aclaración de los mismos, puede venir del análisis de nuestros datos al respecto. Así, tras analizar los lípidos totales, uno de los hechos más significativos que se observan en el polen de olivo germinado, en relación al maduro, es la disminución en el contenido de lípidos polares, provocado exclusivamente por el descenso en fosfatidilcolina. En un principio, este resultado es difícilmente interpretable, sobre todo, teniendo en cuenta los trabajos de Wipple y Mascarenhas (1978) en relación a que un aumento de estructuras de membrana durante el crecimiento del tubo polínico debe reflejarse en un mayor contenido en fosfolípidos. Nuestros resultados muestran como una parte importante de los lípidos polares del polen maduro se ubica a nivel de las paredes celulares, lo que unido a la casi inexistencia de lípidos polares en las paredes del grano germinado, permite concluir que el descenso en el contenido de fosfolípidos tras la germinación no se debe a

una degradación de las estructuras de membrana, sino más bien a una disminución en el contenido de los lípidos polares de la pared.

Por tanto, de acuerdo con estos resultados es posible indicar, como era previsible, la existencia de un mayor contenido de fosfolípidos en las membranas celulares del polen germinado. Un incremento de estas características, representa, en gran medida, la imagen bioquímica de la biogénesis de membranas, cuyo valor viene reforzado por los numerosos estudios citológicos, en los que se ha establecido la riqueza en membranas del polen germinado (Picton y Steer, 1982).

Otro hecho importante que merece ser reseñado, es que los lípidos polares de las membranas nuevamente sintetizadas durante la germinación tienen una composición cualitativa idéntica a la de las membranas preexistentes, siendo, como en polen de otras especies (Andrikopoulos y col., 1985; Sekiya y col., 1988), la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina las moléculas lipídicas más abundantes. Sin embargo, en polen de olivo, a diferencia del polen de *Camellia* (Sekiya y col., 1988), los cambios provocados en los porcentajes de estos lípidos por la germinación, podría conducir a alteraciones en las propiedades de dichas estructuras. Así, el aumento en el contenido de fosfatidilinositoles observable en el polen de olivo germinado, podría tener repercusiones importantes en el crecimiento del tubo polínico. En este sentido, como se ha indicado anteriormente la germinación y el crecimiento del tubo polínico son procesos dependientes del Ca^{++} (Brewbaker y Kwack, 1963), habiéndose implicado a los fosfatidilinositoles en la regulación por este elemento de procesos celulares (Hokin, 1985). Así, en polen de *Lilium* se ha descrito la existencia de una fosfolipasa C específica de los fosfoinositoles, moléculas lipídicas consideradas sumamente importantes en las interacciones polen-pistilo y, por tanto, en las respuestas de incompatibilidad (Helsper y col., 1986).

Al hilo de estos hechos, el estudio de los cambios conformacionales de algunas proteínas enzimáticas (Jaenicke, 1981), así como del papel del Ca^{++} y de estos fosfolípidos en la transducción de la señales extracelulares (Minorsky, 1985; Poovaiah y col., 1987), constituyen aspectos muy importantes que actualmente se investigan para llegar a conocer los

mecanismos homeostáticos capaces de contrarrestar las múltiples agresiones que sufren los animales y las plantas en el medio en que se desarrollan.

La regulación por el calcio, boro, potasio y efectores hormonales de la capacidad extractora de H^+ en polen de olivo y, sobre todo, la posibilidad de profundizar en la función de los fosfoinositoles en este proceso, podría contribuir, sin duda, a mitigar los efectos negativos de los factores ambientales en la viabilidad del polen.

El incremento en el contenido de diacilgliceroles es otro hecho significativo producido como consecuencia de la germinación del polen de olivo. Una acumulación tan elevada de estos lípidos podría estar relacionada con una inhibición de la síntesis de fosfolípidos, al ser los diacilgliceroles intermediarios de su biosíntesis (Devor y Mud, 1971; Caver y Wilson, 1984). A este respecto, Helsper y Pierson (1986) han interpretado el efecto negativo que la concanavalina A ejerce sobre la germinación y el crecimiento del tubo polínico de *Lilium*, en base a una acumulación de 1,2-diacilgliceroles como consecuencia de una inhibición de la síntesis de fosfolípidos en los procesos de *turnover* de las membranas.

Los resultados obtenidos al respecto nos han llevado a sugerir que la relación fosfolípidos / diacilgliceroles podría ser considerada como un parámetro indicativo de la viabilidad del polen.

El contenido en ácidos grasos libres encontrado en el polen maduro de olivo es comparable al determinado por Andrikopoulos y col. (1985) en polen de *Pinus halepensis*. Cuando el polen germina, la casi totalidad de los ácidos grasos libres se localiza a nivel de la pared celular. La posibilidad de formación de hidroperóxidos y radicales libres a partir de estos ácidos grasos, como resultado de reacciones de peroxidación, podría resultar muy negativo al poder afectar estos derivados la capacidad germinativa del grano de polen. Los estudios llevados a cabo por Priestley y col. (1985) en polen almacenado durante diferentes intervalos de tiempo, han demostrado una desorganización molecular de la membrana como consecuencia de un incremento en el nivel de radicales libres de naturaleza orgánica. Previamente, Shivanna y Heslop-Harrison (1981) habían comprobado que el estado de las membranas de la célula vegetativa es uno de los principales determinantes de la capacidad germinativa del polen.

Por otra parte, es significativo destacar los escasos datos concernientes a la naturaleza de los ácidos grasos de los lípidos del polen, y ello, a pesar de que los estudios sobre las propiedades biofísicas de los fosfolípidos hayan mostrado que su composición en ácidos grasos puede controlar la fluidez y la permeabilidad de las membranas (Chapman y Leslie, 1970).

En cuanto a la composición en ácidos grasos de los lípidos totales del polen maduro y germinado de olivo, el hecho de mayor relevancia es el elevado contenido en ácido linoleico y, sobre todo, en ácido palmítico. La abundancia de ácido palmítico es común a los lípidos de otros tipos de polen, al tiempo que numerosos autores han comprobado que la presencia de ácidos grasos poliinsaturados hace posible el funcionamiento de determinados sistemas enzimáticos a más baja temperatura, de manera que los organismos responden a la temperatura con un aumento en la saturación de las cadenas acílicas de los fosfolípidos (Ching y Ching, 1962; Standifer, 1966; Andrikopoulos y col., 1985; Sekiya y col., 1988). Así, el elevado porcentaje de ácido palmítico en los fosfolípidos del polen germinado de olivo, podría estar relacionado con la elevada temperatura (entre 30 y 40 °) a la cual tiene lugar la germinación *in vivo*.

En lo que respecta a la composición en ácidos grasos de las diferentes moléculas lipídicas analizadas, ésta es fiel reflejo de la observada a nivel de los lípidos totales. Por otra parte, el hecho de que la composición en ácidos grasos de fosfolípidos, glicolípidos y triacilgliceroles no experimente cambios importantes tras la germinación, y sí a nivel de los monoacilgliceroles, diacilgliceroles y ácidos grasos libres, donde se detecta una clara disminución en los porcentajes de laurico y mirístico y un aumento en los de ácidos grasos poliinsaturados, contradice los resultados obtenidos por Sekiya y col. (1988) en polen de *Camellia*, donde la germinación provoca un descenso de ácidos grasos poliinsaturados en la fosfatidiletanolamina y en los fosfatidilinositoles.

Teniendo en cuenta la baja temperatura de transición de fase de los ácidos grasos poliinsaturados, componentes mayoritarios de los fosfolípidos del polen de olivo, en este origen carecería de significado la disminución

de la poliinsaturación tras la germinación, debido a que, como ya se ha indicado, en olivo la polinización se efectúa a elevadas temperaturas.

Otro resultado destacable es el mayor grado de saturación de los lípidos de las paredes celulares del polen maduro, respecto a los del polen germinado, así como la presencia en los lípidos de estas estructuras de los ácidos eicosanoico y cis-9-eicosanoico, no detectables a nivel de la célula entera.

En cuanto la cuantificación de esteroides libres, su elevado contenido, sobre todo en el polen maduro, hace pensar, como ya habían sugerido Stanley y Linskens (1974) en otros orígenes, en una ubicación de los mismos a nivel de las paredes celulares. Posteriormente, cuando el polen germina, el descenso en el contenido de esteroides libres y, por consiguiente de la razón esteroides libres/fosfolípidos, podría guardar relación con cambios en las propiedades de las membranas (Kleinhans y col., 1979). En este sentido, también cabe sugerir que el aumento de la razón β -sitosterol/estigmasterol tras la germinación del polen de olivo, se podría relacionar, como ha indicado Guye (1987), con la estabilidad de las membranas.

La capacidad de biosíntesis lipídica se corresponde, en gran medida, con la composición de estos compuestos en el polen maduro y germinado. Para Whipple y Mascarenhas (1978), el desarrollo del tubo polínico se caracteriza por una intensa biosíntesis de componentes de membrana, la cual tiene lugar aún estando inhibido el crecimiento del tubo, lo que provoca una acumulación de vesículas en el interior de estas estructuras. En polen de olivo, la biosíntesis de lípidos es más importante una vez que el polen germina, mientras que la radioactividad absorbida por peso de materia fresca inicial disminuye como consecuencia del proceso germinativo. Estos resultados revelan la existencia de una estimulación de la síntesis lipídica durante la germinación y crecimiento del tubo polínico.

Respecto a la especificidad de la biosíntesis, la potenciada incorporación del ^{14}C a fosfatidilcolina y a fosfatidiletanolamina, coincide con los resultados obtenidos en polen germinado de otras especies (Whipple y Mascarenhas, 1978; Malik y Chawla, 1983; Helsper y Pierson, 1986). Ello es lógico si se tiene en cuenta que estos fosfolípidos son fundamentales para el crecimiento del tubo polínico, el cual supone un gran incremento del área

superficial del polen y, por consiguiente, de la membrana celular. Del mismo modo, son también comparables los resultados que relacionan el incremento en el contenido y en la biosíntesis de fosfatidilinosítoles en el polen germinado, moléculas que, como se ha indicado, parecen desempeñar un papel importante en la regulación de los procesos de germinación y crecimiento del tubo polínico.

Así mismo, la fuerte incorporación de acetato-¹⁴C a ácidos grasos libres, diacilgliceroles y triacilgliceroles también es comparable a la observada en polen de *Crotalaria juncea* y *Lilium longiflorum* (Malik y Chawla, 1983; Helsper y Pierson, 1986). Por otra parte, como cabía esperar, la biosíntesis de esteroides durante la germinación del polen de olivo es poco significativa, ya que es, sobre todo, en procesos senescentes donde se inducen incrementos en la biosíntesis de estas moléculas (Lees y Thomson, 1980).

En otro orden de cosas, como en otros orígenes, la utilización de los azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) como sustratos respiratorios y como precursores de los polisacáridos de la pared del tubo, puede ser la causa de la disminución en el contenido de estas moléculas durante la germinación del polen de olivo (Nygaard, 1969; Nakamura y col., 1980a; Deshusses y col., 1981). Más recientemente, Nakamura y Suzuki (1985) han comprobado que tanto la glucosa como la sacarosa son utilizadas durante el crecimiento del tubo polínico del polen de *Camellia* para la síntesis de UDP-glucosa, molécula constitutiva del β -1,3-glucano que conforma la pared celular del tubo.

Desde esta perspectiva, el descenso casi generalizado en el contenido de ácidos orgánicos detectado en polen germinado, apoya la existencia de una considerable actividad respiratoria durante el crecimiento del tubo polínico. Por el contrario, el aumento en el contenido de glicerol durante este proceso podría estar relacionado con un incremento de compuestos osmorreguladores, necesarios como mecanismos de defensa del tubo polínico contra los múltiples factores ambientales. Así mismo, aunque en menor escala, el glicerol podría estar relacionado con la biosíntesis de

fosfolípidos, cuya formación se potencia con la germinación a fin de sustentar la biogénesis de membranas que acompaña a dicho proceso.

El análisis de los componentes de la pared celular del polen de olivo, ha puesto de manifiesto, como era de esperar, la existencia de hemicelulosas y polisacáridos de naturaleza péctica. Ello, es debido a que la intina, estructura integrante de la pared, presenta una zona microfibrilar presumiblemente de naturaleza celulósica y otra rica en pectinas (Nakamura y Suzuki, 1981).

En cuanto al significativo aumento en el contenido de hemicelulosas B en la pared una vez que el polen germina, Nakamura y Suzuki (1981) habían sugerido también que el crecimiento del tubo podría estar relacionado con la síntesis activa de un glucano hemicelulósico. Contrariamente, la constancia en el contenido de polisacáridos pécticos, antes y después de la germinación, parece indicar que estos componentes no son los principales integrantes de la pared del tubo. A este respecto, las observaciones de Rae y col. (1985) apoyan la ubicación exclusiva de estos polisacáridos a nivel del ápice del tubo polínico, al cual confieren propiedades de flexibilidad en esta zona de crecimiento.

La determinación de la composición de los polisacáridos del polen de olivo maduro y germinado no ha mostrado diferencias sustanciales de las descritas en otras especies (Nakamura y Suzuki, 1981; Rae y col., 1985). Sin embargo, el hecho de que la composición en monosacáridos de dichos componentes de la pared del polen maduro sea marcadamente diferente a la del germinado, permite sugerir que el tubo polínico no es una simple prolongación de la intina del grano maduro. En este sentido, el incremento observado de la relación hexosas / pentosas en los polisacáridos de la pared celular durante la germinación, también ha sido puesto de manifiesto en polen de otras especies (Nakamura y Suzuki, 1981). Del mismo modo, los polisacáridos pécticos de la pared del polen de olivo maduro y germinado se caracterizan por un elevado contenido en ácidos urónicos, moléculas de escasa significación en las hemicelulosas (Nakamura y col., 1980b; Nakamura y Suzuki, 1981; Rae y col., 1985).

El análisis del contenido en proteínas y de la composición en aminoácidos de estas macromoléculas constituyentes de la pared celular del polen maduro y germinado, sugiere un serie de conclusiones importantes. Así, dicho contenido es muy similar al obtenido por Yi-qin y col. (1983) en polen de *Lilium longiflorum*, siendo la mayoría de estas proteínas extraíbles con alcali, lo que sugiere que se encuentran en la pared covalentemente unidas (Lampert, 1965; Yi-qin y col, 1983).

En cuanto a la composición y contenido en aminoácidos de cada una de las fracciones proteicas aisladas, el análisis comparativo es indicativo de una composición similar para las proteínas de las paredes del polen maduro y germinado, afectando las diferencias más importantes, sobre todo, al incremento en el porcentaje de cisteína a nivel del polen maduro. Posteriormente, una vez investigados los aminoácidos correspondientes a las proteínas extraíbles con ClNa y con KOH, se observa que dicha diferencia se plasma únicamente a nivel de la fracción de proteínas solubles en KOH, siendo significativa la carencia de cisteína en las proteínas extraíbles con ClNa.

En cualquier caso, es importante resaltar que la composición en aminoácidos de las proteínas de la pared refleja el escaso carácter ácido de las mismas. Yi-qin y col. (1983) llegaron a conclusiones similares tras analizar las proteínas de la pared del polen de *Lilium longiflorum*, de forma que un análisis conjunto de estos resultados podría justificar el escaso contenido en calcio de las paredes celulares del polen (Reiss y col., 1985). En general, un estudio comparativo de la composición aminoacídica de las proteínas de pared en polen de olivo y de *Lilium* demuestra una gran similitud en sus aminoácidos constituyentes. Si acaso, en polen de olivo, son detectables mayores porcentajes de prolina, en polen maduro, y de alanina y leucina, en polen germinado. Por otra parte, aunque la existencia de hidroxiprolina en las proteínas de la pared del polen maduro ha sido cuestionada por Dashek y Harwood (1974), nuestros resultados evidencian la presencia de dicho aminoácido en las paredes celulares del polen de olivo.

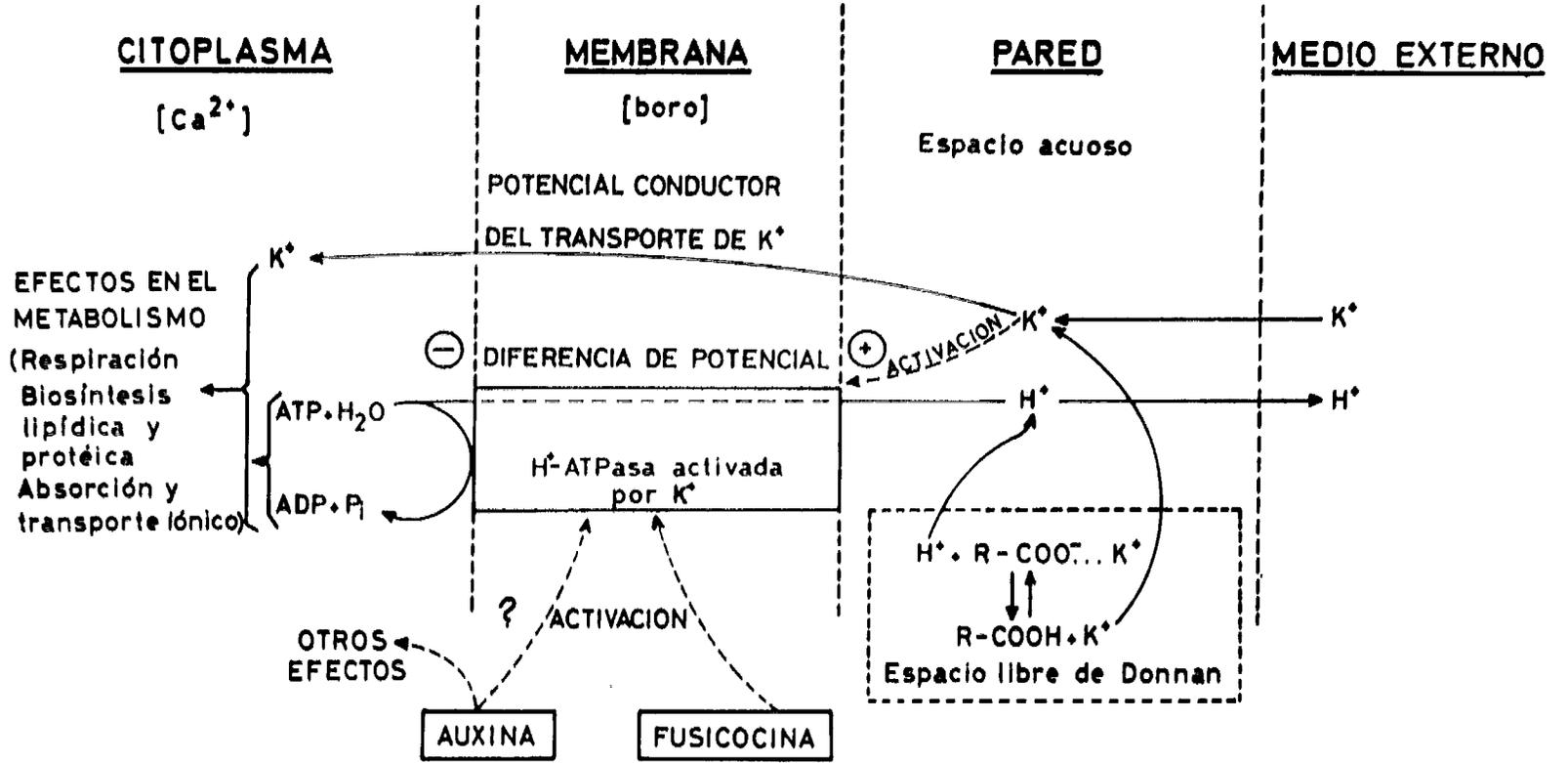
Finalmente, la consideración conjunta de alguno de estos resultados en relación a los obtenidos en investigaciones paralelas por otros autores a nivel de diferentes tejidos vegetales, sugiere una serie de reflexiones que merecen ser interpretadas. Nos referimos, muy especialmente, al efecto de los promotores e inhibidores del crecimiento, de los elementos minerales y de los cambios en el metabolismo sobre la germinación del polen.

Teniendo en cuenta el efecto de estos factores sobre la actividad extractora de H^+ , hemos propuesto un modelo tentativo para la interpretación de la interrelación derivada de estas respuestas metabólicas. Dicho modelo incluye la participación de sustancias promotoras del crecimiento (fusicosina y ácido indolacético), de iones minerales como el K^+ , Ca^{++} y B en el medio de incubación, así como la influencia del metabolismo celular sobre la actividad bombeadora de H^+ y la germinación.

Así, en el esquema de la figura 9 propuesto por nosotros, parece fundamental la activación de una bomba de H^+ a nivel de la membrana plasmática del polen por acción hormonal, cuyo funcionamiento requeriría la existencia de distintos receptores primarios y una serie de pasos intermedios desconocidos por el momento. Sin embargo, en base a los resultados aquí presentados, las auxinas no parecen estar implicadas en la activación de la bomba de H^+ por un mecanismo de este tipo, mientras que el efecto de la fusicocina sí sugiere una actuación a este nivel. En este sentido, los posibles cambios metabólicos derivados de la acción de la fusicocina conducentes a la germinación del polen, podrían depender de un incremento en la energía utilizable como respuesta del metabolismo celular al intercambio H^+/K^+ .

Por otra parte, el requerimiento de boro para la actividad bombeadora de H^+ y para la germinación, aproximan, cada vez más, el mecanismo de acción de este micronutriente a la membrana como han indicado ya diferentes investigadores (Belver y Donaire, 1987; Belver y col., 1988; Roldán y col., 1988). Del mismo modo, la actuación del calcio, elemento implicado en procesos de fosforilación / defosforilación de proteínas claves en los fenómenos de absorción (Blowers y col., 1985), asocian también su acción en el polen con el transporte de H^+ y de otros iones.

Figura 9. Modelo simplificado de la regulación del bombeo de H^+ en polen de olivo.



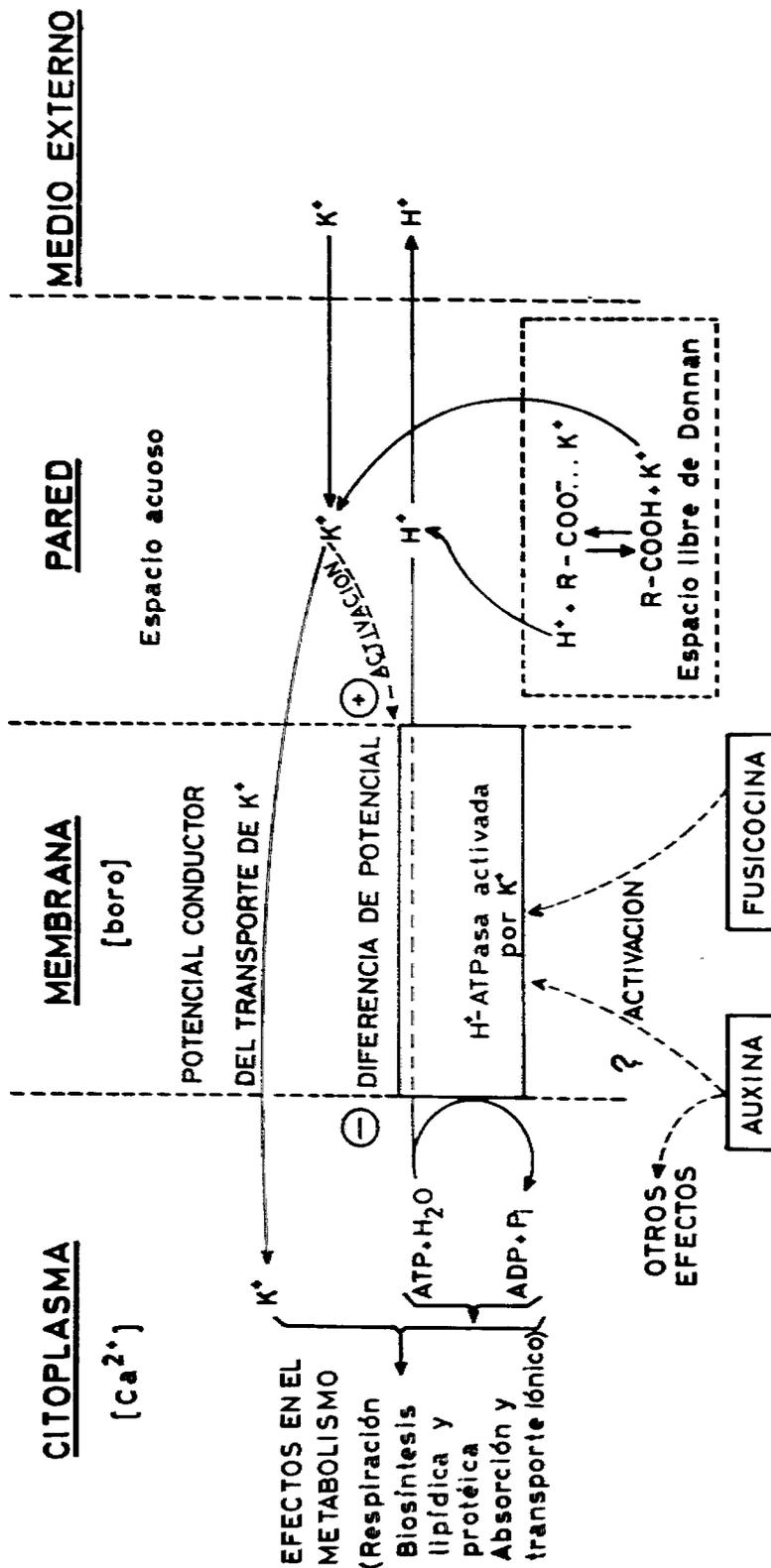


Figura 9. Modelo simplificado de la regulación del bombeo de H^+ en polen de olivo.

Una cuestión importante a tener en cuenta en esta hipótesis, surge de la consideración de un mecanismo común de actuación para la fusicocina y el ácido indolacético en la germinación. Así, podría esperarse que ambos compuestos influenciaran, en una medida comparable a su efecto sobre la germinación, funciones metabólicas claves relacionadas con la extensibilidad de la pared celular. Aunque en el presente trabajo no hemos investigado ninguna de estas funciones, los resultados obtenidos en relación al efecto de diferentes pH del medio de incubación sobre la germinación del polen y sobre la actividad del flujo aparente de H^+ , permiten apuntar algunas sugerencias. Una de ellas se refiere a la posibilidad de que las diferencias importantes tanto en el bombeo de H^+ como en la germinación a pH 4.5 y 6.5, puedan deberse a la acidez inducida por una disminución del pH en el espacio libre de la pared, como consecuencia de mecanismos activados por los reguladores del crecimiento, auxinas y, sobre todo, fusicocina, a nivel de la membrana celular. De ser esto así, el bombeo de H^+ hacia el espacio libre de la pared debe venir acompañado de un incremento proporcional del potencial eléctrico del plasmalema. Según Marré y col. (1975) y Mimura y Tazawa (1986), entre otros investigadores, este tipo de regulación es enormemente importante para capacitar a la célula en la absorción de cationes como el K^+ .

En cualquier caso, la definición de una relación estrecha entre la germinación del polen y la extrusión de H^+ , como mecanismo inductor del crecimiento celular, requiere una investigación más exhaustiva.

Aunque se han alcanzado algunos objetivos, se han abierto expectativas importantes, derivadas, sobre todo, de la actividad de esta célula, de su rápida capacidad de germinación y crecimiento y de su capacidad de respuesta a los factores del medio. Todo ello, constituye ciertamente un cúmulo de propiedades interesantes que definen al polen como un modelo experimental óptimo para el estudio de los mecanismos de adaptación de plantas a condiciones ambientales adversas.

VII. CONCLUSIONES

1^a. La utilización en nuestro estudio de las condiciones experimentales representadas por el *ageing* ha constituido un hallazgo fundamental, al habernos permitido incrementar muy significativamente el porcentaje de germinación del polen.

2^a. El efecto de activadores (fusococina) e inhibidores (ortovanadato) de la H⁺-ATPasa de plasmalema sobre la extrusión de H⁺ y la germinación del polen de olivo, así como la estimulación de estos procesos por el boro, permite sugerir que la germinación es dependiente del transporte electrogénico de H⁺.

3^a. El incremento en el contenido y en la capacidad de biosíntesis de fosfolípidos observable durante la germinación del polen de olivo, representa, en gran medida, la imagen bioquímica de la biogénesis de membranas. Concretamente, el aumento en el contenido de fosfatidilinositoles podría tener repercusiones importantes en el crecimiento del tubo polínico al regular estos fosfolípidos la concentración de calcio libre citoplasmático.

4^a. La disminución durante la germinación y desarrollo del tubo polínico de los lípidos de reserva, así como de los azúcares solubles y ácidos orgánicos es fiel reflejo de una considerable actividad metabólica a lo largo de estos procesos.

5^a. El conocimiento de que los lípidos de la pared del tubo están integrados preferentemente por ácidos grasos libres y lípidos polares, unido a la ubicación mayoritaria de hemicelulosas y polisacáridos pécticos a este nivel, debe comunicar a dicha estructura celular unas propiedades inmunológicas y bioquímicas muy peculiares.

6^a. En contradicción con los resultados obtenidos por otros investigadores, nuestros datos en relación a la composición en aminoácidos de las proteínas de la pared celular del polen maduro y germinado no muestran diferencias significativas.

7^a. El modelo aportado en nuestro estudio para la estimulación de la germinación (condiciones experimentales de *ageing*), la relación de este proceso con el bombeo de H^+ y la sensibilidad del mismo frente a diversos factores, así como el conocimiento de los cambios metabólicos fundamentales a lo largo de estos procesos, sugieren la posibilidad de utilizar la germinación del polen como un modelo útil en el estudio de la adaptación de plantas a condiciones adversas.

VIII. BIBLIOGRAFIA

ABDULLAH, Z., AHMAD, R. y AHMED, J. 1978. Salinity induced changes in the reproductive physiology of wheat plants. *Plant Cell Physiol.* 19, 99-106.

ALBERSHEIM, P., McNEIL, M., DARVILL, A.G., VALENT, B.S., HAHN, M.G., ROBERTSEN, B.K. y AMAN, P. 1980. In *The phytochemistry of cell recognition and cell surface interactions*. F.A. Loewus y C.A. Ryan. eds., Plenum Press, New York. pp 37-58.

AMIN, E.S. y PALEOLOGOU, A.M. 1973. Estrone in *Hyphaene thebaica* kernel and pollen. *Phytochem.* 12, 899-902.

ANDRIKOPOULOS, N.K., SIAFAKA-KAPADAI, A., DEMOPOULOS, C.A. y KAPOULAS, V.M. 1985. Lipids of *Pinus halepensis* pollen. *Phytochem.* 24, 2953-2957.

ASAHI, T., HONDA, Y. y URITANI, I. 1966. Increase of mitochondrial fraction in sweet potato tissue after wounding or infection with *Ceratocystis fimbriata*. *Plant Physiol.* 41, 1179-1184.

AVANZI, S., TAGLIASACCHI, A.M., FORINO, L.M.C. y LOIERO, M. 1980. Cytochemical and autoradiographic analyses on pollen grains of two cultivars of *Malus domestica*: "Golden Delicious" and "Starkrimson". *Riv. Ortoflorofrutt. It.* 64, 111-124.

AYOUB, A.T. 1974. Effect of calcium on sodium salinization of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Exp. Bot.* 25, 245-252.

BAGNI, N., ADAMO, P. y SERAFINI-FRACASSINI, D. 1981. RNA, proteins and polyamines during tube growth in germinating apple pollen. *Plant Physiol.* 68, 727-730.

BARAK, L.S., YOCUM, R.R., NOTHNAGEL, E.A. y WEBB, W.W. 1980. Fluorescent staining of the actin cytoskeleton in living cells with 7-nitrobenz-2-oxa-1,3 diazole phalloidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 980-984.

- BASHE, D. y MASCARENHAS, J.P. 1984. Changes in potassium ion concentrations during pollen dehydration and germination in relation to protein synthesis. *Plant Sci. Lett.* **35**, 55-60.
- BATTAGLINI, M., BOSI, G. y RICARDELLI, G. 1970. Sterols of twenty pollens collected by bees. *Nuova Chim.* **46**, 84-88.
- BELLANI, L. M., FORINO, L.M.C., TAGLIASACCHI, A.M. y SANSAVINI, S. 1984. Viability of stored pollen grains of *Malus domestica* Borkh, as evaluated by the incorporation of labelled nucleic acid precursors. *Caryologia* **37**, 323-330.
- BELVER, A. y DONAIRE, J.P. 1987. Phospholipid metabolism in roots and microsomes of sunflower seedlings: Inhibition of choline phosphotransferase activity by boron. *Phytochem.* **26**, 2923-2927.
- BELVER, A., ROLDAN, M., RODRIGUEZ, M.P. y DONAIRE, J.P. 1988. Plant senescence in relation to boron. *Plant Physiol.* **26**, 383-3388
- BENABDELKADER, A. 1971. Localisation intracellulaire de site de biosynthèse des acides gras polyinsaturés dans le tubercule de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) *C. R. Acad. Sci. Paris* **273**, 71-74.
- BENNETT, R.D., KO, S.T. y HEFTMANN, E. 1966. Isolation of estrone and cholesterol from date palm. *Phytochem.* **5**, 231-235.
- BERGAMINI MULCAHY, GT. y MULCAHY, D.L. 1983. A comparison of pollen tube growth in bi- and trinucleate pollen. *In* Pollen: Biology and Implication for Plant Breeding. D.L. Mulcahy y E. Ottaviano, eds. Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam. pp 29-33.
- BHATTACHARYYA, B. y GUPTA, K. 1983. Sterols in relation to ageing of seeds of *Helianthus annuus* and *Cicer arietinum*. *Phytochem.* **22**, 1913-1916.

BHOJWANI, S.S. y RAZDAN, M.K. 1983a. Haploid production. *In* Developments in Crop Science (5), Plant tissue culture: theory and practice. S.S. Bhojwani y M.K. Razdan, eds. Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam. pp 113-143.

BHOJWANI, S.S. y RAZDAN, M.K. 1983b. *In vitro* pollination. *In* Developments in Crop Science (5), Plant tissue culture: theory and practice. S.S. Bhojwani y M.K. Razdan, eds. Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam. pp 181-199.

BIELESKI, R.L. y LATIES, G.G. 1963. Turnover rates of phosphate esters in fresh and aged slices of potato tuber tissue. *Plant Physiol.* **38**, 586-594.

BITTER, T. y MUIR, H.M. 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* **41**, 330-334.

BLIGH, E.G. y DYER, W.S. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Biophys.* **37**, 911-917.

BLOWERS, D.P., HETHERINGTON, A. y TREWAVAS, A. 1985. Isolation of plasma-membrane-bound calcium/calmoduline-regulated protein kinase from pea using western blotting. *Planta* **166**, 208-215.

BONETTI, A., CERANA, R., LADO, P., MARRE, E., MARRE, M.T., y ROMANI, G. 1983. Mechanism of action of the pollen hormone brassinolide. *In* Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding. D.L. Mulcahy y E. Ottaviano, eds. Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam, pp 9-14.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.

BREWBAKER, J.L. y KWACK, B.H. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am. J. Bot.* **50**, 859-865.

CALZONI, G.L. y SPERANZA, A. 1986. Developmental stage of mature apple pollen: study of RNA and protein synthesis during *in vitro* germination. *Physiol. Veg.* **24**, 53-62.

CAPKOVA, V., HRABETOVA, E., TUPY, J. y RIHOVA, L. 1983a. Amino acid uptake and protein synthesis in cultured tobacco pollen. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* **178**, 511-520.

CAPKOVA, V., RIHOVA, L., HRABETOVA, E. y TUPY, J. 1983b. The effect of actinomycin D on the growth of tobacco pollen tubes. In *Fertilization and Embryogenesis in Ovulated Plants*. O. Erdelská, ed. Bratislava. pp 137-139.

CARMICHAEL, J.W. 1970. The effect of gibberellic acid on *in vitro* pollen germination in *Digitaria pentzii* Stent. *Proc. Soil. Crop Sci. Soc. Florida* **30**, 255-258.

CARON, B. 1972. Phospholipides et glycolipides du pollen et du style chez *Oenothera missouriensis* Sims espèce auto-incompatible. Ph. D. Thesis. University of Lille. Francia.

CARVER, B.F. y WILSON, R.F. 1984. Triacylglycerol metabolism in soybean seed with genetically altered unsaturated fatty acid composition. *Crop Sci.* **24**, 1020-1023.

CLICK, R.E. y HACKETT, D.P. 1963. The role of protein and nucleic acid synthesis in the development of respiration in potato tuber slices. *Proc. Nat. Acta Sci. USA* **50**, 243-250.

COUTREZ-GREERINCK, D. 1970. Réponse respiratoire de tissus de tubercule de *Solanum tuberosum* L. aux régulateurs vitaux présents dans leur partie centrale. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.* **103**, 225-241.

COX, R.M. 1983. Sensitivity of forest plant reproduction to long-range transported air pollutants: *in vitro* sensitivity of pollen to simulated acid rain. *New Phytol.* **95**, 269-276.

COX, R.M. 1984. Sensitivity of forest plant reproduction to long-range transported air pollutants: *in vitro* and *in vivo* sensitivity of *Oenothera parviflora* pollen to simulated acid rain. *New Phytol.* **97**, 63-70.

COX, R.M. 1986. Contamination and effects of cadmium in native plants. In *Cadmium in the Environment*, *Experientia supplementum* vol. 50. H. Mislin y O. Ravenna, eds. Birkhauser Verlag, Basel. pp 101-109.

COX, R.M. 1988. The sensitivity of pollen from various coniferous and broad-leaved trees to combinations of acidity and trace metals. *New Phytol.* **109**, 193-201.

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

CRESTI, M., CIAMPOLINI, F., PACINI, E., SAFARTEI, G. y DONINI, B. 1979b. Ultrastructural features of *Prunus avium* L. pollen tube *in vivo*. I. The compatible pollen tube. *Caryologia* **32**, 433-440.

CRESTI, M., CIAMPOLINI, F., PACINI, E., SAFARTEI, G., VAN WENT, J.L. y WILLEMSE, M.T.M. 1979a. Ultrastructural differences between compatible and incompatible pollen tubes in the stilar transmitting tissue of *Petunia hybrida*. *J. Submicrosc. Cytol.* **11**, 209-219.

CRESTI, M., CIAMPOLINI, F. y SAFARTEI, G. 1980. Ultrastructural investigations on *Lycopersicon peruvianum* pollen activation and pollen tube organization after self and cross-pollination. *Planta* **150**, 211-217.

CRESTI, M., CIAMPOLINI, F. y SAFARTEI, G. 1983. Ultrastructural features of *Malus communis* L. mature pollen. In *Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding*. D.L. Mulcahy y E. Ottaviano, eds. Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam. pp 165-172.

CRESTI, M., HEPLER, P.K., TIEZZI, A. y CIAMPOLINI, F. 1986. Fibrillar structures in *Nicotiana* pollen: changes in ultrastructure during pollen activation and tube emission. In *Biotechnology and Ecology of Pollen*. D.L. Mulcahy, G. Bergamini-Mulcahy y E. Ottaviano, eds. Springer-Verlag, New York. pp 283-288.

- CRESTI, M., LANCELLE, S.A. y HEPLER, P.K. 1987. Structure of the generative cell wall complex after freeze substitution in pollen tubes of *Nicotiana* and *Impatiens*. *J. Cell Sci.* **88**, 373-378.
- CRESTI, M., PACINI, E., CIAMPOLINI, F. y SARFATTI, G. 1977. Germination and early tube development *in vitro* of *Lycopersicum peruvianum* pollen: ultrastructural features. *Planta* **136**, 239-247.
- CRESTI, M., PACINI, E., SARFATTI, G. y SIMONCIOLI, C. 1975. Ultrastructural features and storage formation of *Lycopersicum peruvianum* pollen. *In Gamete Competition in Plants and Animals*. D.L.M. Mulcahy, ed., North Holland Publ. Co., Amsterdam, pp 19-23.
- CRESTI, M. y VAN WENT, J.L. 1976. Callose deposition and plug formation in *Petunia* pollen tubes *in situ*. *Planta* **133**, 35-40.
- CHANDLER, C. 1957. The effect of gibberellic acid on germination and pollen tube growth. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **19**, 215-244.
- CHAPMAN, D. 1985. Physicochemical properties of phospholipids and lipid-water systems. *In Liposome Technologie*. vol. I. Preparation of Liposomes. G. Gregoriadis, ed., CRC Press. Boca Ratón, Florida, pp 1-19.
- CHAPMAN, D. y LESLIE, R.B. 1970. Structure and function of phospholipids in membranes. *In Membranes of mitochondria and chloroplasts*. E. Racker, ed. Van Nostrand, New York. pp 91-126;
- CHAVAN, D.P. y KARADGE, B.A. 1980. Influence of salinity on mineral nutrition of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Soil* **54**, 5-13.
- CHERRY, J.H. 1968. Regulation of invertase in washed sugarbeet tissue. *In Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*. F. Wightman y G. Setterfield, eds. Runge Press, Ottawa. pp 417-431.
- CHING, T.M. y CHING, K.K. 1962. Fatty acids in pollen of some coniferous species. *Science*. **138**, 890-891.

- DASHEK, W.V. y HARWOOD, H.I.. 1974. Proline , hydroxyproline, and lily pollen tube elongation. *Ann. Bot.* **38**, 947-959.
- DESHUSSES, J., GUMBER, S.C., y LOEWUS, F.A. 1981. Sugar uptake in lily pollen. *Plant Physiol.* **67**, 793-796.
- DEVOR, K.A. y MUDD, J.B. 1971. Biosynthesis of phosphatidylcholine by enzyme preparations from spinach leaves. *J. Lipid. Res.* **12**, 403-411.
- DEXEIMER, J. 1968. Sur la synthèse d'acide ribonucléique par les tubes polliniques en croissance. *C. R. Acad. Sci. Paris* **267**, 2126-2128.
- DHALIWAL, A.S., MALIK, C.P. y SINGH. 1981. Overcoming incompatibility in *Brassica campestris* L. by carbon dioxide and dark fixation of the gass by self- and cross pollinated pistils. *Ann. Bot.* **48**, 227-233.
- DHAWAN, A.K. y MALIK, C.P. 1981. Effect of growth regulators and light on pollen germination and pollen tube growth in *Pinus roxburghii* Sarg. *Ann. Bot.* **47**, 239-248.
- DHINGRA, H.R. y VARGHESE, T.M. 1985a. Effect of salt stress on viability, germination and endogenous levels of some metabolites and ions in maize (*Zea mays* L.) pollen. *Ann. Bot.* **55**, 115-420.
- DHINGRA, H.R. y VARGHESE, T.M. 1985b. Effect of growth regulators on the *in vitro* germination and tube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen from plants raised under sodium chloride salinity. *New Phytol.* **100**, 563-569.
- DICKSON, M.H. y BOETTGER, M.A. 1984. Effects of high and low temperatures on pollen germination and seed set in snap beans. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **109**, 372-374.
- DIZENGREMEL, P. y KADER. J.C. 1980. Effect of aging on the composition of mitochondrial mebranes from potato slices. *Phytochem.* **19**, 211-214.

- DOUCE, R. 1964. Identification et dosage de quelques glycérolipides dans des suches normales et tumorales de scorsonère cultivées *in vitro*. C. R. Acad. Sci. Paris **259**, 3066-3068.
- DOWNTON, W.J.S. y LOVEYS, B.R. 1981. Abscisic acid content and osmotic relations of salt stressed grapevine leaves. Aus. J. Plant Physiol. **8**, 443-452.
- DOY, C.H., GRESSHOFF, P.M. y ROLFE, B. 1973. Transgenesis of bacterial genes from *Escherichia coli* to cultures of haploid *Lycopersicum esculentum* and haploid *Arabidopsis thaliana*. In The Biochemistry of Gene Expression in Higher Organisms. T.K. Pollak y J.W. Lee, eds. New Zealand Book Co., Sydney. pp 21-37.
- DUBAY, D.T. y MURDY, W.H. 1983a. The impact of sulphur dioxide on plant sexual reproduction: *in vivo* and *in vitro* effects compared. Journal of Environmental Quality **12**, 147-149.
- DUBAY, D.T. y MURDY, W.H. 1983b. Direct adverse effects of sulfur dioxide on seed set in *Geranium carolinianum* L.: a consequence of reduced pollen germination on the stigma. Bot Gaz. **144**, 376-381.
- EDELMAN, J. y HALL, M.A. 1965. Enzyme formation in higher plants tissues. Development of invertase and ascorbis acid oxidase activities in mature storage tissues of *Helianthus tuberosus* L. Biochem. J. **95**, 403-410.
- EKARATNE, S.N.R. y SENATHIRAJAH, S. 1983. Viability and storage of pollen of the oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq. Ann. Bot. **51**, 661-668.
- EVANS. D.E., ROTHNIE, N.E., PALMER, M.V., BURKE, D.G., SANG, J.P., KNOX, R.B., WILLIAMS, E.G., HILLIARD, E.P. y SALISBURY. P.A. 1987. Comparative analysis of fatty acids in pollen and seed of rapeseed. Phytochem. **26**, 1895-1897.
- FEDER, W.A. 1968. Reduction in tobacco pollen germination and tube elongation induced by low levels of ozone. Science **160**, 1122.

FEDER, W.A. 1981. Bioassaying for ozone with pollen systems. *Environmental Health Perspectives* 37, 117-123.

FERNANDEZ-FERNANDEZ, M.C. 1986. Estudio ultraestructural, citoquímico y morfométrico del grano de polen del olivo (*Olea europaea* L.) durante su formación. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

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

FERNANDEZ-FERNANDEZ, M.C. y RODRIGUEZ GARCIA, M.I. 1987. Comunicación del grano de polen del olivo con el exterior: microcanales en la exina y túbulos de la intina apertural. *Actas del VI Simposio de Palinología (A.P.L.E.)*. J. Civis-Llovera y M.F. Valle-Hernandez, eds. Salamanca. pp 387-394.

FERNANDEZ-FERNANDEZ, M.C. y RODRIGUEZ-GARCIA, M.I. 1988. Pollen wall development in *Olea europaea* L. *New Phytol.* 108, 91-99.

FERNANDEZ-ESCOBAR. 1981. Polinización y cuajado de frutos en cultivares de olivo (*Olea europaea*, L.) Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.

FERNANDEZ-ESCOBAR, R. GOMEZ-VALLEDOR, G. y RALLO, L. 1981. Germinación *in vitro* del polen de cultivares de olivo. *An. Est. Exp. Aula Dei* 15, 261-272.

FILITI, N. y MARCUCCI, M.C. 1982. Germinazione *in vitro* di polline di pero: influenza di alcuni fattori colturali. *Riv. Ortoflorofrutt. It.* 66, 201-216.

FORD, R.C. y BARBER, J. 1983. Incorporation of sterols into chloroplast thylakoid membranes and its effect on fluidity and function. *Planta* 158, 35-41.

FRANKE, W.W., HERTH, W., VAN DER WOUDE, J.W. y MORRE, J.D. 1972. Tubular and filamentous structures in pollen tubes: possible involvement as guide elements in protoplasmic streaming and vectorial migration of secretory vesicles. *Planta* 105, 317-341.

FRANKIS, R. y MASCARENHAS, J.P. 1980. Messenger RNA in the ungerminated pollen grain: a direct demonstration of its presence. *Ann. Bot.* **45**, 595-599.

GAD, A.E., ZEBWI, B. Z. y ALTMAN, A. 1988. Fusion of germinating watermelon pollen tubes with liposomes. *Plant Science* **55**, 69-75.

GÄRTEL, W. 1952. Pollenkeimversuche. *Iber. Biol. BundAnst. Land-u. Forstw. Braunschweig* **1952**, 105-106.

GAY, G., KERHOAS, C. y DUMAS, C. 1986a. Micro-isoelectric focusing of single pollen grains from *Cucurbita pepo* L. *Electrophoresis* **7**, 148-149.

GAY, G., KERHOAS, C. y DUMAS, C. 1986b. Pollen gene expression analysed by micro-isoelectric focusing of proteins from isolated pollen grains in *Cucurbita pepo* L. *Theor. Appl. Genet.* **73**, 47-52.

GAYLOR, K.R. y GLASZIOU, K.T. 1969. Plant enzyme synthesis, hormonal regulation of invertase and peroxidase synthesis in sugarcane. *Planta* **84**, 185-194.

GOSS, J.A. 1968. Development, physiology, and biochemistry of corn and wheat pollen. *Botan. Rev.* **34**, 333-358.

GRENIER, G., TREMOLIERES, A., THERRIEN, M.P. y WILLEMOT, C. 1973. Influence de froid sur la synthese des acides gras dans les racines de deux varietés de luzerne, l'une très resistente et l'autre moins resistente au froid. *Physiol. Veg.* **11**, 253-265.

GRIGGS, W.H., HARTMANN, H.T., BRADLEY, M.V., IWAKIRI, B.T. y WHISLER, J.E. 1975. Olive pollination in California. *Calif. Agric. Exp. Stn. Bull.* 869-919.

GUYE, M.G. 1987. Chilling and age related changes in the free sterol composition of *Phaseolus vulgaris* L. primary leaves. *Plant Sci.* **53**, 209-213.

HACKETT, D.P., HAAS, D.W., GRIFFITHS, S.K. y NIEDERPRUEM, D.J. 1960. Studies on the development of cyanide resistant respiration in potato tuber slices. *Plant Physiol.* **37**, 8-19.

HARA, A., YAMASHITA, H. y KOBAYASHI, A. 1977. Isolation of a polysaccharide from the inner cell wall, intine, of pollen of *Cryptomeria japonica*. *Plant Cell Physiol.* **18**, 381-386.

HAUBER, I., HERTH, W. y REISS, H.D. 1984. Calmodulin in tip-growing plant cells, visualized by fluorescing calmodulin-binding phenothiazines. *Planta* **162**, 33-39.

HELSPER, J.P.F.G., LINSKENS, H.F. y JACKSON J.F. 1984. Phytate metabolism in *Petunia* pollen. *Phytochem.* **23**, 1841-1845.

HELSPER, J.P.F.G., De GROOT, P.F.M., LINSKENS H.F. y JACKSON, J.F. 1986. Phosphatidylinositol monophosphate in *Lilium* pollen and turnover of phospholipids during pollen tube extension. *Phytochem.* **25**, 2193-2199.

HELSPER, J.P.F.G. y PIERSON, E.S. 1986. The effect of lectins on germinating pollen of *Lilium longiflorum*. II. Effect of concanavalin A on phospholipid turnover and on biosynthesis of pectic polysaccharides. *Acta Bot. Neerl.* **35**, 257-263.

HERRERO, M.P. y JOHSON, R.R. 1980. High temperature stress and pollen viability of maize. *Crop Sci.* **20**, 796-800.

HESLOP-HARRISON, J. 1979. Aspects of the structure, cytochemistry and germination of the pollen of rye (*Secale cereale* L.). *Ann. Bot.* **44**, 1-49.

HESLOP-HARRISON, J. y HESLOP-HARRISON, Y. 1982. The growth of the grass pollen tube. I. Characteristics of the polysaccharide particles ("P-particles") associated with apical growth. *Protoplasma* **112**, 71-80.

HESLOP-HARRISON, J. y HESLOP-HARRISON, Y. 1985. Germination of stress-tolerant *Eucalyptus* pollen. *J. Cell Sci.* **73**, 135-157.

HESS, D. y WAGNER, G. 1974. Induction of haploid parthenogenesis in *Mimulus luteus* by *in vitro* pollination with foreign pollen. Z. Pflanzenphysiol. 72, 466-468.

HOEBERICHTS, J.A. y LINSKENS, H.F. 1968. Lipids in ungerminated pollen of *Petunia*. Acta Botan. Neerl. 17, 433-436.

HOEKSTRA, F.A. y BRUINSMA, J. 1979. Protein synthesis in binucleate and trinucleate pollen and its relationship to tube emergence and growth. Planta 146, 559-566.

HOKIN, L.E.. 1985. Receptors and phosphoinositide-generated second messengers. Ann. Rev. Biochem. 54, 205-237.

HONSON, T. y WADA, S. 1980. Role of hydroxyproline-rich cell wall protein in growth regulation of rice coleoptiles grown on or under water. Plant Cell Physiol. 21, 511-524.

HOUSTON, D.B. y DOCHINGER, L.S. 1977. Effects of ambient air pollution on cone, seed and pollen characteristics in eastern white and red pines. Environmental Pollution 12, 1-55.

HOWARD, H.W. y WITHAM, F.H. 1983. Invertase activity and the kinetin stimulated enlargement of detached raddish cotyledons. Plant Physiol. 73, 304-308.

HU, H. 1978. Advances in anther culture investigations in China. In Proceedings of the Symposium on Plant Tissue Culture. Science Press, Peking. pp 3-10.

IAPICHINO, G.F. y LOY, J.B. 1987. High temperature stress affects pollen viability in bottle gourd. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112, 372-374.

JACKSON, J.F. y LINSKENS, H.F. 1978. Evidence for DNA repair after ultraviolet irradiation of *Petunia hybrida* pollen. Mol. Gen. Genet. 161, 117-120.

- JACKSON, J.F. y LINSKENS, H.F. 1979. Pollen DNA repair after treatment with the mutagens 4-nitroquinoline-1-oxide, ultraviolet and near-ultraviolet irradiation and boron dependence of repair. *Mol. Gen. Genet.* **176**, 11-16.
- JACKSON, J.F. y LINSKENS, H.F. 1980. DNA repair in pollen: range of mutagens inducing repair, effect of replication inhibitors and changes in thymidine nucleotide metabolism during repair. *Mol. Gen. Genet.* **180**, 517-522.
- JACKSON, J.F. y LINSKENS, H.F. 1982. Phytic acid in *Petunia hybrida* pollen is hydrolyzed during germination by a phytase. *Acta Bot. Neerl.* **31**, 444-447.
- JAENICKE, R. 1981. Enzymes under extremes of physical conditions. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **10**, 1-67.
- KAHANE, I. y POLJAKOFF-MAYBER, A. 1968. Effect of substrate salinity on the ability for protein synthesis in pea roots. *Plant Physiol.* **43**, 1115-1119.
- KAMBOJ, R.K. y JACKSON, J.F. 1985. Pyrimidine nucleoside uptake by *Petunia* pollen. *Plant Physiol.* **79**, 801-805.
- KAMIENSKA, A., DURLEY, R.C. y PHARIS, R.P. 1976. Isolation of gibberellins A₃, A₄, and A₇ from *Pinus attenuata* pollen. *Phytochem.* **15**, 421-424.
- KAMIENSKA, A. y PHARIS, R.P. 1975. Endogenous gibberellins of pine pollen. II. Changes during germination of *Pinus attenuata*, *P. coulteri* and *P. ponderosa* pollen. *Plant Physiol.* **56**, 655-659.
- KARNOSKY, D.F. y STAIRS, G.F. 1974. The effects of SO₂ on in vitro forest tree pollen germination and tube elongation. *Journal of Environmental Quality* **3**, 406-409
- KASHA, K.J. y KAO, K.N. 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Nature* **225**, 874-876.

KASHA, K.J., SUBRAHMANYAM, N.C. y ALI, A. 1978. Effect of gibberellic acid treatment, and nutrient supply through detached tillers, upon haploid frequency in barley. *Theor. Appl. Genet.* **51**, 169-175.

KELLER, W.A. y STRINGAM, G.R. 1978. Production and utilization of microspore-derived haploid plants. *In* *Frontiers of Plant Tissue Culture*. T. Thorpe, ed. University of Calgary Press, Canada. pp 113-122.

KLEINHANS, F.W., LEES, N.D., BARD, M., HAAK, R.A. y WOODS, R.A. 1979. ESR determinations of membrane permeability in a yeast sterol mutant. *Chem. Phys. Lipids* **23**, 143-154.

KLIS, F.M. 1976. Glycosylated seryl residues in wall protein of elongating pea stems. *Plant Physiol.* **57**, 224-226.

KONAR, R.N. 1958. Effect of IAA and kinetin on the pollen tube growth of *Pinus roxburghii* Sar. *Curr. Sci.* **27**, 216-217.

KRESS, W.J. y STONE, D.E. 1983. Pollen intine structure, cytochemistry and function in monocots. *In* *Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding*. D.L. Mulcahy y E. Ottaviano, eds. Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam. pp 159-163.

KROH, M. y KNUIMAN, B. 1982. Ultrastructure of cell wall and plugs pollen tubes after chemical extraction of polysaccharides. *Planta* **154**, 241-250.

KWIATKOWSKI, A. 1964. The chemical composition of pollen. III. The ethyl ether extract. *Acta Soc. Botan. Polon.* **33**, 547-556.

KYO, M. y HARADA, H. 1986. Control of the developmental pathway of tobacco pollen *in vitro*. *Planta* **168**, 427-432.

LAFLEUR, G.J. y MASCARENHAS, J.P. 1978. The dependence of generative cell division in *Tradescantia* pollen tubes on protein and RNA synthesis. *Plant Sci. Lett.* **12**, 251-255.

LAMPOR, D.T.A. 1965. The protein component of primary cell wall. *Adv. Bot. Res.* 2, 151-218.

LAMPOR, D.T.A. y CATT, J.W. 1981. Glycoproteins and enzymes of the cell wall. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. 13 B: Plant carbohydrates II. A. Pirson y M.H. Zimmermann, eds. Springer-Verlag, Berlin. pp 133-165.

LARSON, D.A. 1965. Fine structural changes in the cytoplasm of germinating pollen. *Am. J. Bot.* 52, 139.

LATIES, G.G. 1967. The onset of tricarboxylic cycle activity with aging in potato slices. *Plant Physiol.* 39, 654-666.

LEAVER, C.J. y KEY, J.L. 1967. Polyribosome formation and RNA synthesis during aging of carrot root tissue. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 57, 1338-1344.

LECHEVALLIER, D. 1966. Les lipides des Lemnacées: Analyses des acides gras des lipides des frondes de *Spirodela polyrrhiza*. *C. R. Acad. Sci. Paris* 263, 1489-1852.

LEE, S.S. y CHASSON, R.M. 1966. Aging and development of enhanced respiratory activity in potato tuber tissue. *Physiol. Plant.* 19, 194-198.

LEE, C.W., THOMAS, J.C. y BUCHMANN, S.L. 1985. Factors affecting *in vitro* germination and storage of Jojoba pollen. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110, 671-676.

LEES, G.L. y THOMPSON, J.E. 1980. Lipid composition and molecular organization in plasma membrane-enriched fractions from senescing cotyledons. *Physiol. Plant.* 49, 215-221.

LINSKENS, H.F., SCHRAUWEN, J.A.M. y KONINGS, R.N.H. 1970. Cell-free protein synthesis with polysomes for germinating *Petunia* pollen grains. *Planta* 90, 153-162.

LOEWUS, F.A., BALDI, B.G., FRANCESCHI, V.R., MEINERT, L.D. y McCOLLUM, J.J. 1985. Pollen sporoplasts: Dissolution of pollen walls. *Plant. Physiol.* **78**, 652-654.

LOUGHMAN, B.C. 1960. Uptake and utilization of phosphate associated with respiratory changes in potato tuber slices. *Plant Physiol.* **35**, 418-424.

LOVATT, C.J. y DUGGER, W.M. 1984. Boron. *In Biochemistry of the essential ultratrace elements*. E. Frieden, ed. Plenum Publishing Co. pp 389-421.

LUZA, J.G. y POLITO, V.S. 1985. *In vitro* germination and storage of english walnut pollen. *Scientia Horticulturae* **27**, 303-316.

MALIK, C.P. y CHAWLA, J. 1983. Effect of carbon dioxide on lipid metabolism in *Crotalaria juncea* pollen suspension culture. *Phytochem.* **22**, 297-298.

MALIK, C.P. y CHHABRA, N. 1976. Hormonal regulation of pollen germination and tube elongation in *Arachis hypogaea*. *Proc. Ind. Acad. Sci.* **84**, 101.

MALIK, C.P. y CHHABRA, N. 1978. Groundnut pollen germination and its control mechanism. *In Physiology of Sexual Reproduction in Flowering Plants*. C.P. Malik, ed. Kalyani Publishers, Delhi, India. pp 24-26.

MANGOLD, H.K. 1961. Thin layer chromatography of lipids. *J. Am. Oil Chemist Soc.* **38**, 708-727.

MANN, J.D. 1975. Mechanism of action of gibberellins. *In Gibberellins and Plant Growth*. H.N. Krishnamoorthy, ed. Wiley and Sons, New York. pp 239-287.

MARRE, E., LADO, P., RASI-CALDOGNO, F., COLOMBO, R., COCCUCI, M. y DE MICHELIS, M.I. 1975. Regulation of proton extrusion by plants hormones and cell elongation. *Physiol. Veg.* **13**, 797-811.

MASARU, N., KATSUHISA, F., SANKICHI, T. y YUTAKA, W. 1980. Effects of inorganic components in acid rain on tube elongation of *Camellia* pollen. *Environ. Pollut. Ser. A* **21**, 51-57.

- MASCARENHAS, J.P. 1966. Pollen tube growth and ribonucleic acid: synthesis by vegetative and generative nuclei of *Tradescantia*. *Am. J. Bot.* **53**, 563-569.
- MASCARENHAS, J.P. y BELL, E. 1969. Protein synthesis during germination of pollen: studies on polyribosome formation. *Biochim. Biophys. Acta* **179**, 199-203.
- MASCARENHAS, J.P. y BELL, E. 1970. RNA synthesis during development of the male gametophyte of *Tradescantia*. *Develop. Biol.* **21**, 475-490
- MASCARENHAS, J.P. y GORALNICK, R.D. 1971. Synthesis of small molecular weight RNA in the pollen tube of *Tradescantia paludosa*. *Biochim. Biophys. Acta* **240**, 56-61.
- MASCARENHAS, J.P. 1975. The biochemistry of Angiosperm pollen development. *Bot. Rev.* **41**, 259-314.
- MASCARENHAS, J.P. y ALTSCHULER, M. 1983. The response of pollen to high temperatures and its potential applications. In *Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding*. D.L. Mulcahy y E. Ottaviano, eds. Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam. pp 3-8.
- MASUDA, Y. 1966. Auxin induced growth of tuber tissue of Jerusalem artichoke. II. The relation to protein and nucleic acid metabolism. *Plant Physiol.* **7**, 75-91.
- MATTSSON, O. 1983. The significance of exine oils in the initial interaction between pollen and stigma in *Armeria maritima*. *Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding*. D.L. Mulcahy y E. Ottaviano, eds. Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam. pp 257-264.
- McCONCHIE, C.A., RUSSELL, S.D., DUMAS, C., TUOHY, M. y KNOX, R.B. 1987. Quantitative cytology of the sperm cells of *Brassica campestris* and *B. oleracea*. *Planta* **170**, 446-452.

- McDONALD, I.R. y LATIES, G.G. 1962. Kinetics studies of anion absorption by potato slices at 0 °C. *Plant Physiol.* **38**, 38-44.
- McILWAIN, D.L. y BALLOU, C.E. 1966. Characterization of the phospholipids in *Pinus ponderosa* pollen. *Biochemistry* **5**, 4054-4061.
- McLEOD, K.A. 1975. The control of growth of tomato pollen. *Ann. Bot.* **39**, 591-596.
- METCALFE, L.D., SCHMITZ, A.A. y PELKA, J.R. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* **38**, 514-515.
- MIMURA, T. y TAZAWA, M. 1986. Analysis of rapid light-induced potential change in cells of *Chara corallina*. *Plant Cell Physiol.* **27**, 895-902.
- MINORSKY, P.V. 1985. A heuristic hypothesis of chilling injury in plants: a role for calcium as the primary physiological transducer of injury. *Plant Cell and Environment* **8**, 75-94.
- MISHRA, K.P., YOSHUA, D.C. y BHATIA, C.R. 1987. *In vitro* electroporation of tobacco pollen. *Plant Sci.* **52**, 135-139.
- MIZRAHI, Y., BLUMENFELD, A. y RICHMOND, A.E. 1970. Abscisic acid and transpiration in leaves in relation to osmotic stress. *Plant Physiol.* **46**, 169-171.
- MIZRAHI, Y., BLUMENFELD, A. y RICHMOND, A.E. 1972. The role of abscisic acid and salination in adaptive response of plants to reduced root aeration. *Plant Cell Physiol.* **13**, 15-21.
- MOGENSEN, H.L. 1986. Juxtaposition of the generative cell and vegetative nucleus in the mature pollen grain of amaryllis (*Hippeastrum vitatum*). *Protoplasma* **134**, 67-72.

MOLLENHAUER, M.M. y MORRE, D.J. 1980. The Golgy Apparatus. In The Biochemistry of Plant. Vol. 1, The Plant Cell. P.K. Stumpf y E.E. Conn, eds. Academic Press Inc., New York. pp 437-488.

MORRE, D.J., NYHVIST, S. y HAMMOND, W.E. 1970. Lecithin biosynthesis of onion stem and the distribution of phosphorylcholine-cytidyl-transferase among cell fractions. Plant Physiol. 45, 800-804.

MURDY, W.H. 1979. Effects of SO₂ on sexual reproduction in *Pipidium virginicum* L. originating from regions with different SO₂ concentrations. Botanical Gazette 140, 299-303.

NAKAMURA, S., MIKI-HIROSHIGE, H. y IWANAMI, Y. 1979. On the mechanisms of callose wall and callose plug formation in germinating pollen. Jpn. J. Palyn. 24, 33-44.

NAKAMURA, N., SADO, M. y ARAI, Y. 1980a. Sucrose metabolism during the growth of *Camellia Japonica* pollen. Phytochem. 19, 205-209.

NAKAMURA, N., YOSHIDA, K. y SUZUKI, H. 1980b. Hemicellulose of the pollen tube wall of *Camellia japonica*. Plant Cell Physiol. 21, 1383-1390.

NAKAMURA, N. y SUZUKI, H. 1981. Sugar composition of pollen grain and pollen tube cell walls. Phytochem. 20, 981-984.

NAKAMURA, N. y SUZUKI, H. 1985. Inhibition of *Camellia japonica* pollen tube growth by maltose. Plant Cell Physiol. 26, 1011-1018.

NAQVI, S.M. y ANSARI, R. 1974. Estimation of diffusible auxin under saline growth conditions. Experientia 30, 350-354.

NICHOLS, B.W. 1964. Separation of plant phospholipids and glycolipids. In New Biochemical Separations. A.T. James y L.J. Morris, eds. Van Nostrand, Princeton. New York. pp 321-337.

NIIZEKI, M. 1977. Haploid, polyploid and aneuploid plants from cultures anthers and calluses in species of *Nicotiana* and forage crops. J. Fac. Agric. Hokkaido Univ. 58, 343-366.

NITSCH, J.P. 1952. Plant hormones in the development of fruits. Quart. Rev. Biol. 27, 33-57.

NOBILING, R. y REISS, H.D. 1987. Quantitative analysis of calcium gradients and activity in growing pollen tubes of *Lilium longiflorum*. Protoplasma 139, 20-24.

NYGAARD, P. 1969. Studies on the germination of pine pollen (*Pinus mugo*) *in vitro*. I. Growth conditions and effects of pH and temperature on germination, tube growth and respiration. Physiol. Plant. 22, 338-346.

OHTA, Y. 1986. High-efficiency genetic transformation of maize by a mixture of pollen and exogenous DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 715-719.

O'KELLEY, J.C. 1957. Boron effects on growth, oxygen uptake and sugar absorption by germinating pollen. Am. J. Bot. 44, 239-244.

PATTERSON, B.D., MUTTON, L., PAULL, R.E., y NGUYEN, Q. 1987. Tomato pollen development: stages sensitive to chilling and a natural environment for the selection of resistant genotypes. Plant Cell and Environment 10, 363-368

PEDDADA, L.B. y MASCARENHAS, J.P. 1975. The synthesis of 5S ribosomal RNA during pollen development. Dev. Growth Differ. 17, 1-8.

PFAHLER, P.L., WILCOX, M., MULCAHY, B.L. y KNAUFT, D.A. 1982. *In vitro* germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen. X. Pollen source genotype and gibberellin A₃ interactions. Acta Bot. Neerl. 31, 105-111.

PICTON, J.M. y STEER, M.W. 1982. A model for the mechanism of tip extension in pollen tubes. J. Theor. Biol. 98, 15-20.

PICTON, J.M. y STEER, M.W. 1983. Evidence for the role of Ca^{2+} ions in tip extension in pollen tubes. *Protoplasma* 115, 11-17.

POLITO, V.S. 1983. Calmodulin and calmodulin inhibitors: effects on pollen germination and tube growth. In *Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding*. D.L. Mulcahy y E. Ottaviano, eds. Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam. pp 53-60.

POLYA, G.M., MICUCCI, V., RAE, A.L., HARRIS, P.J. y CLARKE, A.E. 1986. Ca^{2+} -dependent protein phosphorylation in germinated pollen of *Nicotiana alata*, an ornamental tobacco. *Physiol. Plant.* 67, 151-157.

POOLE, R.J. 1978. Energy coupling for membrane transport. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29, 437-460.

POOVAIAH, B.W., REDDY, A.S.N., McFADDEN, J.J. 1987. Calcium messenger system: role of protein phosphorylation and inositol phospholipids. *Physiol. Plant.* 69, 569-573.

PRIESTLEY, D.A., WERNER, B.G., LEOPOLD, A.C. y McBRIDE, M.B. 1985. Organic free radical levels in seeds and pollen: the effect of hidratation and ageing. *Physiol. Plant.* 64, 88-94.

RAE, A.L., HARRIS, P.J., BACIC, A. y CLARKE, A.E. 1985. Composition of the cell walls of *Nicotiana alata* Link et Otto pollen tubes. *Planta* 166, 128-133.

RAGHAVAN, V. 1984. Protein synthetic activity during normal pollen development and during induced pollen embryogenesis in *Hyoscyamus niger*. *Can. J. Bot.* 62, 2493-2513.

RANGASWAMY, N.S. y SHIVANNA, K.R. 1967. Induction of gamete compatibility and seed formation in axenic cultures of a diploid self-incompatible species of *Petunia*. *Nature* 216, 937-939.

- RANGASWAMY, N.S. y SHIVANNA, K.R. 1971. Overcoming self-incompatibility in *Petunia axillaris*. II. Placental pollination in vitro. J. Indian Bot. Soc. 50, 286-296.
- RAYLE, D.L. y CLELAND, R.E. 1980. Evidence that auxin-induced growth of soybean hypocotyls involves proton excretion. Plant Physiol. 66, 433-437.
- REDDY, P.R. y GOSS, J.A. 1971. Effect of salinity on pollen I. Pollen viability as altered by osmotic pressure with NaCl, MgCl₂ and CaCl₂. Am. J. Bot. 58, 721-725.
- REISS, H.D. y HERTH, W. 1978. Visualization of the Ca²⁺ gradient in growing pollen tubes of *Lilium longiflorum* with chlorotetracycline fluorescence. Protoplasma 97, 373-377.
- REISS, H.D. y HERTH, W. 1979. Calcium ionophore A23187 affects localized wall secretion in the tip region of pollen tubes of *Lilium longiflorum*. Planta 145, 225-232.
- REISS, H.D., HERTH, W., SCHNEPPF, E. y NOBILING, R. 1983. The tip-to-base calcium gradient in pollen tubes of *Lilium longiflorum* measured by proton-induced X-ray emission (PIXE) Protoplasma 115, 153-159.
- REISS, H.D., GRIME, G.W., LI, M.Q., TAKACS, J. y WATT, F. 1985b. Distribution of elements in the lily pollen tube tip, determined with the Oxford scanning proton microprobe. Protoplasma 126, 147-152.
- REISS, H.D. y HERTH, W. 1982. Disoriented growth of pollen tubes of *Lilium longiflorum* thunb. induced by prolonged treatment with the calcium-chelating antibiotic, chlrotetracycline. Planta 156, 218-225.
- REISS, H.D. y HERTH, W. 1985. Nifedipine-sensitive calcium channels are involved in polar growth of lily pollen tubes. J. Cell. Sci. 76, 247-254.

REISS, H.D., HERTH, W. y NOBILING, R. 1985a. Development of membrane- and calcium-gradients during pollen germination of *Lilium longiflorum*. *Planta* 163, 84-90.

ROGGEN, H.P. y STANLEY, R.G. 1971. Autoradiographic studies of pear pollen tube walls. *Physiol Plant.* 24, 80-84.

ROLDAN, M., RODRIGUEZ-ROSALES, M.P., BELVER, A. y DONAIRE, J.P. 1988. Extrusión de H⁺ en raíces de plántulas de girasol y actividad H⁺-ATPasa en vesículas microsomales enriquecidas en plasmalema: acción del boro. *En Nutrición Mineral de las Plantas. II Simposio Nacional. Ediciones del Instituto de Ciencias de la Educación. Univ. Granada.* pp 419-427.

ROSEN, W.G. 1968. Ultrastructure and physiology of pollen. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 19, 435-462.

ROSEN, W.G. 1971. Pollen tube growth and fine structure. *In Pollen Development and Physiology*, J. Heslop-Harrison, ed. Butterworths Co., London. 239-254.

ROSEN, W.G., GAWLIK, S.R., DASHEK, W.V., SIEGESMUND, K.A. 1964. Fine structure and cytochemistry of *Lilium* pollen tubes. *Amer. J. Bot.* 51, 61-71.

ROSEN, W.G. y GAWLICK, S.R. 1966. Fine structure of *Lily* pollen tubes following various fixation and staining procedures. *Protoplasma* 61, 181-191.

RUTHERFORD, P.P. y BARD, D.R. 1971. Water uptake and invertase and hydrolase activities in chicory root discs by treatment with various plant growth regulators. *Phytochem.* 10, 1635-1638.

SADEN-KREHULA, M., TAJIC, M. y KOLBAH, D. 1971. Investigation on some steroid hormones and their conjugates in pollen of *Pinus nigra* separating steroids by thin-layer chromatography. *Experientia* 27, 108-110.

SAFTNER, R.A. y WYSE, R.E. 1984. Effect of plant hormones on sucrose uptake by sugarbeet root tissue discs. *Plant Physiol.* 74, 951-955.

SASSEN, M.M.A. 1964. Fine structure of *Petunia* pollen grain and pollen tube. Acta Bot. Neerl. 13, 175-181.

SATAKE, T. 1976. Determination of the most sensitive stage to sterile-type cool injury in rice plants. Res. Biol. Hokkaido Natl. Agric. Exp. Stn. 113, 1-35.

SATO, T. ISHIZUDA, M. WATANABE, A. y IMASEKI, H. 1980. The synthesis and properties of polysomal RNA in potato tuber slices during the early stage of aging. Plant Cell Physiol. 21, 137-147.

SCHAFFNER, W. y WEISSMANN, C. 1973. A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. Analytical Biochemistry 56, 502-514.

SCHMUCKER, T. 1932. Bor als physiologisch entscheidendes element. Naturwissenschaften 20, 839.

SCOTT, J.J. y LOEWUS, F.A. 1986. A calcium-activated phytase from pollen of *Lilium longiflorum*. Plant Physiol. 82, 333-335.

SCOTT, R.W. y STROHL, M.J. 1962. Extraction and identification of lipids from loblolly pine pollen. Phitochem. 1, 189-193.

SEKIYA, J., YAMASHITA, K., NAKAGAWA, S., SHIBATA, Y. y HATANAKA, A. 1988. Phospholipids of tea pollen. Agric. Biol. Chem. 52, 243-247.

SERRANO, R. 1985. In Plasma membrane ATPase of plants and fungi. CRC Press. Boca Ratón, Florida. 163 pp.

SFAKIOTAKIS, E.M., SIMMONS, D.H. y DILLEY, D.R. 1972. Pollen germination and tube growth. Dependent on carbon dioxide and independent of ethylene. Plant Physiol. 49, 963-967.

SHIBUYA, T., FUNAMIZU, M. y KITAHARA, Y. 1978. Abscisic acid from *Pinus densiflora* pollen. Phytochem. 17, 322-323.

SHIVANNA, K.R. y HESLOP-HARRISON, J. 1981. Membrane state and pollen viability. *Ann. Bot.* **47**, 759-770.

SIDHU, R.K., BASRA, A.S. y MALIK, C.P. 1986. Hormonal effects on tube elongation, $^{14}\text{CO}_2$ fixation and phosphoenolpyruvate carboxylase activity in amaryllis pollen: promotion by abscisic acid. *Plant Growth Reg.* **4**, 293-298.

SINGH, G. y SINGH, H. 1980. Effect of growth regulators on the growth and yield parameters of chickpea grown under different salinity levels. *Indian Journal of Agricultural Sciences* **50**, 23-30.

SMITH, M.A. 1981. Characterization of carrot cell wall protein. I. Effect of α , α' -dypiridyl on cell wall protein synthesis and secretion in incubation carrot discs. *Plant Physiol.* **68**, 956-963.

SONDHEIMER, E. y LINSKENS, H.F. 1974. Control of *in vitro* germination and tube extension of *Petunia hybrida* pollen. *Proc. Kon. Nederl. Akad. Wet. Ser. C.* **77**, 116-124.

SOSA, A. y SOSA-BOURDOUIL, C. 1952. The chemical composition of the pollen of *Corylus avellana*. *C. R. Acad. Sci.* **235**, 971.-973.

SPERANZA, A. y CALZONI, G.L. 1980. Compounds released from incompatible apple pollen during *in vitro* germination. *Z. Pflanzenphysiol.* **97**, 95-102.

SPERANZA, A., CALZONI, G.L. y BAGNI, N. 1983. Effect of exogenous polyamines on *in vitro* germination of apple pollen. *In Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding*. D.L. Mulcahy y E. Ottaviano, eds. Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam. pp 21-27.

SPERLING, E. y LATIES, G.G. 1963. The dependence of auxin-induced growth on auxin-dependent metabolic changes in slices of storage tissue. *Plant Physiol.* **38**, 546-550.

SOUTHWORTH, D. 1983. pH changes during pollen germination in *Lilium longiflorum*. *In Pollen: Biology and Implications for Plant Breeding*. D. L.

Mulcahy y E. Ottaviano, eds. Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam. pp 61-65.

STANDIFER, L.N. 1966. Fatty acids in dandelion pollen gathered by honey bees, *Apis mellifera*. Ann. Entomol. Soc. Am. **59**, 1005-1007.

STANLEY, R.G. y LOEWUS, F.A. 1964. Boron and myo-inositol in pollen pectin biosynthesis. In Pollen: Physiology and Fertilization. H.F. Linskens, ed. Elsevier Science Publishing, Amsterdam. pp 128-136.

STANLEY, R.G., y LINSKENS, H.F. 1974. Organic acids, lipids and sterols. In Pollen: Biology, Biochemistry and Management. R.G. Stanley y H.F. Linskens, eds. Springer-Verlag, Berlin. pp 145-153.

STANLEY, R.G. y POOSTCHI, I. 1962. Endogenous carbohydrates, organic acids, and pine pollen viability. Silvae Genet. **11**, 1-3.

SÜS, J. y TUPY, J. 1978. RNA synthesis in germinating pollen. Biol. Plant. **20**, 70-72.

SWEET, G.B. y LEWIS, P.N. 1971. Plant growth substances in pollen of *Pinus radiata* at different levels of germination. N. Z. J. Bot. **9**, 146-156.

TAGLIASACCHI, A.M., FORINO, L.M.C., BELLANI, L.M. y AVANZI, S. 1985. Dynamics of pollen grain germination in two cultivars of *Malus domestica*: the influence of actinomycin D on fresh and stored pollen grains. Ann. Bot. **56**, 29-33.

TAL, M. 1977. Physiology of polyploid plants: DNA, RNA, protein and abscisic acid in autotetraploid and diploid tomato under low and high salinity. Physiol. Plant. **38**, 257-261.

TANAKA, I., KITAZUME, C. y ITO, M. 1987. The isolation and culture of lily pollen protoplasts. Plant Sci. **50**, 205-211.

TANG, P.M. y DE LA FUENTE, R.K. 1986. The transport of Indole-3-Acetic acid in boron- and calcium-deficient sunflower hypocotyl segments. *Plant Physiol.* 81, 646-650.

TORIYAMA, S., HINATA, K., NISHIDA, I. y MURATA, N. 1987. Lipids from rice anthers. In *The Metabolism, Structure and Function of Plant Lipids*. P.K. Stumpf, J.B. Mudd y W.D. Nes, eds. Plenum Press, New York. pp 345-347.

TREMOLIERES, A. 1970. Les lipides des tissus photosynthétiques. *Anal. Biol.* 9, 133-156.

TREMOLIERES, A. y LEPAGE, M. 1971. Changes in lipid composition during greening of etiolated pea seedling. *Plant Physiol.* 47, 329-334.

TSINGER, N.V. y PETROVSKAYA-BARANOVA, T.P. 1967. Formation and physiological role of callose pollen tube plugs. *Plant physiol.* 14, 404-410.

TUPY, J. 1977. RNA synthesis and polysome formation in pollen tubes. *Biol. Plant.* 19, 300-308.

TUPY, J., HRABETOVA, E. y BALATKOVA, V. 1977. Evidence for ribosomal RNA synthesis in pollen tubes in culture. *Biol. Plant* 19, 226-230.

TUPY, J., SÜSS, J. y RIHOVA L. 1986. RNA synthesis and ribosome status in pollen tube growth of *Nicotiana tabacum* L.; effects of external pH. *J. Plant Physiol.* 123, 467-476.

UWATE, W.J. y LIN, J. 1980. Cytological zonation of *Fraxus avium* L. pollen tubes *in vivo*. *J. Ultrastruct. Res.* 71, 173-184.

VAE RYN, D.E., JACOBSON, J.S. y LASSOIE, J.P. 1986. Effects of acidity on *in vitro* pollen germination and tube elongation in four hardwood species. *Can. J. For. Res.* 16, 397-400.

- VASIL, J.K. 1964. Effect of boron on pollen germination and pollen tube growth. Int. Symp. Pollen Physiol. Fert. Univ. Nijmegen, The Netherlands. pp 107-19.
- VAUGHAN, D. y McDONALD, I.R. 1967. The effect of inhibitors on the increase in the invertase activity and RNA content of beet disks during aging. J. Exp. Bot. 18, 587-593.
- VERLEUR, J.D. 1969. Observation on the induction of mitochondrial particles in potato tuber tissue after wounding. Z. Pflanzenphysiol. 61, 299-309.
- VINCENZI, F.F., HINDS, T.R. y RAESS, B.U. 1980. Calmodulin and the plasma membrane calcium pump. Ann. N. Y. Acad. Sci. 356, 232-244.
- VORBECK, M.L. y MARTINETTI, G.V. 1965. Separation of glycosyl diglycerides from phosphatides using silicic acid column chromatography. J. Lipid. Res. 6, 3-6.
- WADA, S. y RAY, P.M. 1978. Matrix polysaccharides of oat coleoptile cell walls. Phytochem. 17, 923-931.
- WALDMANN, T., JEBLICK, W. y KAUSS, H. 1988. Induced net Ca^{2+} uptake and callose biosynthesis in suspension-cultured plant cells. Planta 173, 88-95.
- WEAVER, M.L., TIMM, H., SILBERNAGEL, M.J. y BURKE, D.W. 1985. Pollen staining and high-temperature tolerance of bean. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110, 797-799.
- WEBER, L.A., HICKEY, E.D., MARONEY, P.A. y BAGLIONI, C. 1977. Inhibition of protein synthesis by chloride ion. J. Biol. Chem. 252, 4007-4010.
- WEBBER, J.E. 1988. The role of plant growth regulators in the development and germination of conifer pollen. Plant Growth Reg. 6, 217-236.

WEIMBERG, R., LERNER, H.R. y POLYAKOFF-MAYBER, A. 1981. Kinetics of toluene-induced leakage of low molecular weight solutes from excised sorghum tissues. *Plant Physiol.* **68**, 1433-1438.

WEISENSEEL, M.H. y JAFFE, L.F. 1977. The major growth current through lily pollen tubes enters as potassium ions and leaves as protons. *Planta*, **133**, 1-7.

WEISENSEEL, M.H. y KICHERER, R.M. 1981. Ionic currents as control mechanism in cytomorphogenesis. *In Cell Biol. Monographs vol.8, Cytomorphogenesis in Plants.* O. Kiermayer, ed. Springer-Verlag, Viena. pp 379-399.

WHALEY, W.G., DAUWALDER, M. y KEPHART, J.P. 1971. Assembly, continuity and exchange in certain cytoplasmic membrane systems. *In Origin and Continuity of Cell Organelles.* J. Reinert y H. Ursprung, eds. Springer-Verlag Pub., Berlín, pp 1-45.

WHIPPLE, A.P. y MASCARENHAS, J.P. 1975. Lipid synthesis in germinating *Tradescantia* pollen. *Phytochem.* **17**, 1273-1274.

WILLEMOT, C., STUMPF, P.K. 1967. Fat metabolism in higher plants. XXXIV. Development of fatty acid synthetase as a function of protein synthesis in a aging potato tuber slices. *Plant Physiol.* **42**, 391-397.

WOLOSIUK, R.A. y PONTIS, H.G. 1974. The role of sucrose and sucrose synthetase in carbohydrate plant metabolism. *Mol. Cell. Biochem.* **4**, 115-123.

XIAO, C.M. y MASCARENHAS, J.P. 1985. High temperature-induced thermotolerance in pollen tubes of *Tradescantia* and heat-shock proteins. *Plant Physiol.* **78**, 887-890.

YAMAUCHI, T., HARA, T. y SONODA, Y. 1986. Distribution of calcium and boron in the pectin fraction of tomato leaf cell wall. *Plant Cell Physiol.* **27**, 729-732.

YANG, Z.H., BARENDSE, G.W.M. y LINSKENS, H.F. 1985. Abscisic acid in the reproductive organs of *Petunia hybrida* and *Lilium longiflorum*. Acta Bot. Neerl. 34, 73-82.

YI-QIN, L., CROES, A.F. y LINSKENS, H.F. 1983. Cell-wall proteins in pollen and roots of *Lilium longiflorum*: extraction and partial characterization. Planta 158, 422-427.

YOKOTA, H. 1986. Alleviation of NaCl-induced inhibition of pollen tube growth by monovalent and divalent cations. Soil Sci. Plant Nutr. 32, 343-350.

YOKOTA, H. y KONISHI, S. 1981. Methods of tea pollen culture for introducing pollen culture method into plant nutrition. J. Sci. Soil Manure 52, 239-245.

YOKOTA, T., KI KIM, S., FUKUI, Y., TAKAHAHI, N., TAKEUCHI, Y. y TAKEMATSU, T. 1987. Brassinosteroids and sterols from a green alga, *Hydrodictyon reticulatum*: configuration at C-24. Phytochem. 26, 503-506.

ZENKTELER, M. 1980. Intra-ovarian and *in vitro* pollination. In Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. I.K. Vasil, ed. Int. Rev. Cytol., Suppl. 11B, pp 137-156.

ZENKTELER, M. y MELCHERS, G. 1978. *In vitro* hybridization by sexual methods and by fusion of somatic protoplasts. Theor. Appl. Genet. 52, 81-90.

IX. ABREVIATURAS UTILIZADAS

AF.....Acido fosfatídico
 AGL.....Acidos grasos libres
 AIA.....Acido indolacético
 BSTFA.....Bis-trimetilsil-trifluoroacetamida
 DG.....Diacilgliceroles
 Dimetil POPOP.....2,2'-p-fenil-en-bis(4-metil-5-feniloxazol)
 DMSO.....Dimetilsulfóxido
 DS.....Desviación *standard*
 Est.....Esteroles
 FC.....Fosfatidilcolina
 FE.....Fosfatidiletanolamina
 FI.....Fosfatidilinositol
 FL.....Fosfolípidos
 FS.....Fusicocina
 GL.....Galactolípidos
 MES.....Acido 2-N morfolin etanosulfónico
 MG.....Monoacilgliceroles
 PPO.....2,5-Difeniloxazol
 TG.....Triacilgliceroles
 12:0.....Acido laurico
 14:0.....Acido mirístico
 16:0.....Acido palmítico
 18:0.....Acido estearico
 18:1.....Acido oleico
 18:2.....Acido linoleico
 18:3.....Acido linolénico
 20:0.....Acido eicosenoico
 20:1.....Acido cis-9-eicosenoico

Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.



Biblioteca Universitaria de Granada



01051726