

~~T. Prov. 23/130~~

T 8/1

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 613380989
N.º Copia 15950797

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO A NIVEL CELULAR DE LA GERMINACIÓN, EMISIÓN Y ELONGACIÓN
DEL TUBO POLÍNICO EN EL OLIVO (*Olea europaea* L.)

(Ultraestructura, Citoquímica e Inmunocitoquímica)



Mohammed M'rani Alaoui
2000

TESIS DOCTORAL

**Departamento de Biología Vegetal
2000**

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ... 5/7/00
ENTRADA NUM. 2064

**ESTUDIO A NIVEL CELULAR DE LA GERMINACIÓN, EMISIÓN Y ELONGACIÓN
DEL TUBO POLÍNICO EN EL OLIVO (*Olea europaea* L.)**


**Memoria que presenta el Licenciado
en Ciencias D. Mohammed M'rani Alaoui
para aspirar al grado de Doctor**

Fdo.: Mohammed M'rani Alaoui



UNIVERSIDAD DE GRANADA
28 JUN. 2000
COMISION DE DOCTORADO

Vº Bº
LOS DIRECTORES DEL TRABAJO



Fdo.: Dra. Mª Isabel Rodríguez García
Investigador Científico del C.S.I.C.

Fdo.: Dra. Mª Carmen Fernández Fernández
Catedrática de E.U. de la universidad
de Granada

Este trabajo ha sido realizado en el grupo de Biología Celular de Plantas (Unidad estructural de Investigación del departamento de Bioquímica. Biología Celular y Molecular de Plantas) de la Estación Experimental del Zaidin (C.S.I.C), gracias a una beca de la Agencia Española De Cooperación Internacional en el marco del programa de cooperación entre España y Marruecos. El trabajo también ha sido financiado por el Proyecto de la DGES PB 95-0080

AGRADECIMIENTOS

El hecho de revisar los resultados y todo el material que constituye esta Tesis Doctoral me obliga sin duda a volver a la cabeza hacia atrás y recordar que son muchas las personas que han intervenido directa o indirectamente en su obtención y elaboración, y a las que por supuesto quiero agradecer aquí el haber estado dispuestas a ayudarme cuando lo he necesitado.

En primer lugar, deseo expresar mis más sincero agradecimiento a mi directora Maribel (Dra. María Isabel Rodríguez García), no solo por sus valiosas enseñanzas en la investigación que me han servido como base en mi formación científica, sino también por su constante dedicación al trabajo y especialmente por la confianza que demostró al aceptarme como un componente mas en el grupo de investigación que dirige. Además siempre me ha mostrado su gran categoría humana. Quiero dar las gracias también a mi directora M^a del Carmen (Dra. María del Carmen Fernández Fernández), que me ha apoyado en todo momento con sus consejos, sus experiencias, conocimientos y amistad, además de por su continuo estímulo para completar mi formación y por poner todos los medios necesarios a mi alcance. Mis dos directoras han hecho posible la realización de esta Memoria, al tiempo que han realizado una acertada guía de mi labor.

A la Dra. Carmen Lluch no sólo por ser mi tutora en todo lo referente a mis estudios del doctorado, sino porque también fue la persona que me orientó y facilitó mi contacto con mis directoras.

Quiero agradecer, igualmente, la colaboración de Juande (Dr. Juan de Dios Alché), gracias al cual ha sido posible llevar a cabo los estudios bioquímicos de proteínas, por estar siempre dispuesto a resolver cualquier problema y también por enseñarme “ese modo diferente de ver las cosas”. A Ana (Dra. Anna Majewska) por su colaboración científica en los estudios de protoplastos y por su amabilidad para enseñarme algunas técnicas.

Así mismo quiero expresar mis más sincera gratitud a mis compañeros de trabajo, miembros del grupo de Biología del Polen de la Estación Experimental del Zaidin (C.S.I.C. Granada) que han estado siempre conmigo. A mi amiga Mati (Matilde

Garrido) por enseñarme el manejo en el laboratorio. A Adela (Dra. Adela Olmedilla) porque sus estímulos contribuyeron a hacerme mas disciplinado dentro del grupo. A los valiosos consejos de Conchita Martinez, Rosa María Duque Reinoso y Paqui. Gracias también a Antonio Jesús Castro con quien he realizado algunos experimentos de Biología Molecular, a Amada Pulido, Mounim Hamman Khalifa, Lamyae Azbaid, Maria José Pinheiro, Wang Wei y Jacques De la Flor por ser unos buenos amigos y estar siempre a punto para echar una mano. A mi amigo Manuel Martinez porque además de ser mi amigo ha colaborado directamente en la realización de los esquemas de esta Memoria. A la Dra. Fatiha Chibi, Profesora en la Universidad ABDEL MALEK ESSAADI (Tanger, Marruecos) por aceptarme a colaborar con su grupo de investigación.

Quiero dar las gracias a mi familia M´rani Alaoui, especialmente a mi querida madre Bahia Chafi que en todo momento antes y durante mis estudios ha sido totalmente solidaria conmigo, a mis hermanas Ouafae, Asmae, Badra, Nouzha y mi hermano Moulay Driss por sus continuos apoyos morales que yo he necesitado muchísimo a lo largo de mi estancia en España.

Quiero expresar mi admiración al Profesor D. Ahmed Outah que me apoyó y orientó con su gran sabiduría en un momento crucial en mis estudios antes de venir a España, ya que ello hizo dar mi primer paso para continuar con mis estudios después de la licenciatura.

A mis amigos María Angustia, Aurora, Felipe, Milagros, Carolina, Vanesa, Rafael por ser mi familia en Granada y sentirme como en “casa”.

También quiero agradecer a la familia EL MOURAWAH, la familia L’HARTITI, la familia RISSOUNI y la familia BELLEBAH con todos sus miembros que me han dado todo el apoyo y el consejo para hacer esta Tesis y que han seguido la evolución de este trabajo desde su inicio.

Dejo la parte final a las personas de la Estación Experimental del Zaidín que han seguido mi trabajo. A todas quiero darle las gracias. GRACIAS.

A La Memoria de mi Padre

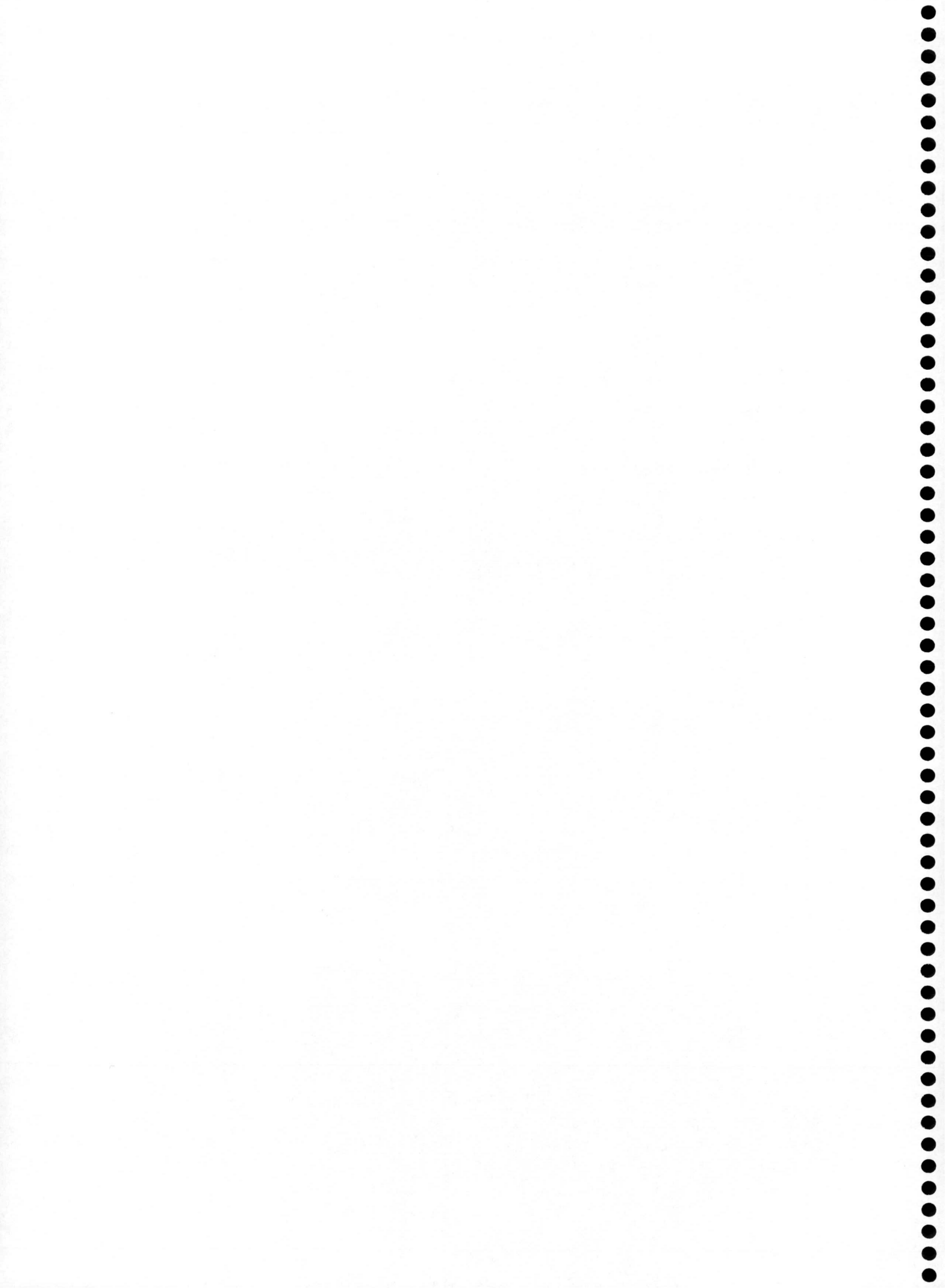
INDICE

I INTRODUCCIÓN	11
1. Gametofito masculino en angiosperma	13
1.1. El Grano de polen maduro	15
1.2. Germinación y crecimiento del tubo político	18
2. Interés del tema: implicación del polen en la biotecnología vegetal	21
3. El olivo	22
3.1. El polen del olivo: antecedentes y estado actual del tema	23
II TESIS A PLANTEAR Y OBJETIVOS	27
III MATERIAL Y MÉTODOS	31
1. Material Biológico	33
2. Métodos	33
2.1. Test de viabilidad	33
2.1.1. Reacción fluorocromática: FDA	33
2.1.2. Germinación <i>in vierto</i>	34
2.2. Optimización del medio de germinación	35
2.3. Seguimiento del desarrollo de la germinación del polen	36
2.3.1. Fijación	36
2.3.2. Tinciones	37
2.4. Preparación de muestras para microscopía óptica y electrónica de transmisión	38
2.4.1. Fijación	38
2.4.2. Deshidratación	40
2.4.3. Inclusión	41
2.4.4. Microtoma	43
2.4.5. Tinciones	44
2.4.6. Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido	45
2.4.7. Observaciones	45
2.5. Citoquímica	45

2.5.1. Polisacaridos	45
2.5.2. Lípidos	47
2.6. Inmunocitoquímica	48
2.6.1. Inmunolocalización de pectinas	49
2.6.2. Inmunolocalización de calosa	49
2.6.3. Inmunolocalización de proteína alergénica mayoritaria	50
2.7. Determinación de proteínas (alergeno mayoritario del olivo, Ole e 1)	51
2.7.1. Electroforesis	51
2.7.2. Inmunodetección sobre membranas	54
2.8. Obtención y cultivo de protoplastos	55
IV RESULTADOS	59
1. Aspectos citológicos aplicadas al polen germinado sobre el estigma	61
2. Germinación <i>in vitro</i>.	62
2.1. Calidad del polen: viabilidad	62
2.1.1. Reacción fluorocromática: FDA	62
2.1.2. Porcentaje de germinación <i>in vitro</i> .	63
2.2. Optimización del medio de germinación	64
2.2.1. Variedades introducidas	65
2.3. Dinámica de la germinación	71
2.3.1. Evolución del porcentaje de germinación	71
2.3.2. Tamaño del grano y del tubo durante la germinación	72
2.3.3. Integridad del tubo polínico durante 24 horas de incubación	74
2.3.4. Comportamiento de los núcleos vegetativo y generativo	75
3. Ultraestructura	76
3.1. Polen libre	76
3.2. Polen en cámara húmeda	77
3.3. Polen en medio de germinación	77
4. Comportamiento de los polisacaridos durante la germinación	81

4.1. Polisacaridos	81
4.2. Calosa	82
4.3. Pectinas	82
5. Comportamiento de los lípidos durante la germinación	83
6. Comportamiento de la proteína alergénica mayoritaria durante la germinación	85
7. Obtención y cultivo de protoplastos a partir del tubo polínico de granos germinados	86
8. Figuras	89
V. DISCUSIÓN	147
1. Germinación	149
1.1. Hidratación	150
1.2. Activación	152
1.3. Salida y crecimiento del tubo polínico	153
2. Conservación del polen del olivo a bajas temperaturas	154
3. Optimización de la germinación <i>in vitro</i> .	157
4. Dinámica de germinación	159
4.1. Organización del tubo polínico	159
4.2. Comportamiento de los núcleos vegetativo y generativo	161
4.3. Paredes celulares del tubo polínico	163
4.4. Comportamiento de lípidos de reserva	164
4.5. Comportamiento del alergeno mayoritario del olivo, Ole e1	165
5. Protoplastos a partir del tubo polínico	168
VI CONCLUSIONES	171
VII BIBLIOGRAFIA	175

I. INTRODUCCIÓN



1. Gametofito masculino en angiospermas

Las plantas con flores o angiospermas se caracterizan por poseer flores, que son estructuras reproductoras especializadas en donde ocurre la reproducción sexual del ciclo de vida de estas plantas.

El ciclo de vida de las angiospermas se caracteriza por la alternancia de generaciones entre esporofito y gametofito. El esporófito es diploide y su morfología, así como su tamaño y duración relativa dentro del ciclo, lo hacen la parte visible más conocida y representativa de la planta, el cual forma la vegetación del planeta. El gametofito, o generación haploide tiene menor tamaño y vida más corta por lo que, a menudo suele pasar desapercibido en una visión general de la flor. Aunque no visible el gametofito se desarrolla dentro del esporofito en órganos especializados de la flor y es el encargado de llevar a cabo la reproducción sexual de la planta.

En este ciclo, el esporofito diploide produce por meiosis dos tipos de esporas haploides, las microsporas y las megasporas. Las microsporas se desarrollan dentro de la antera u órgano masculino de la flor y las megasporas en el saco embrionario, que se encuentra dentro del ovario, en la base del pistilo u órgano femenino. Mediante procesos de mitosis y diferenciación, las microsporas y megasporas originan respectivamente el gametofito masculino o grano de polen y el femenino o saco embrionario. Estos gametofitos originan también por mitosis y diferenciación los dos gametos masculinos o células espermáticas y el femenino u ovocélula. La característica doble fecundación de las angiospermas supone la fusión de una de las células espermáticas con la ovocélula para formar el cigoto que dará lugar al embrión y después al nuevo esporofito. La segunda célula espermática se fusiona con los dos núcleos polares del ovulo formando un tejido triploide denominado endospermo, al cual se le atribuye la responsabilidad del crecimiento y germinación del embrión (Maheswari, 1950; revisión en Vijayaraghavan y Prabhakar, 1984).

El polen, gametofito masculino de las plantas con flores, se desarrolla en la antera y juega un papel central en la reproducción sexual de las plantas, como es la formación y transmisión de las células espermáticas hacia el saco embrionario para la doble fertilización. Para que la fertilización tenga éxito, el polen tiene que germinar en el estigma y el tubo polínico tiene que crecer a través del estilo. El grano de polen es por tanto, el portador de los gametos masculinos o sus células progenitoras en las angiospermas. Tal estructura representa uno de los sistemas celulares aislados más simples que se conocen. La formación y desarrollo general de los gametos masculinos es bastante uniforme en las diferentes especies de angiospermas, y consta de microsporogénesis y microgametogénesis.

La microsporogénesis transforma mediante una división meiótica a los microsporocitos o células madres diploides en microsporas haploides. La microgametogénesis comienza con una división mitótica asimétrica que transforma las microsporas haploides unicelulares en microgametofitos o granos de polen con dos núcleos también haploides, el núcleo vegetativo y el generativo, que inmediatamente de formarse se reparten el citoplasma de forma desigual cualitativa y cuantitativamente. De esta forma en el grano de polen se distinguen dos células, la generativa con poco citoplasma y escasos orgánulos celulares, de forma lenticular y adosada inicialmente a la pared del grano y la vegetativa con un citoplasma abundante que contiene la mayoría de los orgánulos.

La microgametogénesis culmina con otra división mitótica que ocurre en la célula generativa y que origina los dos gametos masculinos o células espermáticas. Esta segunda división mitótica puede ocurrir precozmente cuando el núcleo generativo se divide durante la maduración del grano en el interior de la antera y se trata de polen tricelular. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el polen es bicelular y la segunda división mitótica que da lugar a las dos células gaméticas, ocurre dentro del tubo polínico sobre el estigma.

1.1. El grano de polen maduro

La existencia de una serie altamente controlada de cambios citológicos y bioquímicos asociada con el desarrollo y maduración del polen es el resultado de la existencia de un patrón de expresión coordinado de genes implicados en las dos generaciones, gametofítica y esporofítica. De manera general se puede decir que el grano de polen representa la unidad estructural programada para una diferenciación terminal en dos células espermáticas. El grano de polen maduro y concretamente la célula vegetativa es el lugar de almacén de los nutrientes necesarios para la germinación y el crecimiento del tubo polínico (Knox, 1984; Cresti y Keijzer, 1985; Derksen y col., 1985). Durante el largo proceso de la maduración tiene lugar importantes cambios metabólicos que se reflejan en la estructura del grano. Un elevado número de genes gametofíticos específicos del polen se expresan durante esta etapa de maduración, teniendo lugar una elevada síntesis y almacenamiento de proteínas (Mascharenas, 1989; 1993; McCormick, 1993).

Pared del polen y aperturas

Los granos de polen están rodeados de una peculiar pared que está estructurada en dos capas. La interna o intina es delgada y de naturaleza pectocelulósica y la externa o exina compuesta fundamentalmente de esporopolenina. Ambas son completamente distintas no sólo desde el punto de vista químico, sino también morfológico y de desarrollo. La esporopolenina es un polímero altamente resistente formado por la polimerización oxidativa de carotenoides y ésteres de carotenoides (Shaw, 1971; Brooks y Shaw, 1978).

La exina generalmente consta de una capa externa bien estructurada o ectexina que es ornamentada y de una interna o endexina, generalmente lisa que recubre la intina. El polen maduro presenta sustancias procedentes de la degradación del tapete, entre las ornamentaciones de la exina que se le conoce como "pollenkitt". Las paredes son unas de las características morfológicas más significativas de los granos de polen y por ello se han usado frecuentemente con propósitos taxonómicos.

La intina, de naturaleza pectocelulósica (Heslop-Harrison, 1987) es una parte esencial en la pared del grano de polen ya que no se han descrito granos de polen sin ella, mientras que si se han descrito pólenes sin exina como en algunas especies acuáticas (Cooper y col., 2000).

Las regiones aperturales se han considerado tradicionalmente como regiones especializadas de la pared donde la exina se hace más delgada o no existe y donde la intina aparece normalmente más gruesa. Fisiológicamente representan las zonas por las que puede emerger el tubo polínico y también se les atribuye una función reguladora que esta relacionada con los cambios de volumen que sufre el polen para adaptarse a la deshidratación y la hidratación, conocida como harmomegata. (Wodehouse, 1935; Fernández y Rodríguez-García, 1995; Fernández y col., 1992)

Polen y alergia

Hoy día es un hecho bien conocido que el grano de polen contiene un elevado número de proteínas de origen esporofítico y gametofítico, que son las causantes de las reacciones alérgicas comunmente conocidas como “fiebre de heno” o también “polinosis”. Ya en 1971 Knox y Heslop-Harrison localizaron la presencia de antígeno E en la intina de *Artemisia artemisifolia*, lo que coincidió en el tiempo con la primera indicación de la reacción antígeno-anticuerpo del polen con el suero de los enfermos. Potencialmente la mayoría de los polenes son alérgicos, debido a su elevada cantidad de proteínas. Pero son los polenes que se transmiten por el aire (anemófilos) los responsables en gran medida de las conocidas molestias primaverales. Entre ellos los mas estudiados desde este punto de vista son de la familia de las gramíneas, oleáceas, *Betula*, *Plantago*, etc. Tradicionalmente los alérgenos han sido asociados con la pared del polen (Knox y Heslop- Harrison, 1971). Más recientemente se ha visto que pueden estar tanto en la pared como en el citoplasma (Vithanage y col., 1982; Staff y col., 1990; Grote, 1991; Rodríguez-García y col., 1995 a y b).

En los últimos 10 años se ha incrementado espectacularmente la información que se tiene acerca de estas proteínas, gracias a su aislamiento y la caracterización molecular, incluyendo aislamiento de clones cDNA que codifican los alérgenos y la determinación de su secuencia de nucleótidos y la secuenciación deducida de aminoácidos. El número de alérgenos que se están aislando y caracterizando en el polen incrementa de día en día. Sin embargo poco es lo que se conoce acerca del papel que juegan en el proceso de fertilización de las plantas. Estamos lejos de conocer el significado biológico de estas proteínas, quizás porque su estudio se ha centrado principalmente en los aspectos sanitarios debido a la elevada población afectada por los catarros primaverales y que pueden llegar a tener consecuencias serias de asma. Dado el gran número de alérgenos que se están encontrando en las diferentes especies, se prevé que su función debe ser diversa, aunque prevalece la hipótesis de que la germinación (reconocimiento polen-estigma, hidratación, emergencia del tubo) y crecimiento del tubo son los procesos en que la mayoría de los alérgenos están más directamente implicados. Recientes estudios de localización de Bra r 1 en polen de *Brassica* sugieren que esta proteína unida a Ca^{2+} puede estar implicada en la interacción polen-estigma y crecimiento del tubo (Okada y col., 1999)

Viabilidad y conservación del grano de polen

La calidad del polen se puede definir como la capacidad del gametofito masculino para fecundar al femenino y producir un cigoto. Dicha capacidad depende de tres parámetros fundamentales: su viabilidad o integridad citológica y fisiológica, su capacidad de germinación o producción del tubo polínico y por último su capacidad de fertilización. A su vez estos parámetros dependen de una serie de factores genéticos, ambientales pero también dependen de las condiciones en que se efectúa la recolección y almacenamiento del polen antes de evaluar su calidad. Un aspecto importante de las investigaciones actuales sobre el polen es estudiar la viabilidad y los factores que influyen en su conservación en condiciones óptimas. Esto tiene un especial interés ya que el mundo vegetal puede ser preservado en condiciones idóneas gracias a su almacenamiento a bajas temperaturas en un "banco de polenes". Ello supone un ahorro

Económico, y de espacio y permite un intercambio de germoplasma a nivel internacional (Barnabás, 1994).

Deshidratación del polen

La deshidratación comienza justo antes de la antesis, la cual induce al polen a un estado metabólico quiescente que confiere una tolerancia al estrés medio ambiental durante su dispersión en agua, aire, insectos o animales. La deshidratación parece necesaria para mantener en el polen su capacidad de germinación (Lin y Dickinson, 1984). Cuando el polen se libera de la antera tiene entre el 6 y 60% de agua, siendo específico para cada especie (Kerhoas y col., 1987). A pesar de la desecación, el polen es viable si los cambios estructurales que ocurren durante la deshidratación son reversibles después de una nueva rehidratación. El agua es el mayor determinante de la integridad y estabilidad estructural de la membrana celular, la pérdida de esa barrera es la mayor causa de la disminución de la viabilidad (Crowe y col., 1989). Parece ser que existen genes específicos del polen que se activan durante la hidratación del polen como es el caso del LAT 52 que está implicado en la hidratación del polen del tomate (Muschiatti y col., 1994).

1.2. Germinación y crecimiento del tubo polínico

Para el éxito de la fertilización el polen tiene que germinar en el estigma y crecer a través del estilo. El tubo polínico tiene a veces que atravesar distancias de hasta mil veces el diámetro del tubo antes de liberar los gametos masculinos en el saco embrionario para la fertilización.

Germinación del polen

El grano de polen germina cuando se pone en contacto con un medio ajustado a un pH y molaridad favorable y en unas condiciones apropiadas de temperatura y humedad, ya sea sobre el estigma in vivo o en el medio de germinación in vitro. El Ca^{2+} es también uno de los elementos claves en este proceso, ya que como bien es sabido el Ca^{2+} es uno de los cationes más importantes implicados en muchas reacciones metabólicas clave,

especialmente en las señales de traducción, tanto en animales como en plantas (Steer y Steer, 1989).

El estigma es el sitio idóneo para la germinación del polen y crecimiento del tubo polínico. Sin embargo, los estudios de germinación *in vivo* no son fáciles de realizar debido al reducido tiempo de la floración en la mayoría de las angiospermas y también a la complicada estructura de los tejidos de pistilo. La fisiología y bioquímica del tubo polínico por tanto se conocen mayoritariamente mediante estudios de germinación *in vitro*. El polen de la mayoría de las especies germina cuando se coloca en una solución de calcio, boro y sacarosa a la concentración adecuada. Observaciones microscópicas desde hace más de 100 años han contribuido a que se haya analizado paso a paso la germinación del polen y a que se tenga una idea bastante clara de este proceso. Se pueden considerar tres fases en la germinación: hidratación, activación y emergencia del tubo polínico. Las dos primeras son interdependientes y pueden tener lugar simultáneamente. La salida del tubo es la culminación de los procesos de hidratación y activación.

El proceso de hidratación en el polen ocurre de manera controlada y se realiza con tomas de agua a distintos intervalos. En algunas especies puede comenzar ya dentro de la antera antes de que se libere el polen (Zuberi y Dickinson, 1985). Los daños causados por una rápida hidratación probablemente producen alteraciones de la integridad de la membrana que podría deberse a la incompleta o anormal reconstrucción de la capa lipídica (Kerhoas y col., 1987). La hidratación *in vitro* ha permitido determinar el grado de influencia de la hidratación en el porcentaje de germinación. Los granos prehidratados pueden alcanzar un mayor volumen que los que se exponen directamente al medio y germinan mejor (Gilissen, 1977). Mediante estudios ultraestructurales y fisiológicos de la hidratación de polen de *Brassica* se han detectado dos fases (Franklin-Tong y col., 1996; Hiscock y col., 1995) Una fase inicial, en la que existen intercambios de señales entre polen y estigma (Doughty y col., 1993) y una segunda fase donde aparece una protuberancia de la intina en la zona apertural y contacto de la cubierta del polen o "pollenkitt" con las papilas del estigma. Entonces el agua se desplaza del estigma al grano de polen (Shivanna y col., 1991). Alrededor del lugar por donde

emerge el tubo polínico hay pectinas en cantidad. Una de las primeras alteraciones que se detectan es la pérdida de pectinas y proteínas en esta región (Heslop-harrison y Heslop-Harrison, 1992). Una vez que el tubo emerge por el poro germinativo, este crece y penetra en las células de las papilas (Elleman y col., 1992), posiblemente utilizando una cutinasa activa que se localiza en la intina y posteriormente durante la germinación en el ápice del tubo (Hiscock y col., 1994).

Crecimiento del tubo polínico

El crecimiento del tubo polínico comienza con la germinación y penetración del tubo polínico a través de las papilas estigmáticas y capas de células secretoras subepidermales del estilo. Entonces el tubo entra en el tejido de transmisión del estilo y crece hacia el ovario. Una vez en el interior del ovario, entra en el saco embrionario por penetración de una de sus células sinérgidas. El tubo polínico se rompe en el interior del saco y libera las células espermáticas para fertilizar la ovocélula y las dos células centrales en un proceso de doble fertilización. Independientemente de si el estigma es de tipo seco o húmedo y si el estilo es de tipo abierto o cerrado (sólido), el tubo polínico elonga sólo a través de la matriz extracelular del estigma y del óvulo. Nunca penetra el protoplasto de las células que encuentran antes de llegar al saco embrionario. Por ello el éxito del proceso de crecimiento del tubo polínico radica enteramente en las interacciones de la superficie celular entre el gametofito masculino y varios tejidos esporofíticos femeninos (Knox, 1994; Mascharenas, 1993; Cheung, 1995).

El crecimiento del tubo polínico se caracteriza por ser unidireccional. En él se distinguen: a) una zona de crecimiento, localizada en el ápice del tubo, en la que se concentran gran número de vesículas y rodeada por una delgada pared pectínica y b) una zona de elongación en la que la pared se consolida y se hace más rígida, estando constituida por 2 o 3 capas, la interna de calosa y las otras de pectinas y celulosa (Heslop-Harrison, 1987).

El tubo polínico presenta una marcada polarización que se refleja en la organización de sus componentes. Los datos aportados por estudios ultraestructurales revelan una distribución de los orgánulos en zonas diferentes. En términos generales se puede distinguir una zona

apical con una marcada acumulación de vesículas; una zona subapical con dictiosomas y mitocondrias, la zona nuclear y finalmente una zona vacuolar (Cresti y Tiezzi, 1990; Derksen y col., 1995; Steer y Steer, 1989). Es evidente que el citoesqueleto juega un papel fundamental en esta organización del tubo polínico como lo demuestran los numerosos estudios realizados sobre este aspecto. El transporte de vesículas secretoras, esencial para la elongación del tubo, parece estar estrechamente relacionado con las microfibrillas de actina (Derksen y col., 1995).

2. Interés del tema: implicaciones del polen en la biotecnología vegetal

El interés que despierta el grano de polen se basa no sólo en el papel crucial que juega en la reproducción de las plantas superiores sino por sus aplicaciones biotecnológicas y en programas de mejora vegetal. El potencial de la manipulación de los sistemas de reproducción sexual en plantas depende de la capacidad de controlar y manipular: los gametos, la calidad del polen, la mejora de almacenamiento de polen a largo plazo, la polinización, interacción polen-estigma, fertilización y formación de semillas. Esta manipulación puede ser llevada a cabo por diversos métodos que incluyen:

- a) El control de los fenómenos de compatibilidad e incompatibilidad, de los mecanismos de competencia entre granos de polen e inhibición de la autofecundación que permitirá una selección de la dotación génica destinada a la fecundación.
- b) Métodos de aislamiento y conservación de células espermáticas y óvulos, con objeto de realizar fertilización artificial mediante micromanipulación. De esta manera se eliminarán las barreras de incompatibilidad y se mejora la fecundación dirigida.
- c) La transformación de polen mediante micromanipulación o mediante bombardeo de partículas puede ser una alternativa para la transformación de plantas cultivadas.
- d) Finalmente otro método de enorme aplicación e interés agronómico es la obtención de plantas haploides induciendo la androgénesis en anteras o microsporas cultivadas *in vitro*.

En resumen, tanto el estudio básico de procesos reproductivos en plantas como los aspectos aplicados son tópicos de interés creciente y en progresivo desarrollo. En el caso concreto del olivo es fundamental tener un buen conocimiento básico de todos los procesos que inciden en la formación del fruto, ya que ello contribuirá favorablemente en mejorar la cosecha y el rendimiento del fruto. La repercusión económica del olivo y sus frutos es evidente y no es necesario justificar el interés de su estudio. Si conociéramos bien los mecanismos y barreras que regulan la germinación y crecimiento del tubo polínico del olivo (o de cualquier otra planta en general), se podría mejorar el éxito de la fertilización mediante manipulación genética y de esta manera incrementar la cosecha.

3. El olivo

El olivo sin duda es el prototipo indiscutible de la agricultura mediterránea. Tiene una larga historia que va unida a la de los cultivos mediterráneos, que junto con la vid y el trigo son básicos en la alimentación de los pueblos del Mediterráneo.

El olivo (*Olea europaea* L.) dentro de las angiospermas pertenece a la familia botánica *Oleaceae* que comprende especies forestales como el fresno, y ornamentales como la lila, el jazmin y la forsitia. La única especie con interés comercial por su fruto es el olivo (Heywood, 1985). Como en otras especies leñosas, en el olivo se alternan años de floración abundante y otros de floración escasa o nula. Este fenómeno conocido como alternancia o vecería se refleja directamente en los niveles de la cosecha. Las flores se desarrollan en inflorescencias paniculadas de 10 a 30 flores según cultivares que surgen axilarmente de los nudos de crecimiento vegetativo del año previo a la floración (King, 1938; Rivera, 1941; Griggs y col., 1975). Estas inflorescencias presentan flores hermafroditas y algunas estaminíferas (con ovario rudimentario o ausente) (Uriu, 1959). La flor hermafrodita es brevemente pedunculada, con cáliz gamosépalo, corola blanco amarillenta, cuatro pétalos soldados por la base, alguno de ellos ocasionalmente bifido (Rivera, 1941). Posee dos estambres opuestos insertos en la corola. Las anteras, formadas por dos tecas, incluyen un gran número de granos de polen (Morettini, 1972).

La parte femenina o gineceo está compuesto por un ovario súpero, un breve estilo y un estigma bilobulado o papiloso bien desarrollado (Morettini, 1972), cuya morfología puede variar entre cultivares. Altamura y col., (1982) y Cresti y col., (1989), asignan a *Olea* un estigma húmedo, con un fluido entre y sobre las papilas. El estilo, breve y fuerte, es de tipo sólido (Altamura et al., 1982), es decir, con tejido transmisor ocupando el centro del estilo.

3.1 El polen del olivo: antecedentes y estado actual del tema.

A pesar del enorme interés económico del olivo y de sus implicaciones en la nutrición y en enfermedades de tipo alérgico, el estudio del polen ha merecido en general poca atención por parte de los investigadores. El primer estudio en olivo de los procesos gaméticos en diferentes condiciones de polinización fue llevado a cabo por Bradley y Griggs (1963), poniendo de manifiesto el carácter autocompatible de los cultivares estudiados, y las interacciones existentes en el cuajado de frutos entre temperaturas y polinización. Fue a finales de los 70 cuando aparecieron los primeros trabajos ultraestructurales sobre el desarrollo del polen del olivo (Pacini y Juniper, 1979a; 1979b) y a mediados de los 80 cuando se ha tomado conciencia del interés de esta especie y diferentes grupos, principalmente de España e Italia, lo han elegido como tema central de estudio desde diferentes puntos de vista.

En Córdoba el grupo del Dr. Luis Rallo se ha interesado por estudiar los procesos de autocompatibilidad polen-pistilo y la respuesta del olivo a la polinización cruzada y su relación con la fructificación (Cuevas, 1992).

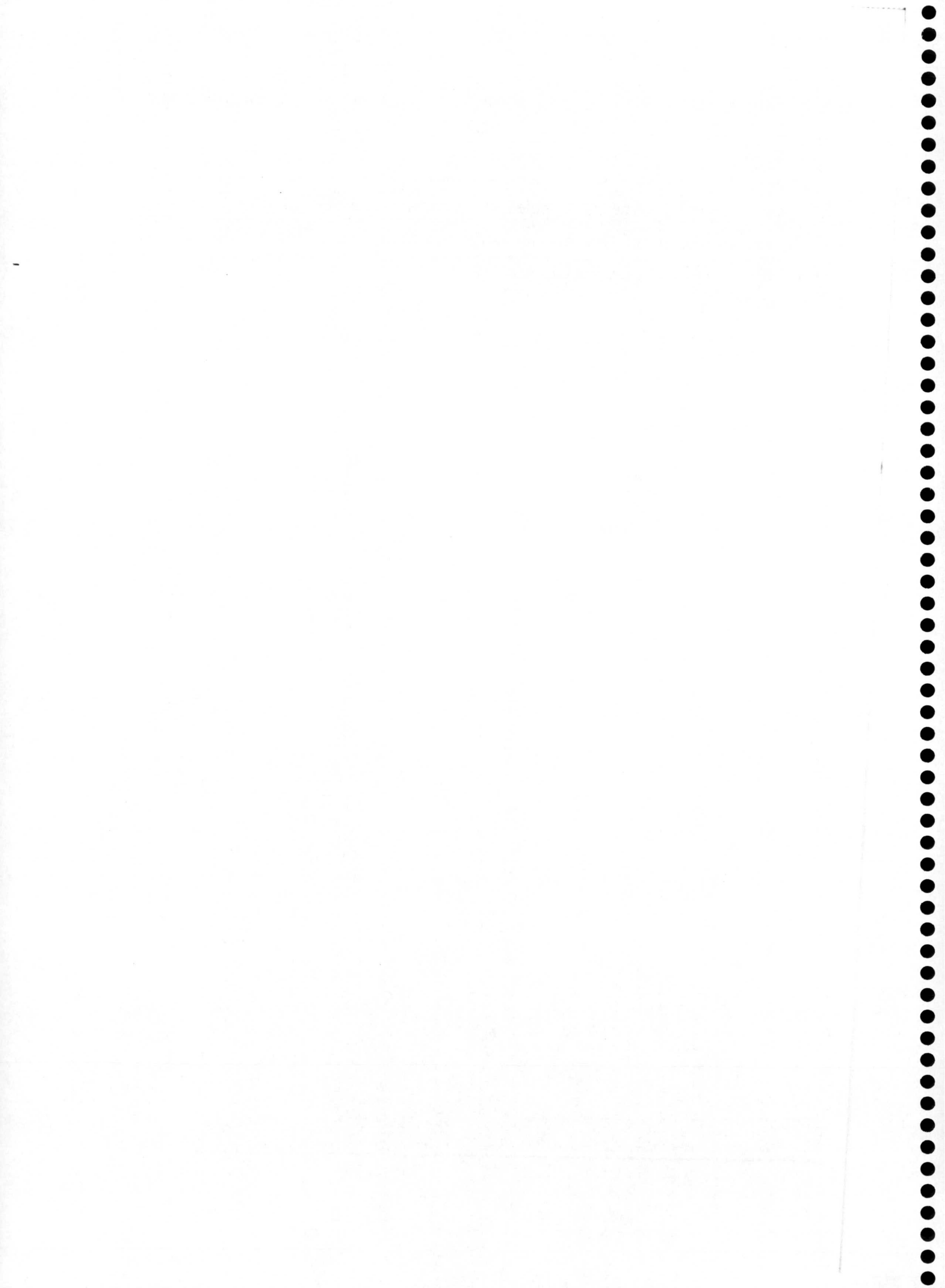
Nuestro grupo en Granada se ha centrado en estudiar el proceso de desarrollo y maduración del polen desde la meiosis hasta la dehiscencia de la antera. Se han aportado interesantes datos acerca de la repoblación ribosómica y la presencia de nucleoloides en la microspora del olivo (Rodríguez-García y Fernández, 1989; Alché y col., 1993); presencia de cuerpos nucleares durante la profase meiótica (Olmedilla y col., 1997) el comportamiento de las sustancias de reserva durante la maduración del

polen (Fernández y Rodríguez-García, 1994); la diferenciación del retículo endoplásmico (RE) durante el desarrollo del polen (Rodríguez-García y Fernández, 1990) y la presencia de proteínas alergénicas en las cisternas de RE (Rodríguez-García y col., 1995; Fernández y col., 1996). También se ha estudiado la ontogenia y estructura de la exina y de las tres aperturas de la pared (Fernández y Rodríguez-García, 1988; 1989; 1995; Rodríguez-García y Fernández, 1988), así como el posible paso de sustancias a través de la pared del polen (Fernández y Rodríguez-García, 1990).

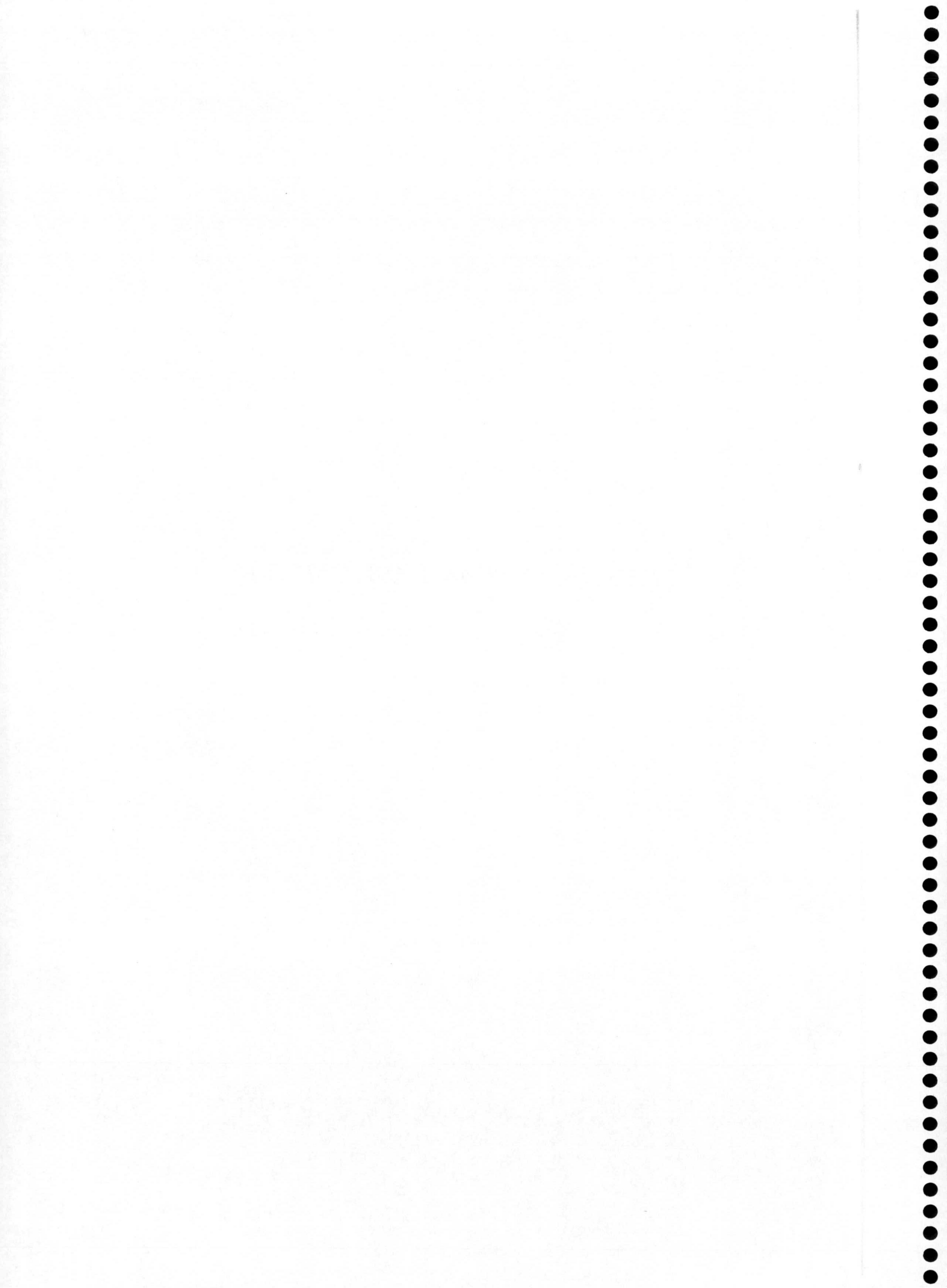
En Madrid, el grupo de la Dra. Rosalía Rodríguez ha aislado y caracterizado varios alérgenos, continuando actualmente con esta línea. El grano de polen del olivo es uno de las causas más importantes de alergia inhalatoria en los países donde está ampliamente representado. Estos países incluyen básicamente el área mediterránea (España, Francia, Italia, Grecia, Marruecos, Israel), así como ciertas regiones de USA (California, Arizona), Australia, Sudáfrica, Chile y Argentina (Bousquet y col., 1985; Wheeler, 1992; Liccardi y col., 1996; Florido y col., 1999).

El alérgeno mayoritario del polen del olivo (designado Ole e 1 según la nomenclatura aprobada por la International Union of Immunological Societies) ha sido aislado, purificado y caracterizado bioquímicamente (Villalba y col., 1990; 1993). También han sido clonados varios cDNAs que codifican esta proteína (Lombardero y col., 1994; Villalba y col., 1994) (Números de acceso en GenBank/EMBL: S75766 y X76395 respectivamente). La proteína tiene naturaleza ácida, con varias variantes de glucosilación (Batanero y col., 1994), y presenta microheterogeneidades en distintas posiciones de su secuencia (Villalba y col., 1993; 1994). La localización celular de esta proteína ha sido estudiada a lo largo del desarrollo del polen mediante experimentos de inmunolocalización a MET (Martín-Orozco y col., 1994; Rodríguez-García y col., 1995a; b). La expresión génica de Ole e 1 ha sido investigada a lo largo del desarrollo del polen del olivo recientemente (Alché y col., 1999).

A pesar de esta valiosa información con que contamos acerca de esta proteína, y al igual que ocurre con otros alérgenos del polen, se desconoce la función biológica de Ole e 1. El seguimiento de esta proteína durante la germinación del polen, permitirá acercarnos al conocimiento de dicha función biológica.



II. TESIS A PLANTEAR Y OBJETIVOS



El objetivo último de este trabajo es hacer un seguimiento a nivel celular del comportamiento del polen del olivo durante la germinación y crecimiento del tubo polínico. Para ello nos proponemos los siguientes objetivos:

1°. Aproximación microscópica a la germinación del polen sobre el estigma en la época de la floración.

2°. Realizar test de calidad del polen después de ser almacenado durante distintos tiempos y bajas temperaturas (-20°C , -80°C y -170°C), para determinar la más idónea.

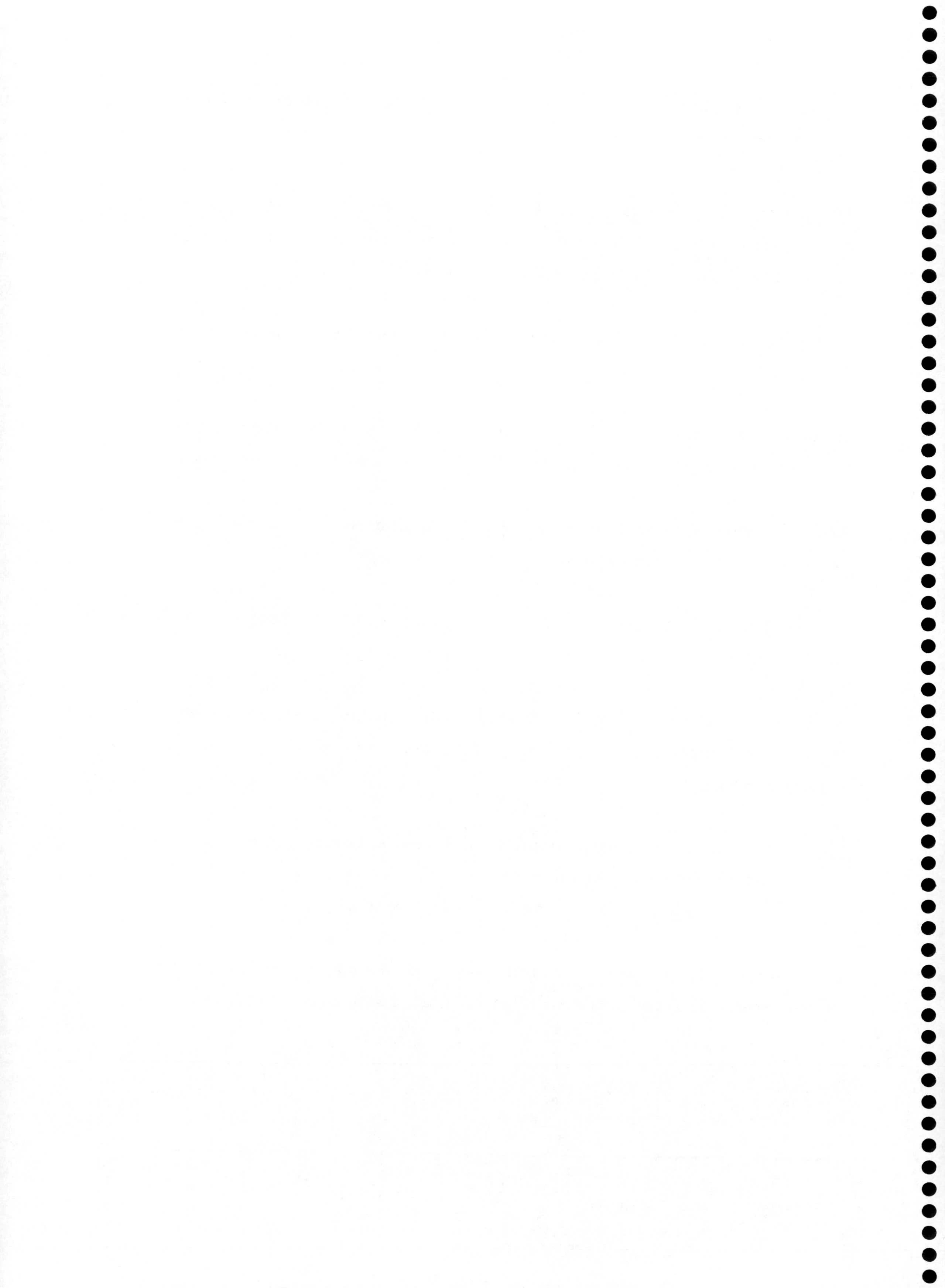
3°. Optimización del medio de germinación y de las condiciones de germinación *in vitro* para conseguir el porcentaje de polen germinado más alto posible.

4°. Seguimiento de la evolución de la germinación a distintos tiempos en las condiciones óptimas de conservación del polen y del medio de germinación.

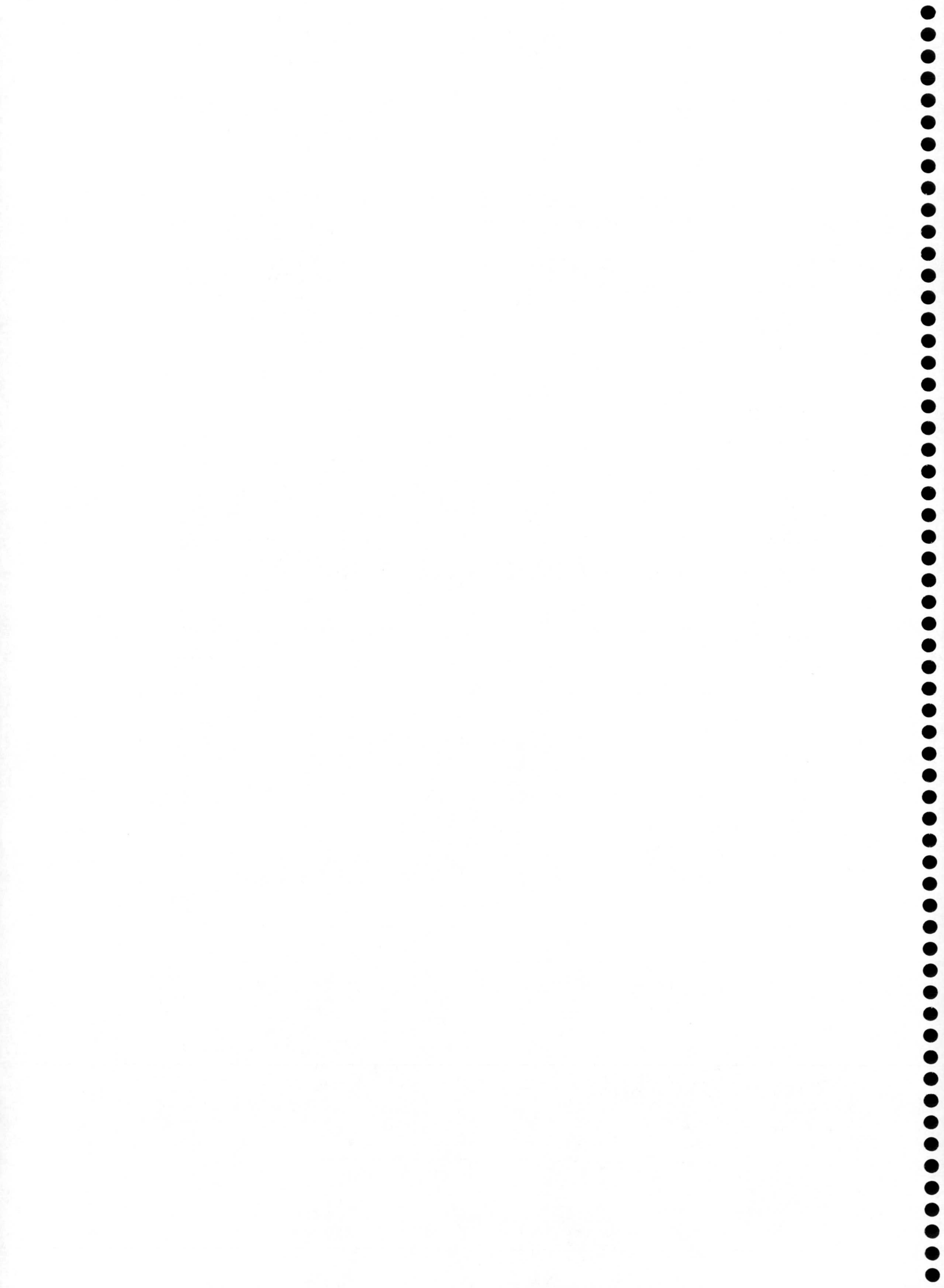
5°. Estudiar la organización celular del polen y tubo polínico, durante las diferentes fases de la germinación: hidratación, emergencia y crecimiento del tubo polínico, con especial atención al:

- comportamiento de carbohidratos en relación con las paredes celulares
- comportamiento de lípidos de reserva
- comportamiento del alergeno mayoritario del olivo (Ole e 1)

6°. Obtención de protoplastos a partir del tubo polínico y seguimiento del comportamiento de estos y de la nueva pared regenerada durante su posterior cultivo.



III. MATERIAL Y MÉTODOS



1. Material biológico

El material utilizado en este estudio fué el polen maduro de olivo (*Olea europaea* L.) variedad Picual. La recolección del polen se efectuó en los años 1996-97-98 durante los meses de Mayo a Junio; las condiciones climáticas de lluvia y de temperatura influyen en que la maduración y la recogida del polen sea más o menos temprana.

Se recolectó polen después de la antesis, para lo cual pusimos bolsas de papel satinado alrededor de las ramas de los árboles con flores a punto de abrirse, calculando que en dos o tres días dichas flores se abrirían dentro de las bolsas, soltando así el polen maduro que contienen. Pasados estos días las bolsas eran recogidas y trasladadas al laboratorio donde se purificó el polen a través de una serie de mallas de tamaño decreciente que van desde 0.150 mm a 0.053 mm, para separarlo de los restos de hojas, flores y otros contaminantes. Finalmente el polen se procesó o se almacenó puro en tubos eppendorf a bajas temperaturas (-20° C, - 80° C y nitrógeno líquido). También se han utilizado estigmas maduros cubiertos de polen que fueron almacenados en tubos eppendorf a -20° C para su posterior observación.

2. Métodos

2.1. Test de viabilidad

2.1.1. Reacción fluorocromática FDA

Con el objetivo de evaluar como influyen las condiciones de almacenamiento (temperatura y tiempo) sobre la calidad del polen se utilizó el test de diacetato de fluoresceína (FDA). Se trata de una tinción vital que se basa en que cuando la célula tiene el plasmalema intacto, la fluoresceína penetra la membrana con mayor dificultad, pero no sale y se acumula en el citoplasma del polen, dando una fluorescencia intensa bajo el microscopio de fluorescencia. Esta reacción nos permitió probar el grado de la integridad de la membrana e indirectamente la viabilidad del grano ya que los granos en

buen estado fluorescen frente a aquellos que tienen la membrana deteriorada y no fluorescen. El método básico de la reacción fluorocromática en el polen fue descrito por Heslop-Harrison y col., (1984).

Preparación:

Se disuelven 2 mg de acetato de fluoresceína en 100 ml de acetona. También se preparó una solución de 0.5M de sacarosa.

Procedimiento:

- Se coloca sobre el portaobjetos una gota de la solución de acetato de fluoresceína.
- Se mezcla el polen con una gota de la solución de sacarosa 0.5 M.
- Finalmente se coloca el polen y la sacarosa sobre la gota de la de acetato de fluoresceína depositada en el portaobjetos.

A este método le hemos introducido la modificación descrita por Petersen y Taber (1987) que consiste en dejar evaporar la acetona en que va disuelta el FDA con lo que se elimina el efecto nocivo de la acetona sobre el polen y que podría afectar negativamente a la integridad de las membranas y producir una falsificación en el porcentaje de granos bien conservados. Una vez seca la acetona se coloca la solución de polen con sacarosa.

El porcentaje de calidad se determina a nivel del microscopio de fluorescencia contando en distintos campos de diferentes portaobjetos el número de granos totales y el número de granos que fluorescen. El estudio se realizó tanto en grano de polen suelto como ya germinado.

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{número de granos que fluorescen} \cdot 100}{\text{número de granos total}}$$

2.1.2. Germinación *in vitro*

Con el objeto de evaluar como cambia el grado de germinación de polen después de un tiempo de almacenamiento a distintas temperaturas, se ha tratado de encontrar previamente las condiciones óptimas del medio de germinación para el polen fresco.

Para ello se determinó el porcentaje de germinación, contando el número de granos totales y germinados de zonas distintas de la palaca petri.

$$\% \text{ de germinación} = \frac{\text{número de granos que germinan} \cdot 100}{\text{número de granos total}}$$

Antes de determinar el porcentaje de germinación, el tiempo de incubación del polen fue de 12 h. La medida de los ejes del grano de polen suelto, en cámara húmeda y del tubo polínico a distintas etapas de la germinación se ha hecho en el microscopio óptico mediante portas con reglas milimetradas.

2.2. Optimización del medio de germinación

Inicialmente se partió del medio de germinación de Brewarbaker y Kwack (1963) con 20 % de sacarosa.

Ácido Bórico:	0,01 g/100 ml
Nitrato Potasio:	0,01 g/100 ml
Sulfato Magnésico:	0,02 g/100 ml
Nitrato Cálcico:	0,03 g/100 ml
Sacarosa :	20 g/100 ml

Con este medio se obtuvo un porcentaje de germinación relativamente bajo (30%) y para incrementar el porcentaje de germinación, se introdujeron las siguientes variantes:

- Variaciones en la concentración de sacarosa (2.5%, 10%, 15%, 20% y 30%).
- Variaciones en la temperatura de incubación (20, 25, 28 y 32°C).
- Modificaciones en el valor de pH del medio (entre 4 y 8).
- Modificaciones en las concentraciones de sales como:
 - ácido bórico (0.01, 0.03 y 0.05 g/100 ml).
 - nitrato potásico (0.01, 0.03 y 0.05 g/100 ml).
 - nitrato cálcico (0.01, 0.03 y 0.06 g/100 ml).
- Añadir al medio algunas sustancias como son:

- tween 20 (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate) (0.005, 0.01 y 0.2 g/100ml).
 - tris (Hydroxymethyl aminomethane) (0.004, 0.08 y 0.016 g/100 ml).
 - extractos de levadura (0.05 %, 0.1 % y 0.5 %).
 - PEG (Polyetilenne Glycol) (2.5 %, 5 %, 7.5 % y 10 %).
- Antes de ponerlo en el medio de germinación, se probó distintos tiempos de incubación en cámara húmeda.
- Finalmente se vio el posible efecto positivo de fragmentos de estigma añadidos al medio de germinación.

Todos estos ensayos se realizaron en cada caso con una cantidad equivalente de medio de cultivo (2 ml ó 10 ml) y de granos de polen (2 mg o 10 mg) respectivamente.

2.3. Seguimiento del desarrollo de la germinación del polen

Con objeto de hacer un seguimiento del desarrollo de la germinación *in vitro* del polen mediante el microscopio de fluorescencia, primero se fijó el polen a distintos tiempos de germinación y seguidamente se utilizó una tinción específica para el ADN como objeto de visualizar los núcleos.

También se siguió el desarrollo del tubo utilizando una tinción que visualiza algún constituyente de su pared celular como es la calosa y que fluoresce especialmente mediante azul de anilina.

2.3.1. Fijación

Se utilizó alguna de las siguientes mezclas de:

Etanol / Acético (3:1)

Se puede dejar el material en esta solución 4°C durante semanas incluso meses antes de proceder a su observación o su posterior tinción.

Formaldehido / Ácido Acético / Etanol

La solución del fijador esta integra de formaldehido 37%: ácido acético glacial: etanol 70% en proporción 1:1:18.

Procedimiento:

- Se fija el material en el tiempo que puede variar entre 30min y 3 días a 4° C. Después de la fijación, las muestras se someten a los siguientes pasos.
- Se lava con agua. Con objeto de facilitar la observación en aplastado de las muestras, se colocaron las muestras en una solución de NaOH 1N durante 12 h.
- Se lava de nuevo con agua muy bien antes de pasar a la tinción.

2.3.2. Tinciones

Tinción específica para DNA: (DAPI)

Esta tinción fue utilizada por (Vergne y col., 1987) para detectar ADN a nivel de núcleos celulares.

Preparación de solución "stock":

El 4'-diamino-2-fenilinol (DAPI) se comercializa en forma de polvo (SERVA). Se prepara una solución "stock" de 10 µg/ml en agua destilada y se almacena a 4° C en frasco topacio que no deje pasar la luz y podría alterarlo. En estas condiciones este preparado es estable durante meses.

Procedimiento:

- Poco antes de su uso se diluye 10 veces la solución "stock" para conseguir una concentración final de 1 µg/ml.
- La tinción se realizó colocando el polen germinado o estigma fijado previamente (3:1 etanol / acético) sobre un portaobjetos con unas gotas de DAPI.

La observación se realiza en el microscopio de fluorescencia bajo irradiación ultravioleta ($\lambda=366$ nm). La unión del ADN con el DAPI emite una fluorescencia azul que no decae demasiado durante la observación y nos permite visualizar los núcleos y fotografiarlos.

Tinción específica para la calosa: azul de anilina

Esta tinción fue utilizada por Currier y Strugger (1956) para detectar la presencia de calosa a nivel de paredes celulares.

Preparación:

La solución de azul anilina al 0,01 % se prepara disolviendo 0,002 g de azul anilina (MERKC) en 20 ml de 1.5 % fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4 , pH = 9.2). Se puede almacenar en frigorífico en frasco topacio.

Procedimiento:

- Se sumerge el polen germinado o estigma en la solución de azul anilina durante 20min.
- Se coloca el material sobre un portaobjetos y se aplasta en unas gotas de colorante con un cubreobjetos.

La observación se realiza en el microscopio de fluorescencia bajo irradiación ultravioleta ($\lambda=340$ nm). La calosa unida al fluorocromo que existe en el azul de anilina emite una fluorescencia blanco-amarillenta que destaca sobre el fondo oscuro. En ambos casos se tomaron fotografías con películas blanco y negro Plus-X de Kodak, 100 ASA y también en color Kodak Tris-X de 400 ASA.

2.4. Preparación de muestras para microscopía óptica y microscopía electrónica

El material que va a ser observado tanto al microscopio óptico como al microscopio electrónico, necesita ser sometido a una serie de tratamientos previos para conseguir que las estructuras celulares se mantengan lo más parecido a la realidad.

2.4.1. Fijación

La fijación es la etapa más importante ya que preserva la estructura celular y retarda o frena la aparición de las alteraciones propias de un tejido después de su muerte. Hemos usado los fijadores químicos que a continuación se describen.

Glutaraldehido

El empleo de glutaraldehido como fijador es excelente ya que su acción fijadora no hace perder actividad enzimática y preserva perfectamente las estructuras celulares.

Preparación del glutaraldehido:

El glutaraldehido se prepara en el momento de su uso a partir de una solución comercial (TAAB) al 25% diluyéndolo en tampón cacodilato 0.1 M para obtener una solución de glutaraldehido al 3%.

Preparación del tampón cacodilato:

El tampón cacodilato se prepara a una solución 0.2 M disolviendo 21.4g de cacodilato sódico en 500 ml de agua destilada ajustando el pH a 7.3. Esta solución de 0.2 M de cacodilato se guarda a 4° C durante meses. En el momento de su utilización se diluye el tampón 0.2 M hasta alcanzar la molaridad deseada y se ajusta nuevamente el pH adecuado.

Tanto la preparación del fijador como la fijación de las muestras debe realizarse en campana para eliminar los vapores tóxicos del mismo.

Procedimiento:

- Se sumerge el material en un volumen del fijador durante 2 h a temperatura ambiente.
- Seguidamente se lava bien con el tampón de cacodilato 0.1 M tres veces durante 2h.

Glutaraldehido/Paraformaldehido

También se ha usado como fijador una mezcla de glutaraldehido y paraformaldehido, ya que ambos fijadores juntos incrementan la buena preservación del tejido (Karnovsky, 1965). La mezcla que ha dado mejores resultados en nuestro material es de 2% paraformaldehido y 2,5% de glutaraldehido en cacodilato 0,1 M.

Preparación:

Se disuelve 5 g de paraformaldehido en 8ml de agua destilada y se añaden 12.5 ml de tampón cacodilato 0.2 M. Se mezclan en baño María para que se disuelva el paraformaldehido y se añaden gotas de sosa (NaOH 1 N) hasta su disolución total. Se

deja enfriar en frigorífico y se añade 2.5ml de glutaraldehído 25 % se ajusta el pH a 7.3 y se enrasa a 25ml.

Procedimiento:

- Se sumerge el material en el fijador durante 2 h a temperatura ambiente.
- Se lava el material fijado en el mismo tampón cacodilato 3 veces durante 2 h.

Tetróxido de osmio

En el caso de las muestras utilizadas para el estudio de la ultraestructura, se realizó una postfijación después de la fijación. Se utilizó tetróxido de osmio (OsO_4) al 1% en el mismo tampón cacodilato empleado en la prefijación

Preparación:

Para conseguir una buena disolución de tetróxido de osmio, se debe preparar 24 h antes de su empleo. Se partió de una ampolla de 100 mg. de tetróxido de osmio (Serva). Primero hay que quitar la etiqueta de la ampolla con agua caliente que se introduce esta en un frasco de boca ancha. Se rompe la ampolla en el interior golpeando con una varilla de vidrio gruesa y se le añaden 100 ml de tampón que disuelve los cristales y así se conserva en el frigorífico a 4° C y en oscuridad para evitar su oxidación y bien tapado para impedir la salida de los vapores tóxicos del osmio.

Los vapores de osmio son muy tóxicos, es imprescindible realizar todas las operaciones con osmio bajo campana para no exponerse a ellos.

Procedimiento:

- Se sumerge la muestra en el tetróxido de osmio durante 2 h.
- Una vez transcurrida la postfijación, se lavan bien las muestras 3 veces durante 2 horas con el tampón cacodilato 0.1 M.

2.4.2. Deshidratación

Posteriormente se procedió a la deshidratación mediante una serie gradual de soluciones de etanol, al 30%, 50%, 70%, 90% y 100% utilizando los siguientes tiempos:

etanol 30%	30min.
etanol 50%	30min.
etanol 70%	1 h.
etanol 90%	2 h
etanol 100%	2 h.(hacer varios pases)

Cuando la experiencia lo requería las muestras se quedaban toda la noche en la solución de etanol al 70 % a 4° C y bien tapadas para que el etanol no se evapore.

2.4.3. Inclusión

Según las muestras fuesen posteriormente utilizadas sólo para estudios ultraestructurales y/o citiquímicos se utilizó epón o unicryl como medio de inclusión.

Epón

Para las muestras que iban a ser usadas para la observación de la ultraestructura se emplea la resina epón (Epikote 812 SERVA). La preparación de la resina es muy importante pues de su calidad depende más tarde la dureza de las inclusiones y la obtención final de buenos cortes.

Preparación:

Mezcla A

Epon (Epicote 812)	15.5 cc.
Anhidrido Dodec. Succinico (DDSA)	25.0 cc.

Mezcla B

Epon (Epikote 812)	50.00 cc.
Anhidrido Metil Nadico (MNA)	44.50 cc.

Ambas mezclas se agitan por separado durante 30min en un agitador magnético.

Las proporciones final de la resina es de:

Mezcla A	40.00 cc.
Mezcla B	60.00 cc.
DMP - 30 acelerador	1.80 cc.

Se conserva en el interior de jeringas en el congelador.

Procedimiento:

El proceso de inclusión se realiza de una manera gradual, haciendo un paso intermedio breve con unos 5min en oxido de propileno, que es un potente deshidratante y se utiliza antes de pasar a la resina y con él se elimina el alcohol de la muestra preparándose en el interior del material biológico, un ambiente de solubilidad adecuado que facilita la penetración de la resina.

- Las muestras se mantienen en oxido de propileno de 15 a 20 min.
- Las muestras se colocan en mezclas graduales de epón y oxido de propileno que se realizan de la siguiente forma:

oxido de propileno + epón (3:1)	1 h
oxido de propileno + epón (1:1)	2 h
oxido de propileno + epón (1:3)	4 h
epón puro	10 a 12 h

A continuación se colocaron en el fondo de cápsulas de gelatina que después se rellenan de resina. Finalmente el epón se polimeriza en estufas a 60° C durante 48 horas.

Unicryl

Para estudios citoquímicos se utilizó preferentemente la resina Unicryl. Esta tiene la ventaja de que su preparación y manipulación son más simples y su polimerización puede hacerse a temperatura ambiente, en estufa a 80° C y a ultravioleta a -20° C.

Procedimiento:

- Se sumergen las muestras 8 h en una solución de etanol puro / unicryl en la proporción 1:1.
- Se pasan directamente a Unicryl puro durante 24 h.
- Se colocan las muestras en el fondo de unas cápsulas adecuadas de gelatina que después se rellena de resina nueva.
- Se orienta la pieza en el fondo de la cápsula con una aguja enmangada.

La polimerización de las muestras incluidas en la resina Unicryl se realiza con luz ultravioleta a -20°C durante 4 días.

2.4.4. Microtomía

Para la obtención de secciones, primero es necesario preparar la superficie de los bloques que se desean cortar. Para ello se colocan las cápsulas bajo una lupa y se talla una pirámide con una base en forma de trapecio que contiene el material biológico. Los cortes se realizaron con un ultramicrotomo "ULTRACUT E" de REICHERT-JUNG.

En primer lugar se hacen cortes semifinos de espesor de 1µm aproximadamente que se colocan en un portaobjetos sobre una gota de agua y se ponen en una placa calefactora a 37° C que ayudará a evaporarse lentamente la gota mientras el corte se estira y se adhiere al portaobjetos. Una vez seleccionada la zona de interés se corta de nuevo con el ultramicrotomo, esta vez para obtener cortes ultrafinos de un espesor entre 60 y 90 nm. Los cortes quedan flotando sobre la superficie de agua bidestilada que se encuentran en una borde en la cuchilla y su grosor esta relacionado con el color que presentan debido a la reflexión de la luz. Los más adecuados son los de color blanco-amarillo. De la superficie del agua los cortes se recogen con la rejilla por contacto con la superficie del agua.

Las rejillas utilizadas generalmente son de cobre, aunque para algunas citoquímicas específicas se necesitan rejillas que no se alteren con los reactivos utilizados durante la reacción citoquímica, por lo que en este caso se utilizaron rejillas de oro o níquel. Previamente las rejillas se recubren de una fina película de Formwar al 0.3% en cloroformo para muestras incluidas en Unicryl para facilitar la adhesión de los cortes en la rejilla.

Generalmente se emplearon cuchillas de vidrio y solo en algunos casos difíciles de obtener cortes, se ha utilizado una cuchilla de diamante.

2.4.5. Tinción

Cortes semifinos

Para una mejor visualización de las estructuras celulares, los cortes semifinos se tiñen inespecíficamente con una solución de azul de metileno / azul de toluidina / borax.

Preparación:

Se disuelve 0.5 gr de borax en 50 ml de agua destilada, calentar si hace falta, luego añadir 0.25 gr de azul de toluidina y 0.25 gr de azul de metileno.

Cortes ultrafinos

Para incrementar el contraste en los cortes ultrafinos se utilizó una doble tinción, acetato de uranilo y citrato de plomo según Reynold (1963).

Preparación del acetato de uranilo:

Se prepara una solución al 5% de acetato de uranilo en agua destilada, se filtra y se almacena al abrigo de la luz a 4° C. La luz puede hacer cristalizar el acetato de uranilo, así que es conveniente centrifugar la solución antes de su uso.

Procedimiento:

- Sobre una placa de porcelana se colocan las rejillas flotando cada una en una gota de la solución de acetato de uranilo al 5% durante 30min en oscuridad.
- Se lavan bien con agua destilada.
- Se dejan secar bien.

Preparación del citrato de plomo:

Nitrato de plomo	1.33 g
Citrato trisodico	1.67 g

Esta solución se agita fuertemente durante un minuto con un agitador magnético, tras lo cual se deja reposar 30 minutos. Añadir 8ml. de NaOH 1N y se completa hasta 50ml con agua bidestilada.

Procedimiento:

El citrato de plomo puede precipitar con el CO₂ del aire y formar precipitado de carbonato de plomo. Para su uso es necesario extremar las precauciones colocando las rejillas en medio alcalino y evitando la contaminación ambiental de CO₂. Como

protector ambiental se utilizan unas lentes de sosa rodeando las gotas de citrato de plomo donde se pone las rejillas. Estos se protegen de la contaminación y el aire mediante una placa petri invertida que las cubre.

- Se coloca la rejilla sobre la gota de citrato de plomo de forma que los cortes estén en contacto con él durante 5 o 6 min.
- Finalmente se lavan bien las rejillas con agua bidestilada.

2.4.6. Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido

Las muestras para microscopía electrónica de barrido fueron fijadas al 2 % paraformaldehído y 2.5% de glutaraldehído en tampón cacodilato 0.1 M y postfijadas en tetroxido de osmio al 1% en tampón cacodilato 0.1 M. Posteriormente las muestras fueron deshidratadas hasta etanol 70% y sometidas al procedimiento de "punto crítico", en el que el material se mantiene en una atmósfera de CO₂ con una presión y temperatura adecuadas para que el CO₂ esté en estado líquido. Con este paso realizamos la extracción de los restos de agua que quedan en el tejido. Finalmente las muestras son metalizadas con una fina capa de oro. Las muestras fueron observadas en el microscopio electrónico a barrido PHILIPS 505, utilizando una tensión de 18kV.

2.4.7. Observaciones

El seguimiento de la germinación del polen a distintas etapas de su incubación se hizo mediante microscopio invertido CARL ZEISS JENA. La observación de las muestras se hizo con un microscopio Zeiss Axioplan. Los cortes ultrafinos se observaron con un microscopio electrónico a transmisión ZEISS 10 C 60 Kv. La observación de las muestras al microscopio a barrido se ha realizado con un PHILIPS 505.

2.5. Citoquímica

2.5.1. Polisacaridos

Reacción del ácido periódico de Schiff (PAS)

La reacción de Schiff consiste en transformar los radicales alcohólicos (unión 1,2-glicol existentes dentro de las moléculas de los azúcares) a radicales aldehídos mediante

oxidación utilizando el ácido periódico. Posteriormente, los grupos aldehidos reaccionan con el reactivo de Schiff, con lo que se puede visualizar el producto de la reacción, una coloración roja, indicativa de la presencia de azucares.

Preparación del reactivo de Schiff:

Se disuelve 0.5g de fuchsina básica en 100 cc de ClH, 0.15 N. Se añaden 0.5 g de metabisulfito sódico. Se agita cada dos horas hasta su disolución y se obtiene fuchsina sulfurosa. Añadir 300 mgr de carbón activo para decolorar y agitar 5min, filtrar hasta conseguir filtrado claro y sin color, de no ser así se repite la filtración. Este reactivo puede conservarse en nevera durante dos meses.

Procedimiento:

Una vez obtenidas las secciones se recogen en portaobjetos que se pasan por frascos Coplin con las siguientes soluciones:

- Se colocan los portaobjetos en una solución de ácido periódico al 0,5 % en agua destilada a temperatura ambiente de 5 a 30min.
- Se Lavan con agua corriente 10min.
- Se colocan en Reactivo de Schiff de 10 a 15min.
- Se lavan con agua.
- Se colocan en bisulfito sódico al 2% de 1 a 2min.
- Se deshidratan en serie alcohólica.
- Montar y observar al microscopio.

Test del Acido Periodico / Semitiocarbacida / Proteinato de plata (Thiéry)

El test de Thiéry (1967) es un procedimiento ya clásico en microscopia electrónica para la determinación de polisacaridos en muestras biológicas. Se trata de una adaptación de la reacción de Schiff. Con ella se produce el paso de los radicales alcohólicos (unión 1,2-glicol existentes dentro de las moléculas de los azucares) a radicales aldehidos mediante oxidación utilizando el ácido periódico. Los grupos aldehidos reaccionan con la tiosemicarbacida, lo cual se puede visualizar haciéndola reaccionar con una sal de elevado peso molecular como el proteinato de plata, resultando como producto de la reacción un precipitado electrodensito indicativo de la presencia de azucares.

Para realizar esta técnica usamos muestras previamente fijadas con un fijador de tipo aldehído y sin osmio.

Procedimiento:

Una vez obtenidas las secciones se recogen en rejillas de oro o níquel y las sometemos al siguiente protocolo:

- Se incuba la rejilla sobre una gota de ácido periódico al 1% de 20 a 30min.
- Se lava en agua bidestilada manteniendo en agitación durante 5min.
- Se mantiene la rejilla sobre una gota de la solución de tiosemicarbácida al 1% en ácido acético al 10% durante 30min.
- Se lava mediante agitación en:
 - ácido acético al 10% durante 5min.
 - agua bidestilada 5min.
- Se incuba la rejillas sobre una gota de proteínato de plata al 1% en agua destilada durante 30min. Este último paso se realizó totalmente en oscuridad para evitar la oxidación de la solución de plata por luz.
- Finalmente se lava con agua bidestilada mediante agitación.

2.5.2. Lípidos

Reacción del Sudan black B

La reacción del Sudan Black B es una reacción usada para la detección histoquímica de los lípidos. Mediante ella el Sudan Black B se une a todos los lípidos incluye fosfolípidos fijados preferentemente con osmio ya que los lípidos son solubles en soluciones orgánicas, dando lugar a una coloración azul-negra.

Preparación:

Se prepara una solución del Sudan Black B en alcohol 70% a saturación en un bote limpio y desengrasado, se agita un poco y se deja a 60°C de temperatura en estufa toda la noche y por la mañana se filtra antes de su uso.

Procedimiento:

- Se lavan muy bien los portaobjetos en agua destilada y se dejan secar.
- Se lavan otra vez con alcohol 50% y se dejan secar.

- Se obtienen cortes 0.6 μm de espesor y se recogen en los portaobjetos ya lavados.
- Se colocan en la solución de Sudan Black B durante 15min a 40° C en estufa.
- Se lavan los portaobjetos en agua corriente del grifo.
- Montar y observar al microscopio.

2.6. Inmunocitoquímica

Para inmunocitoquímica es recomendable incubar previamente con el tampón PBS (Fosfato buffer salino) y bloquear posibles lugares de unión inespecífica con BSA (Albumina suero bovina).

Preparación de la solución "stock" de PBS:

Se prepara la solución "stock" PBS (10X) con los constituyentes siguientes:

Na ₂ HPO ₄	80 mM
KH ₂ PO ₄	15 mM
NaCl	1,3 mM
KCl	30 mM

Luego se autoclava y se diluye la solución "stock" a la concentración adecuada para cada utilización.

Para inmunocitoquímica a microscopía electrónica los cortes se recogen en rejillas de níquel recubiertas con una película de Forward que se dejan flotar por la cara donde están los cortes sobre gotas de las soluciones que se van a usar y con los correspondientes anticuerpos.

Para inmunocitoquímica a microscopía óptica los cortes se colocan sobre portaobjetos y se señalan sus sitios con un lápiz de diamante. Encima de los cortes se coloca gotas de las soluciones que se van a usar con los anticuerpos correspondientes. Se recomienda un ambiente de cámara húmeda. El control se hizo eliminando el paso por el primer anticuerpo.

2.6.1. Inmunolocalización de Pectinas

Se han utilizado para detectar específicamente pectinas anticuerpos monoclonales JIM 7 y JIM 5 realizados sobre conejo y que reconocen de manera específica epitopos de pectinas esterificadas y no esterificadas respectivamente (Knox y col., 1990). El marcado de las pectinas se realizó con un segundo anticuerpo comercial anti-conejo (IgG) desarrollado en cabra y conjugado a partículas de oro coloidal 10 nm. Estos anticuerpos han sido cedidos amablemente de la parte del Dr. Knox (John Innes Institut, Inglaterra).

Procedimiento:

- Se mantienen las rejillas durante 1min en agua bidestilada
- Preincubación durante 10min en 1 %PBS.
- Preincubación durante 15min en BSA 5% en 1 % PBS para bloquear posibles lugares de unión inespecífica con el anticuerpo.
- Incubación con el primer anticuerpo (JIM 5 o JIM 7) diluido 1/5 en 1 % PBS durante 1h 30min.
- Lavar en 1 % PBS mediante agitación tres veces durante 5min cada vez.
- Incubar con el segundo anticuerpo diluido 1/50 en 1 % PBS durante 1h 30min.
- Lavar para arrastrar todos los restos que quedan de este segundo anticuerpo.
 - 5 veces con agitación en 1 % PBS, 1min cada una.
 - 5 veces con agitación en agua destilada.
- Contrastar las rejillas con acetato de uranilo al 5% durante 15min y observar.

2.6.2. Inmunofluorescencia de Calosa

Para detectar la posible presencia de calosa en la pared del tubo político durante la germinación hemos utilizado como primer anticuerpo un monoclonal anticulos desarrollado en ratón (Australia). Como segundo anticuerpo se utilizó un anti-ratón (IgG) desarrollado en cabra conjugado con isotiocionato de fluoresceína (F.I.T.C), cuando la reacción fue detectada a nivel de microscopía de fluorescencia, o bien conjugado con partículas de oro de 10 nm para su observación al microscopio electrónico.

Procedimiento a nivel de cortes semifinos:

- Preincubar durante 3 h en 5% BSA en 0.1% PBS pH 7.4 y 0.1% Tween 20.
- Lavar con 0.5% BSA en 0.1% PBS.
- Incubar durante 2 h con el primer anticuerpo anti calosa diluido 1/20 en 0.5% BSA en 0.1% PBS pH 7.4.
- Lavar 3 veces en 0.5% BSA en 0.1% PBS pH 7.4.
- Incubar en el segundo anticuerpo diluido 1/100 en 0.5% BSA en 0,1% PBS pH 7.4 durante toda la noche.
- Lavar con 0.5% BSA en 0,1% PBS pH 7.4.
- Dejar en estufa a 30° C durante 24 h en oscuridad

Procedimiento a nivel de cortes ultrafinos:

- Mantener las rejillas durante 1min en agua bidestilada.
- Preincubación durante 10min en 0.1% PBS de pH 7.4.
- Preincubación durante 1h 30min en BSA 5% en 0.1% PBS a pH 7.4.
- Incubación con el primer anticuerpo anti-calosa diluido 1/20 en 0.1% PBS a pH 7.4 durante 3 horas.
- Lavar tres veces con agitación en 0.1% PBS a pH 7.4 durante 5min cada una.
- Incubar con el segundo anticuerpo anti-raton diluido 1/50 en 0.1% PBS a pH 7.4 durante 2h.
- Lavar para arrastrar todos los restos que quedan de este segundo anticuerpo.
 - 5 veces con agitación en 0,1% PBS de pH 7.4, 1min cada una.
 - 5 veces con agitación en agua destilada, 1min cada una.
- Contrastar las rejillas con acetato de uranilo al 5% durante 15min.

2.6.3. Inmunolocalización de la Proteína alergénica mayoritaria

Con objetivo de localizar el alergeno mayoritario del polen del olivo (Ole e 1) durante la germinación, hemos recurrido a un anticuerpo monoclonal específico (10H1) que reconoce un epitopo de esta proteína. El anticuerpo nos ha sido proporcionado por el Doctor Lahoz de la Fundación Jiménez Díaz (C.S.I.C Madrid). Este anticuerpo (IgG)

ha sido desarrollado en ratón. Como segundo anticuerpo se utilizó un anti-ratón comercial desarrollado en cabra y conjugado con partículas de oro coloidal de 10 nm.

Procedimiento:

- Se mantienen las rejillas durante 1min en agua bidestilada.
- Preincubacion durante 10min en 1 %PBS.
- Preincubacion durante 15min en BSA 5% en 1 % PBS para bloquear posibles lugares de unión inespecífica con el anticuerpo.
- Incubacion con el primer anticuerpo diluido 1/20 en 1 % PBS durante 1h 30min.
- Lavar en 1 % PBS mediante agitación tres veces durante 5min cada vez.
- Incubar con el segundo anticuerpo diluido 1/30 en 1 % PBS durante 2h.
- Lavar para arrastrar todos los restos que quedan de este segundo anticuerpo.
 - 5 veces con agitación en 1 % PBS, 1min cada una.
 - 5 veces con agitación en agua destilada, 1min cada una.
- Contrastar las rejillas con acetato de uranilo al 5% durante 15min y observar.

2.7. Determinación bioquímica de los niveles de ole e 1 (alergeno mayoritario del polen del olivo).

2.7.1. Electroforesis.

Preparación de extractos proteicos crudos:

Para este estudio, la inducción de germinación *in vitro* del polen del olivo se realizó a gran escala (8 gr de polen) según el método descrito en el apartado 2.2. Como paso preliminar, el polen germinado y no germinado fue separado mediante la utilización de un filtro de 0.053 μm a distintos tiempos desde el inicio del cultivo (5min, 1h, 2h, 4h, 8h, 16h). Ambos tipos de muestras fueron almacenadas independiente a -20°C . Igualmente, se obtuvieron muestras del medio de cultivo en los mismos estadios del cultivo mediante filtración a través de membranas de 0.2 μm de diámetro de poro. De estos medios de cultivo se realizaron alícuotas, que fueron almacenadas a -20°C . Las muestras de polen fueron trituradas en un mortero con nitrógeno líquido y arena de cuarzo. El polvo resultante fue resuspendido en 10 ml g^{-1} de tampón de extracción

(50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM EGTA –etilén glicol-bis(β -aminoetil éter)-, 5 mM ácido ascórbico, 0.1 M DTT –ditiotreitól-, 2 mM PMSF –fenilmetilsulfonil fluoruro-). Los homogenados se incubaron 30min sobre hielo, agitando frecuentemente y posteriormente fueron clarificados mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 20min a 4° C.

Los sobrenadantes correspondientes se transfirieron a un tubo limpio sin tocar el precipitado y se almacenaron a -20°C.

Cuantificación de proteínas: (método Bradford)

La detección cuantitativa del nivel de proteínas presentes en cada fracción obtenida se realizó según el método de Bradford (1976). Con objeto de realizar una curva patrón, se elaboró una solución madre de BSA ($1\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ en agua destilada), de la que se tomaron muestras de 1, 2, 4, 8, 16 y 32 μl y se mezclaron con agua hasta 800 μl , y finalmente con 200 μl de reactivo comercial de Bradford (Bio-Rad), De igual modo se mezclaron 5 μl de cada una de las fracciones a determinar, con 795 μl de agua destilada y 200 μl de reactivo de Bradford.

La medida de la densidad óptica a 595 nm se efectuó en un espectrofotómetro Beckman DU-7 en el intervalo de tiempo entre 5min y 1 hora después de la adición del reactivo.

Con los datos de concentraciones de BSA de la curva patrón y sus medidas correspondientes de los valores de densidad óptica, se estableció una recta de regresión, en la cual se interpolaron los valores de concentración de proteínas presentes en cada una de las fracciones, a partir de la densidad óptica medida.

Preparación de geles de acrilamida:

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12% según se muestra en la siguiente tabla:

	Gel concentrador 4%	Gel separador 12%
(A) Solución de acrilamida/bis acrilamida al 30%	0.5 ml	3.7 ml
(B) Tampón del gel separador 4x		2.3 ml
(C) Tampón del gel concentrador 4x	1 ml	
10% SDS	40 μ l	90 μ l
50% Glicerol		0,9ml
H ₂ O	2.46 ml	2.1 ml
10% persulfato amónico	50 μ l	50 μ l
TEMED	10 μ l	5 μ l

(A): 29.2 % acrilamida, 0.8 % bis-acrilamida

(B): 1.5 M Tris-HCl pH 8.8

(C): 0.5 M Tris-HCl pH 6.8

SDS-PAGE

Las muestras a analizar fueron mezcladas con tampón de muestras 5x (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 % SDS, 50 mM DTT, 10 % glicerol y 0.01 % de azul de bromofenol) en relación de 4:1 (v/v). Para el análisis del medio de germinación, se utilizaron en todos los casos 24 μ l de medio más 6 μ l de tampón de muestras 5x. Las muestras preparadas, se calentaron a 98° C durante 3min. En todos los geles se incluyó una calle correspondiente a marcadores de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad).

La separación de los polipéptidos fue realizada en un equipo de electroforesis vertical "Mini-PROTEAN II" (Bio.Rad Laboratories). Se utilizó como tampón catódico 0.025 M Tris-HCl pH 8.3, 0.192 M glicina, 0.1 % SDS y como tampón anódico 0.025 M Tris-HCl pH 8.3, 0.192 M glicina. La electroforesis se realizó bajo voltaje constante de 200V.

Los geles se tiñeron con una solución de azul Coomassie (10 % ácido acético, 25 % metanol, 0.1 % azul Coomassie R-250) durante toda la noche. Posteriormente, los geles se destiñeron con solución de destinción (25 % metanol, 10 % ácido acético).

2.7.2. Inmunodetección sobre membranas

Las proteínas separadas electroforéticamente se transfirieron a una membrana PVDF "Immobilon-NC" (fluoruro de polivinilideno) utilizando un equipo "Mini Trans-Blot" (Bio-Rad Laboratories mediante voltaje constante (100 V) durante 1.5 h a 4°C con agitación continua y usando como tampón de transferencia una solución 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 20 % metanol, (pH 8.3).

Con objeto de monitorizar la eficacia de la transferencia, los geles transferidos correspondientes fueron teñidos con solución de azul Coomassie como se describe en el apartado anterior. Las membranas fueron teñidas igualmente con una solución de azul Coomassie (50 % metanol, 7.5 % ácido acético, 0.1 % azul Coomassie R-250). Tras desteñir parcialmente con una solución de 50 % metanol, 7.5 % ácido acético, las calles correspondientes a los marcadores de peso molecular fueron cortadas, y el resto de la membrana, desteñida totalmente usando una solución de 90 % metanol, 5 % ácido acético.

Posteriormente la membrana fue bloqueada en una solución de TBST mas leche desnatada en polvo (TBS + 0.1 % Twen 20 + 3 % leche en polvo) durante 6 h. Las membranas fueron incubadas posteriormente con el primer anticuerpo (Mab OL-1) diluido 1: 1000 en la solución de bloqueo a 4° C durante 12 h. Tras lavar 3 x 20min en TBST, las membranas se incubaron durante 5 horas con un anticuerpo secundario (anticuerpo anti IgG de ratón desarrollado en cabra, conjugado con fosfatasa alcalina – Sigma) diluido 1: 2500 en TBST. Tras lavar 3x 20min con TBST, las membranas se equilibraron durante 5min en tampón 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂. La detección se realizó con una solución comercial de NBT/BCIP (Amresco).

La intensidad de las bandas reactivas al anticuerpo se midió utilizando el software NIH Image 1.61 sobre fotografías digitalizadas de la membrana.

2.8. Obtención y cultivo de protoplastos

Se ha obtenido protoplastos a partir de polen de olivo germinado *in vitro* a 3, 5, 7 y 12 horas, utilizando distintas soluciones enzimáticas que se obtienen combinando las enzimas y azúcares a diferentes concentraciones.

Soluciones enzimáticas:

Enzimas:

1% maceroenzima R-10, 2% celulosa onuzuka R10 y 0,5% celulosa onuzuka RS.

1% maceroenzima R-10 y 2% celulosa onuzuka R10.

Azúcares:

Manitol a concentraciones de 0.2, 0.3, 0.6, 0.9 y 1M.

Sacarosa 0.2, 0.3, 0.6, 0.9 y 1M.

Las concentraciones de estos enzimas y azúcares se obtienen mediante dilución en solución salina

Composición de la solución salina "stock":

CL ₂ Ca-----	14,8 g/l
PO ₄ KH ₂ -----	0,272 g/l
NO ₃ K-----	1,010g/l
SO ₄ Mg(7H ₂ O)-----	2,460 g/l
KI-----	1,6 mg/l
SO ₄ Cu (5H ₂ O)-----	0,25 mg/l

Todas las soluciones se han realizado en 20 mM de la solución salina diluida 1:10 y se han ensayado durante 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 horas. Todo ello bajo oscuridad en una temperatura de 20°C y en agitación.

Como controles, se ha utilizado polen sin germinar en la solución enzimática óptima y polen germinado en la solución óptima suprimiendo los enzimas.

Se determinó la acción de la solución enzimática durante 1 h 30min sobre el tubo polínico formando protoplastos.

Para su posterior estudio y cultivo se añade un volumen de la solución salina bajando la concentración de manitol a 0.6 M para que no se exploten. Los protoplastos fueron estudiados al microscopio óptico mediante la tinción de DAPI para ver el comportamiento de los núcleos, previa fijación en etanol-acético (3 / 1). También fueron separados de la solución enzimática y los restos de tubos polínicos centrifugando el material a 0.6 M de manitol encima de una solución de 40 % de sacarosa durante 30min a 1200 rpm y cultivadas durante 24 horas en el medio de cultivo Murashige y Skoogs (1962).

Medio de cultivo de Murashige y Skoog:

Solución de Macronutrientes

NH ₄ NO ₃ -----	3.3
KNO ₃ -----	3.8
CL ₂ Ca.2H ₂ O-----	0.88
MgSO ₄ .7H ₂ O-----	0.74
KH ₂ PO ₄ -----	0.34

Cantidades expresadas en gr/100 ml

Solución de Micronutrientes (x10)

KI-----	0.166
H ₃ BO ₃ -----	1.24
MnSO ₄ .4H ₂ O-----	4.46
ZnSO ₄ .7H ₂ O-----	1.72
NaMoO ₄ .2H ₂ O-----	0.05
CuSO ₄ .5H ₂ O-----	0.005
CoCL ₂ .6H ₂ O-----	0.005

Cantidades expresadas en gr/100 ml

Solución de Hierro

FeSO₄.7H₂O-----0.0278

EDTANa₂-----0.0373

Cantidades expresadas en gr/ 5 ml

Solución de Vitaminas

Myoinositol-----0.2

Ac. Nicotínico-----0.001

Piridoxina ClH-----0.001

Thiamina ClH-----0.004

Cantidades expresadas en gr/10 ml

Composición de las hormonas

NAA-----5μM

BAP-----2μM

El pH del medio fue ajustado a 7.2 y el medio fue autoclavado y luego filtrado mediante membranas de 0,2 μm de diámetro de poro. Los cultivos se mantuvieron a 25°C y oscuridad durante 24 horas.

Los protoplastos cultivados han sido usados en primer lugar para citoquímica para localizar la pared con el Calcofluor. La observación se ha hecho al microscopio de fluorescencia.

La inmunocitoquímica para pectinas esterificadas y de-esterificadas respectivamente con los anticuerpos JIM7 y JIM5 y como segundo anticuerpo conjugado con fluoresceína.

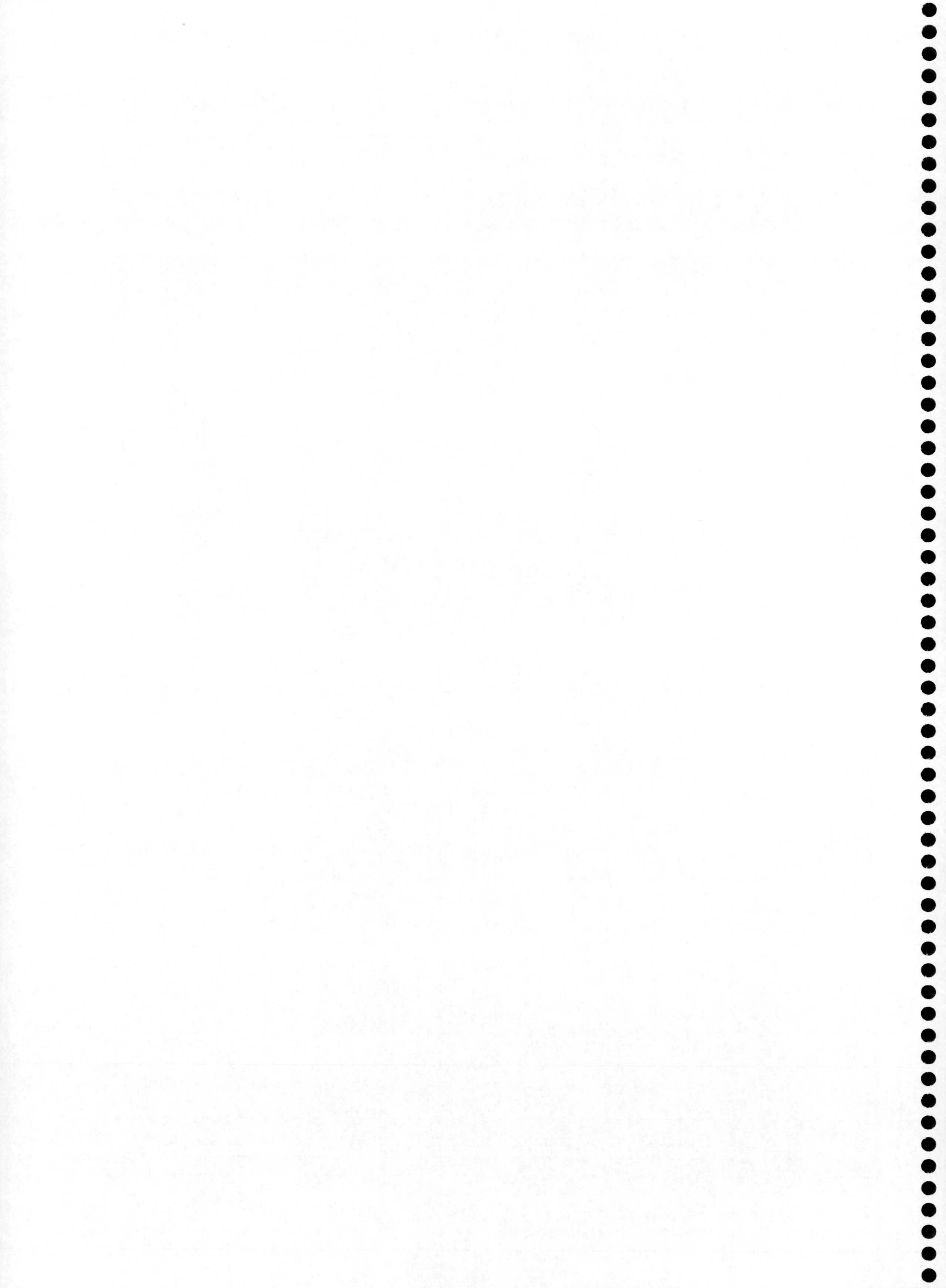
Procedimiento:

- Poner protoplastos cultivados sobre portas tratadas con TESPA.
- Preincubar durante 3 h en 5% BSA en 0.1% PBS pH 7.4 y 0.1% Tween 20.
- Lavar con 0.5% BSA en 0.1% PBS.
- Incubar durante 2 h con el primer anticuerpo JIM5 o JIM7 diluido 1/20 en 0.5% BSA en 0.1% PBS pH 7.4.

- Lavar 3 veces en 0.5% BSA en 0.1% PBS pH 7.4.
- Incubar en el segundo anticuerpo diluido 1/100 en 0.5% BSA en 0,1% PBS pH 7.4 durante toda la noche.
- Lavar con 0.5% BSA en 0,1% PBS pH 7.4.
- Dejar en estufa a 30° C durante 24 h en obscuridad

Para microscopía electrónica los protoplastos antes y después del cultivo, fueron fijados en glutaraldehído al 3%, postfijados en tetróxido de ósmio al 1% y utilizando epón como medio de inclusión.

IV. RESULTADOS



1. Aspectos citológicos del polen germinado sobre el estigma

Inicialmente se ha realizado una aproximación a la germinación *in situ* del polen en el estigma. Cuando el polen germina y el tubo alcanza una determinada longitud (Fig.1a) se observa mediante la tinción de DAPI que los núcleos, tanto el vegetativo como el de la célula generativa se encuentran en el tubo polínico germinado entre las papilas del estigma (Fig.1b). Mediante la tinción de azul anilina se observa fluorescencia blanco-amarilla a nivel de la pared del tubo próxima al grano, índice de la presencia de calosa ya en las primeras etapas del desarrollo del tubo (Fig.1c).

La tinción con PAS permite visualizar con un color rosado intenso tanto en las paredes celulares del estigma como en las del polen y del tubo polínico, como consecuencia de su naturaleza polisacáridica. También se tiñe, aunque muy débilmente, un material amorfo que se localiza en la superficie de las papilas del estigma y que probablemente corresponde a material exudado por las mismas (Fig.1d).

Si utilizamos una tinción específica para lípidos, como es el sudan black B, aparece una intensa tinción positiva a nivel de la pared del grano recubriendo la exina, también se localizan inclusiones teñidas positivamente de color negro en el citoplasma de los tubos polínicos que discurren entre las células del estigma (Fig.1e).

La observación a microscopio electrónico de barrido nos permite apreciar el estigma recubierto por una gran cantidad de granos de polen (Fig.2a). A mayor aumento, se puede ver como algunos de estos granos germinan en la superficie de las papilas estigmáticas (Fig.2c).

Con objeto de estudiar a más detalle los aspectos que acabamos de perfilar y dada la dificultad de hacer un seguimiento de la germinación en el estigma controlando los tiempos, se procedió a realizar estos estudios sobre la germinación *in vitro*. Para ello

previamente se optimizaron tanto el medio como las condiciones de germinación con objeto de obtener un porcentaje elevado de granos germinados (Fig.2b).

2. Germinación *in vitro*

2.1. Calidad del polen: viabilidad

La calidad del polen se puede definir como capacidad que tiene este para fecundar al macrogametofito y producir un cigoto. Dicha calidad se puede evaluar:

Por la integridad de sus membranas.

Por la capacidad de germinación.

Por la capacidad de fertilización, es decir, la capacidad de producir el cigoto.

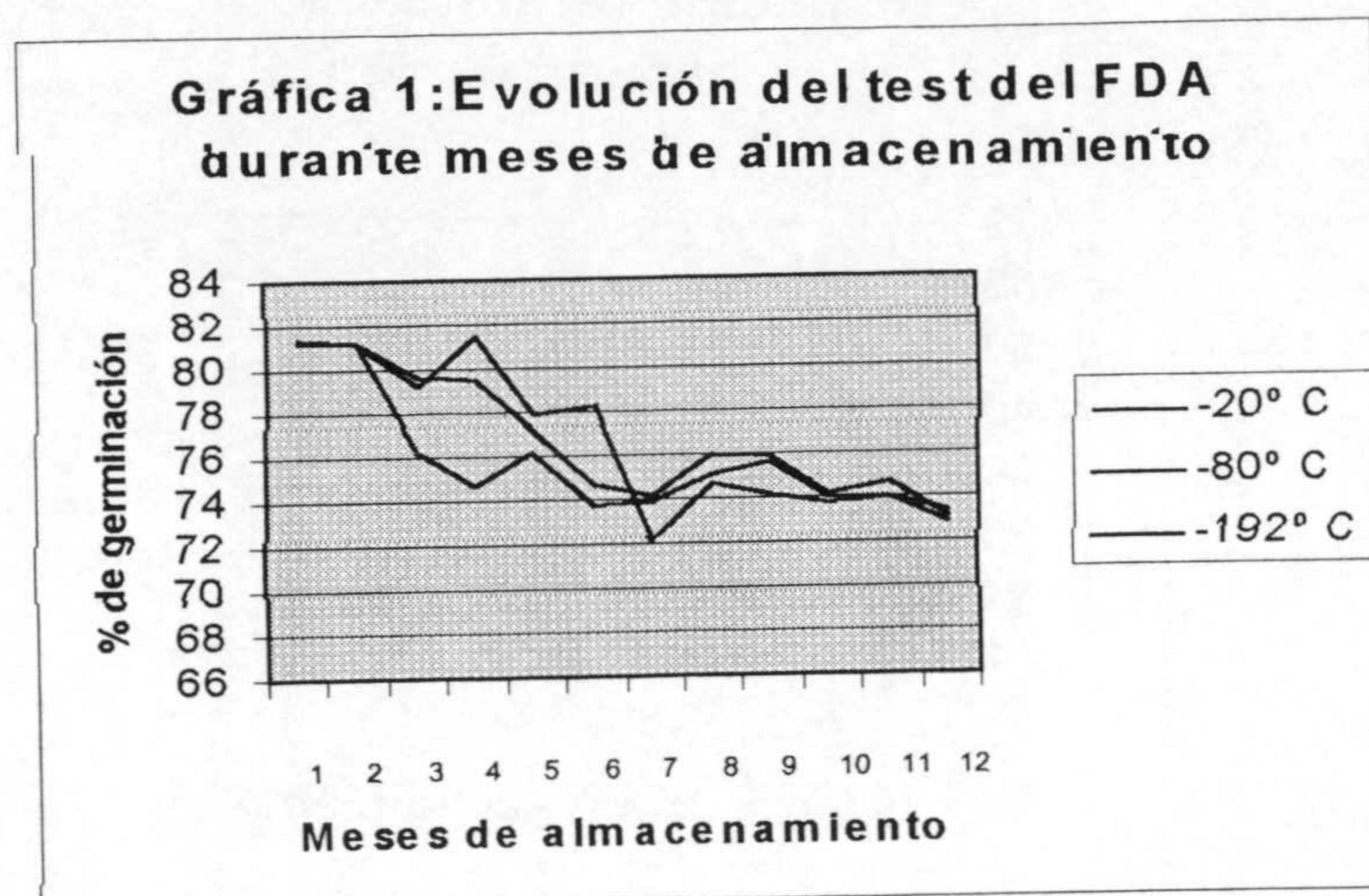
De estas tres posibilidades las dos primeras son factibles de realizar en el laboratorio, mientras que la tercera presenta mayores dificultades.

2.1.1. Reacción fluorocromática: FDA

Un método para detectar la integridad de las membranas en el polen es mediante el test de la reacción fluorocromática usando diacetato de fluoresceína (FDA) (Heslop-Harrison 1970). El porcentaje de polen viable en el olivo es decir que fluorescen después del test con FDA, fué cercano al 82% cuando se trataba de polen fresco. También se hizo un seguimiento de la viabilidad del polen conservado a bajas temperaturas (- 20, - 80° C y en nitrógeno líquido) a lo largo de dos años consecutivos (97/98 y 98/99).

Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica 1 donde se presenta para cada temperatura, la media de los dos años, indicando que hay una pérdida de viabilidad desde 82 al 73% a lo largo de los meses de almacenamiento para cualquiera de las tres temperaturas.

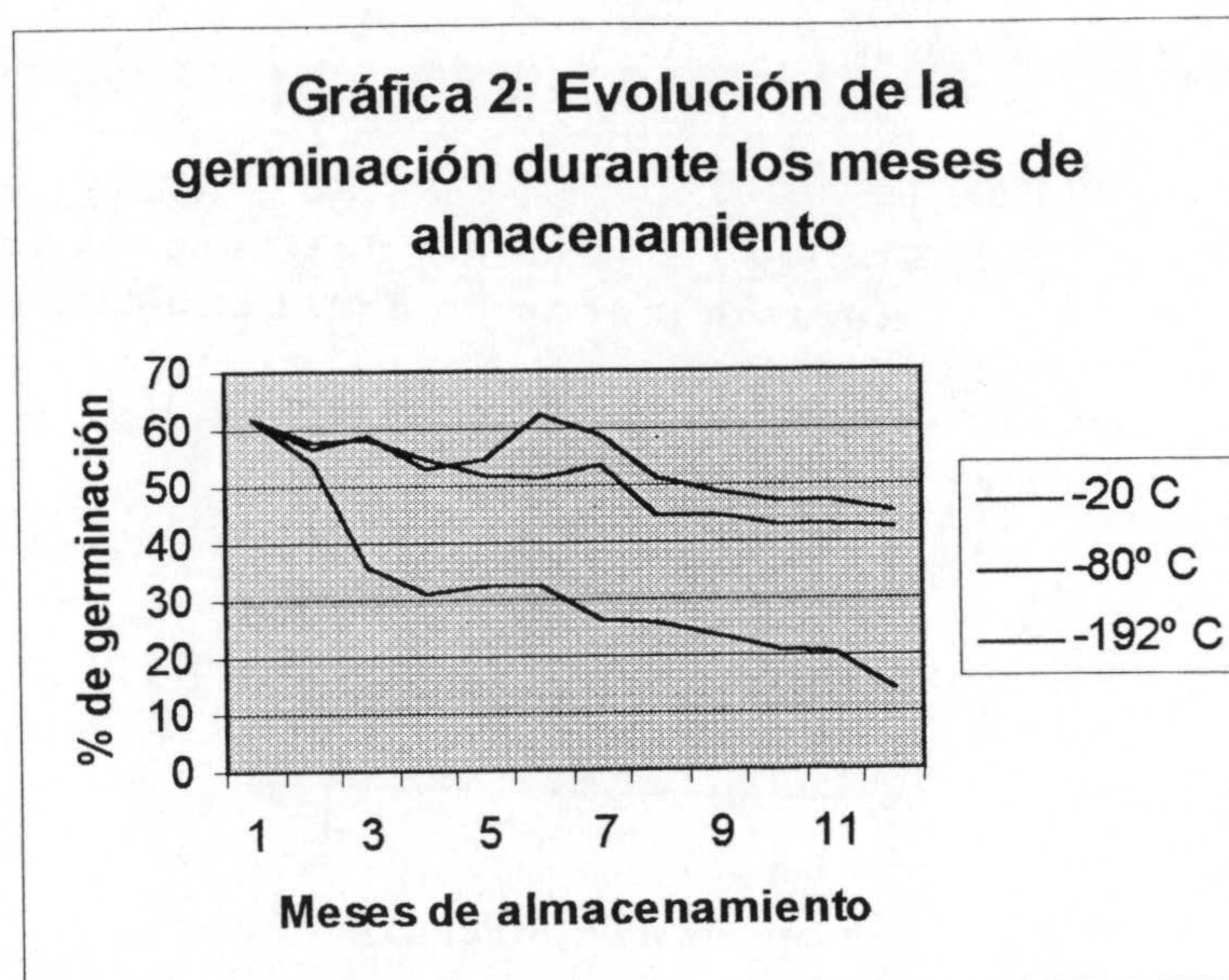
También se observa que la temperatura de almacenamiento no afecta tanto a la integridad de las membranas.



2.1.2. Porcentaje de germinación *in vitro*

La calidad del polen también ha sido evaluada determinando el porcentaje de polen que germina *in vitro*. Se ha considerado polen germinado cuando la longitud alcanza como mínimo el diámetro del grano de polen. Para la germinación también se realizó el seguimiento a cada temperatura y se ha hecho la media de los dos años de almacenamiento.

El porcentaje de germinación del polen fresco fue del 61,5%. Este porcentaje disminuye a lo largo de los meses, siendo las temperaturas de -80°C y de nitrógeno líquido las más idóneas para conservar el polen (46 y 43 % respectivamente). A -20°C la germinación disminuye notablemente hasta el 14 % (Gráfica.2).



2.2. Optimización del medio de germinación

Para determinar la viabilidad del polen y para hablar del porcentaje de germinación *in vitro*, previamente ha sido necesario optimizar tanto el medio como las condiciones de germinación.

Los ensayos realizados para optimizar el medio de germinación *in vitro* en *Olea europaea*. L, se realizaron en cada caso con una cantidad equivalente de medio de cultivo (2 ml ó 10 ml) y de granos de polen (2 mg o 10 mg) respectivamente. Los granos de polen fueron previamente prehidratados cámara húmeda durante 2 h.

El polen usado fue fresco o almacenado a -20°C durante dos meses como máximo, que es el tiempo en que la viabilidad y la germinación no se ven afectadas.

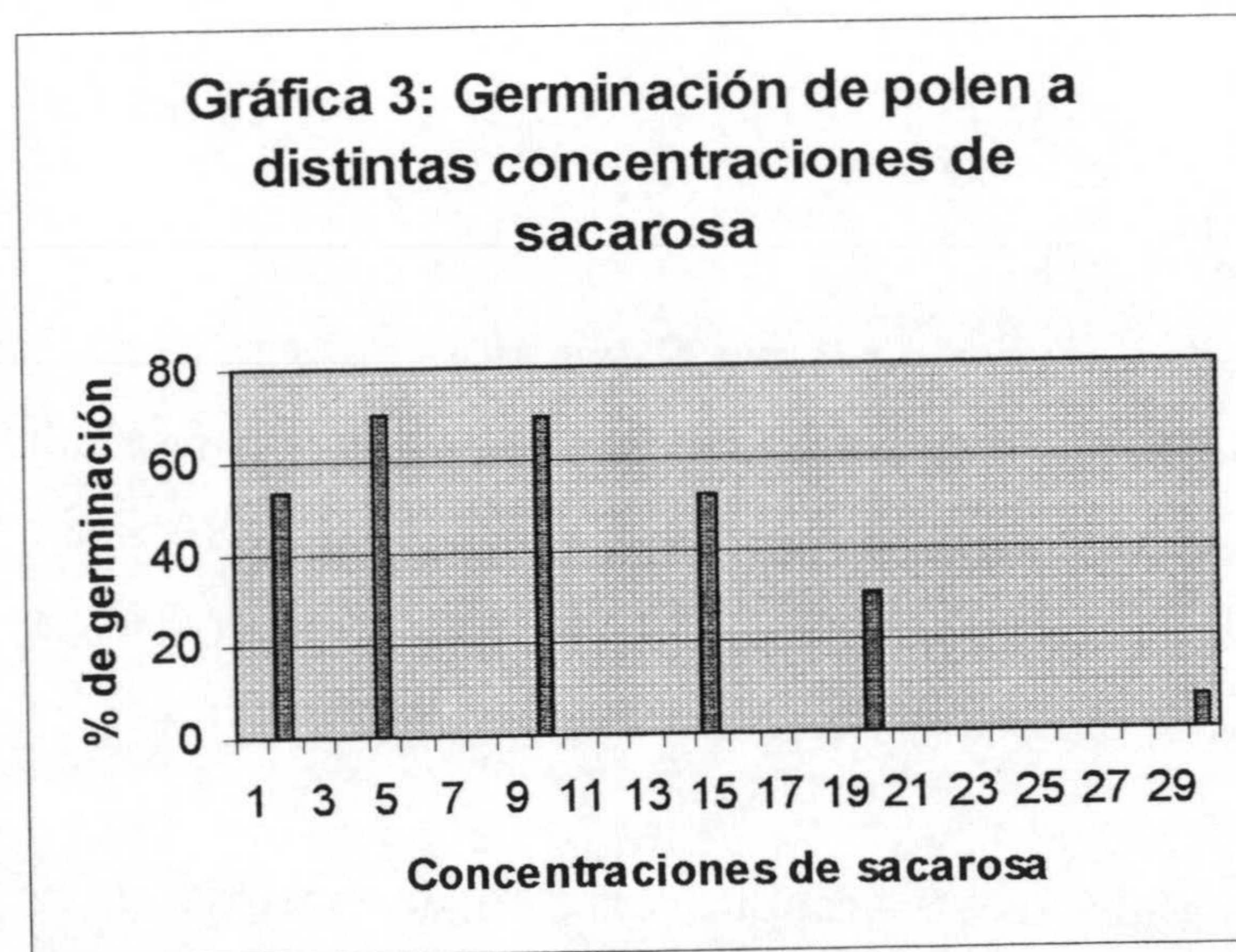
Después de probar distintos medios de germinación, elegimos como punto de partida el medio de (Brewarbaker y Kwack., 1963) con 20% de sacarosa. Con este medio se llegó a obtener un 30 % de germinación después de 12 horas de incubación en el medio a temperatura ambiente.

Con objeto de mejorar este porcentaje de germinación, se han introducido las modificaciones que se detallan a continuación.

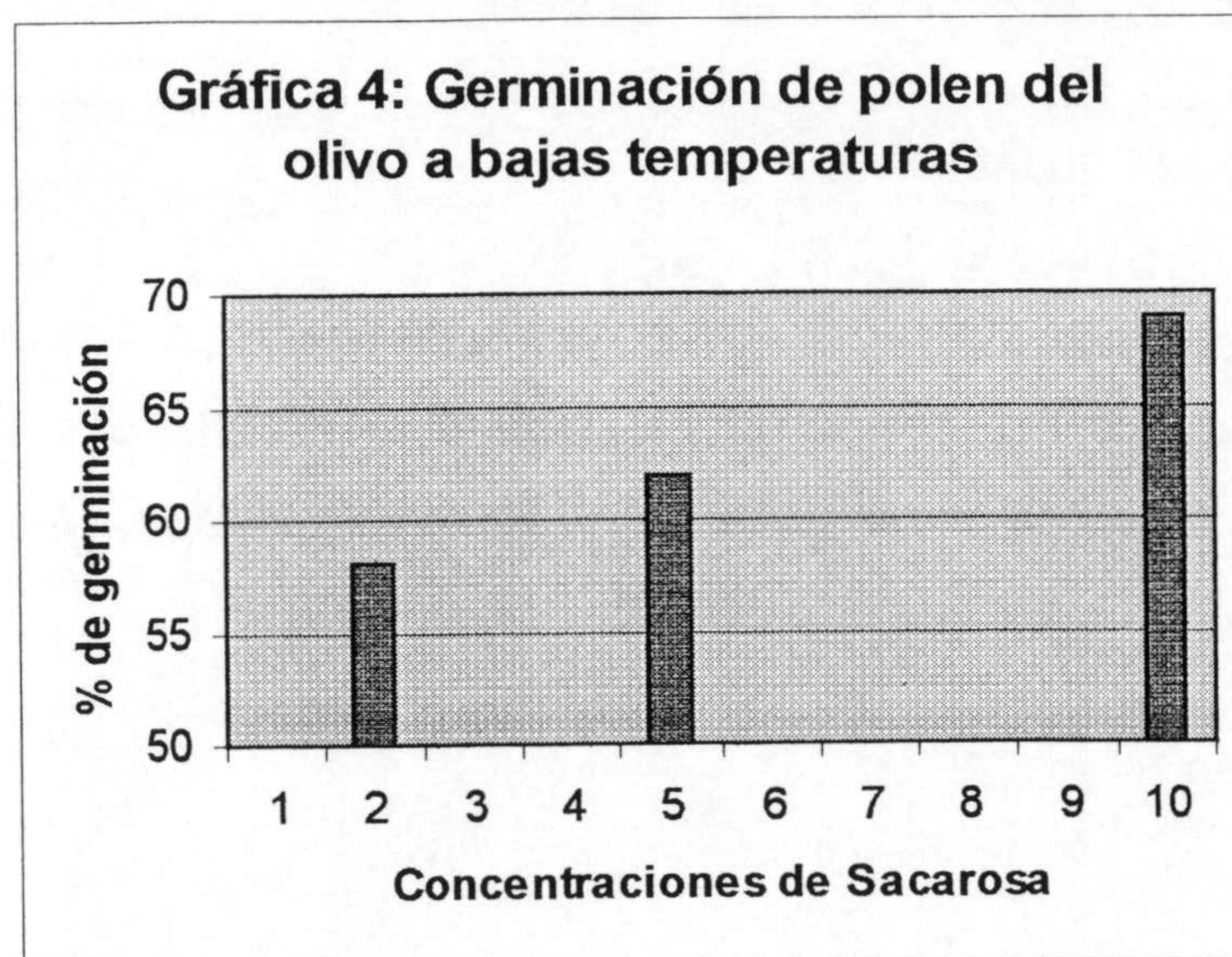
2.2.1. Variaciones introducidas.

Sacarosa

En primer lugar se ha variado la concentración de sacarosa del medio: 2, 5, 10, 15, 20 y 30 %. En la gráfica.3 se representan los resultados obtenidos, encontrándose que a bajas concentraciones de sacarosa (entre 2 y 15 %) se alcanzan los mejores resultados (Gráfica.3).



Se repitieron los ensayos anteriores durante tres años consecutivos utilizando concentraciones de 2,5 y 10 % de sacarosa, confirmándose que en el caso del olivo el mayor porcentaje de germinación se obtiene con 10 % de sacarosa (Gráfica.4).



Fragmentos de estigma

Se han realizado ensayos con y sin fragmentos de estigma del olivo en el medio a concentraciones bajas de sacarosa para ver si su presencia tiene influencia notable en la germinación *in vitro*. En este caso se ha realizado el seguimiento de la germinación desde 39min hasta los 360min de incubación. Los resultados de este seguimiento con y sin fragmentos de estigma se muestran en la tabla I.

Los mejores resultados se alcanzan con 5 % de sacarosa en las primeras horas de germinación, pero a partir de 3 horas este porcentaje se mejora ligeramente con 10 % de sacarosa.

El porcentaje de germinación se aumenta en cada caso con la presencia del estigma llegando a ser hasta del 88 %.

Resultados

	2 % sac	2 % sar + estigma	5 % sac	5 % sac + estigma	10 % sac	10 % sac + estigma
30min	5	5	10	10	5	10
60min	10	25	35	45	10	35
90min	20	50	40	60	15	40
120min	25	65	45	65	22	55
150min	50	70	50	75	45	70
180min	60	70	55	80	70	80
360min	70	80	80	80	85	88

Tabla. I: Influencia de los fragmentos de estigma sobre la germinación a distintos tiempos y concentraciones de sacarosa.

Temperatura de incubación

La temperatura es uno de los factores ambientales que más influyen en la germinación. Los ensayos de germinación se realizaron a temperatura ambiente, pero para estandarizarla a lo largo del año y evitar los posibles cambios ambientales en el laboratorio, se han comparado distintas temperaturas: 20, 25, 28 y 32° C.

A temperatura alta de 32° C, los granos comienzan a germinar antes, pero pronto se hinchan y estallan. Se observó que a 25° C se obtienen los mejores resultados.

Al aumentar o disminuir un poco la temperatura de incubación, el porcentaje de germinación se altera tan visiblemente que no es necesario realizar conteo.

pH

La influencia del pH en el medio de germinación es un factor también importante. Después de probar con diferentes valores entre 4 y 8 se ha visto la germinación tiene lugar cuando el pH oscila entre 5.5 y 6.5 que es el pH del medio. Al aumentar o

disminuir un poco el pH, el porcentaje de germinación se altera tan visiblemente que no es necesario realizar contaje.

Concentración de sales

Ciertos elementos como boro, potasio y calcio, son esenciales en algunas especies para la germinación *in vitro*. Se han variado las concentraciones de las sales del medio de germinación como ácido bórico, nitrato potásico y nitrato cálcico. Para ello, hemos modificado una a una las concentraciones de cada sal manteniendo las otras constantes.

La tabla I resume los porcentajes de germinación con las concentraciones salinas modificadas.

Sales	Concentración	Porcentaje de germinación
Ácido Bórico	0,005 %	23,89 %
”	0,01 %	53,15 %
”	0,03 %	22,24 %
Nitrato Potasio	0,005 %	48,58 %
”	0,01 %	53,15 %
”	0,03 %	34,17 %
Nitrato Cálcico	0,01 %	34,86 %
”	0,03 %	53,15 %
”	0,06 %	39,71 %

Tabla II: Influencia de las sales minerales sobre la germinación.

Se confirma que las concentraciones óptimas también para el olivo son las correspondientes al medio de Brewbaker y Kwak (1963).

Efecto de tween 20, tris y de extractos de levadura

Para intentar mejorar más el rendimiento del medio de germinación, se le han añadido algunas sustancias que tienen efectos favorables en otras especies. Se probaron distintas concentraciones de Tris y Tween 20 (como permeabilizador de membrana). El Tris (0.004, 0.08 y 0.016 g/100 ml) y el Tween 20 (0.005, 0.01 y 0.2 g/100 ml). En ningún caso, se observó germinación. Por tanto, en nuestro material, la adición de Tris y Tween 20 juegan un efecto muy negativo en la germinación.

También se ha probado la influencia de extracto de levadura diluido en el medio sobre la germinación del polen a distintas concentraciones (0.05, 0.1 y 0.5 %) utilizando como control el medio sólo y el extracto de levadura sólo (Tabla III).

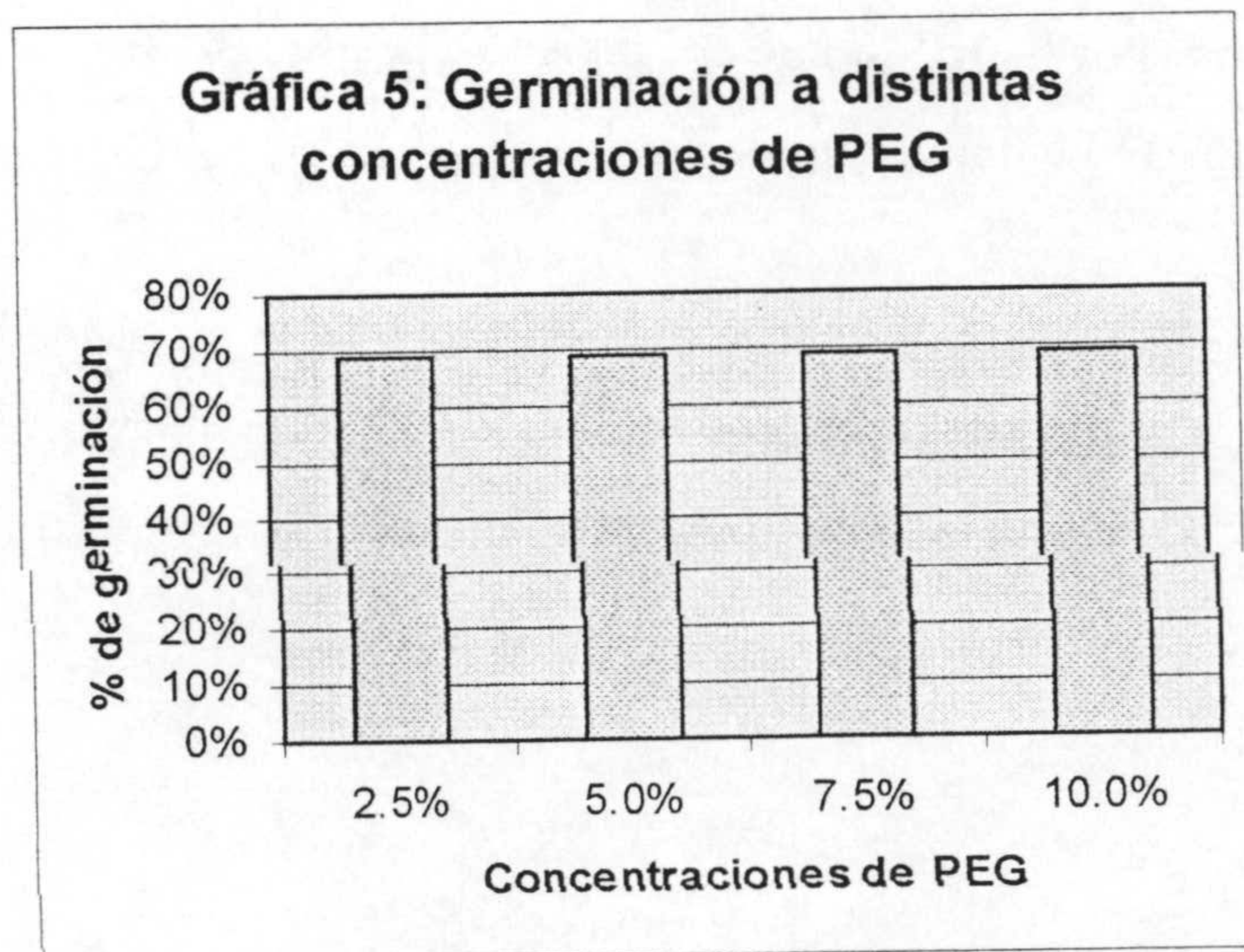
Medios usados	Porcentaje de germinación
Medio (control)	69 %
Medio + 0,05 % de extractos de levadura	13 %
Medio + 0,1 % de extractos de levadura	10 %
Medio + 0,5 % de extractos de levadura	11 %
Extractos de levadura	2 %

Tabla.III: Influencia del extrato de levadura sobre la germinación.

Se observó que con el extracto de levadura sólo los granos que germinan son escasos (2 %) y cuando se añade al medio se nota una disminución notable en el porcentaje de germinación respecto al control (un 13 % con respecto a un 69 % en el medio control). Se puede decir que el efecto de los extractos de levadura es también negativo.

Efecto del polyetiléne glycol (PEG)

Usando el medio de germinación base se han añadido distintas concentraciones de PEG (2.5, 5, 7.5 y 10 %). No se observan diferencias en el porcentaje de germinación, alcanzándose siempre un porcentaje cerca del 70 % (Gráfica.5).



Sin embargo es interesante de resaltar el hecho observado de que el tubo polínico se rompen frecuentemente por el ápice de 12 horas en el medio sin PEG, mientras que si se le añade PEG entre 7.5 y 10 % los tubos polínicos mantienen su estructura inalterable.

Tiempo en cámara húmeda

Se ha comparado el porcentaje de germinación a distintos tiempos en cámara húmeda (15, 30min, 1, 2, 4 y 24 h en cámara húmeda). El porcentaje de germinación a 12 h de incubación en el medio es el mismo en todos los casos independiente del tiempo que haya estado previamente en cámara húmeda. Según esto la cámara húmeda no influye en el porcentaje de germinación.

Según los datos que se acaban de exponer, hemos optado por las siguientes condiciones y medio de germinación:

Medio: Acido Bórico: 0,01 g/100ml
Nitrato potásico: 0,01 g/100ml
Sulfato Magnésico: 0,02 g/100ml
Nitrato Cálcico: 0,03 g/100ml
Sacarosa: 10%
pH: 5.5-6.5
2h en camara húmeda
25° C de temperatura

Para conseguir una buena preservación de la integridad de los tubos polínicos a partir de 7 horas de germinación, se añadió 10 % de PEG.

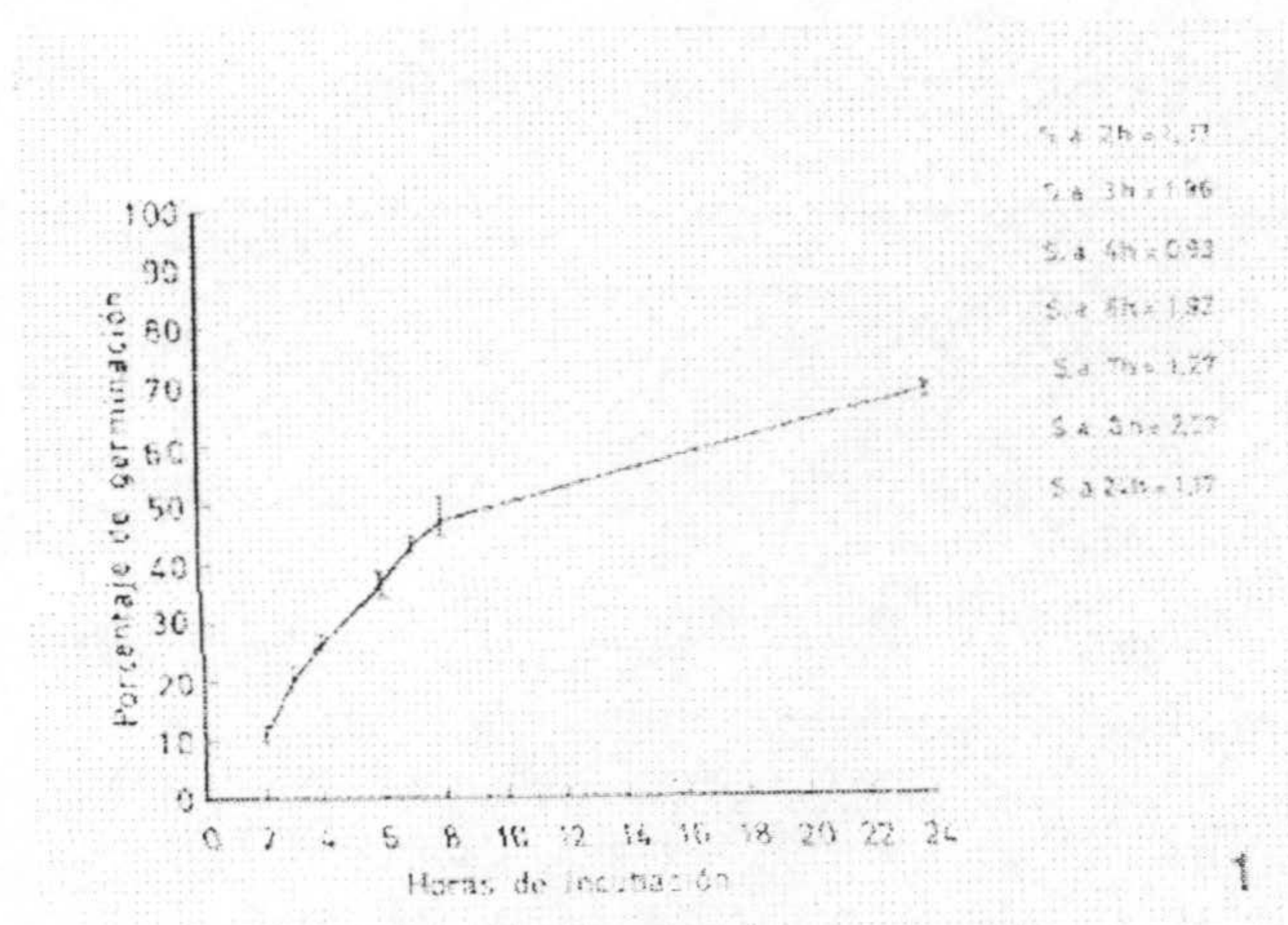
2. 3. Dinámica de la germinación

Una vez puesto a punto el medio de germinación, se realizó un seguimiento a microscopía óptica de la evolución del porcentaje de germinación y del crecimiento del tubo polínico a intervalos de una hora de incubación durante un día.

2.3.1. Evolución del porcentaje de germinación

A los 45 min de incubación se observan granos hinchados y con protuberancias en las regiones aperturales y sólo en un porcentaje muy bajo de granos se observan pequeños apéndices del tubo. Teniendo en cuenta que se ha considerado que el polen esta germinado cuando el tubo alcanza como mínimo una longitud igual al diámetro del grano, el seguimiento del porcentaje de germinación se ha realizado a partir de 2 horas de incubación en el medio y hasta las 24 horas.

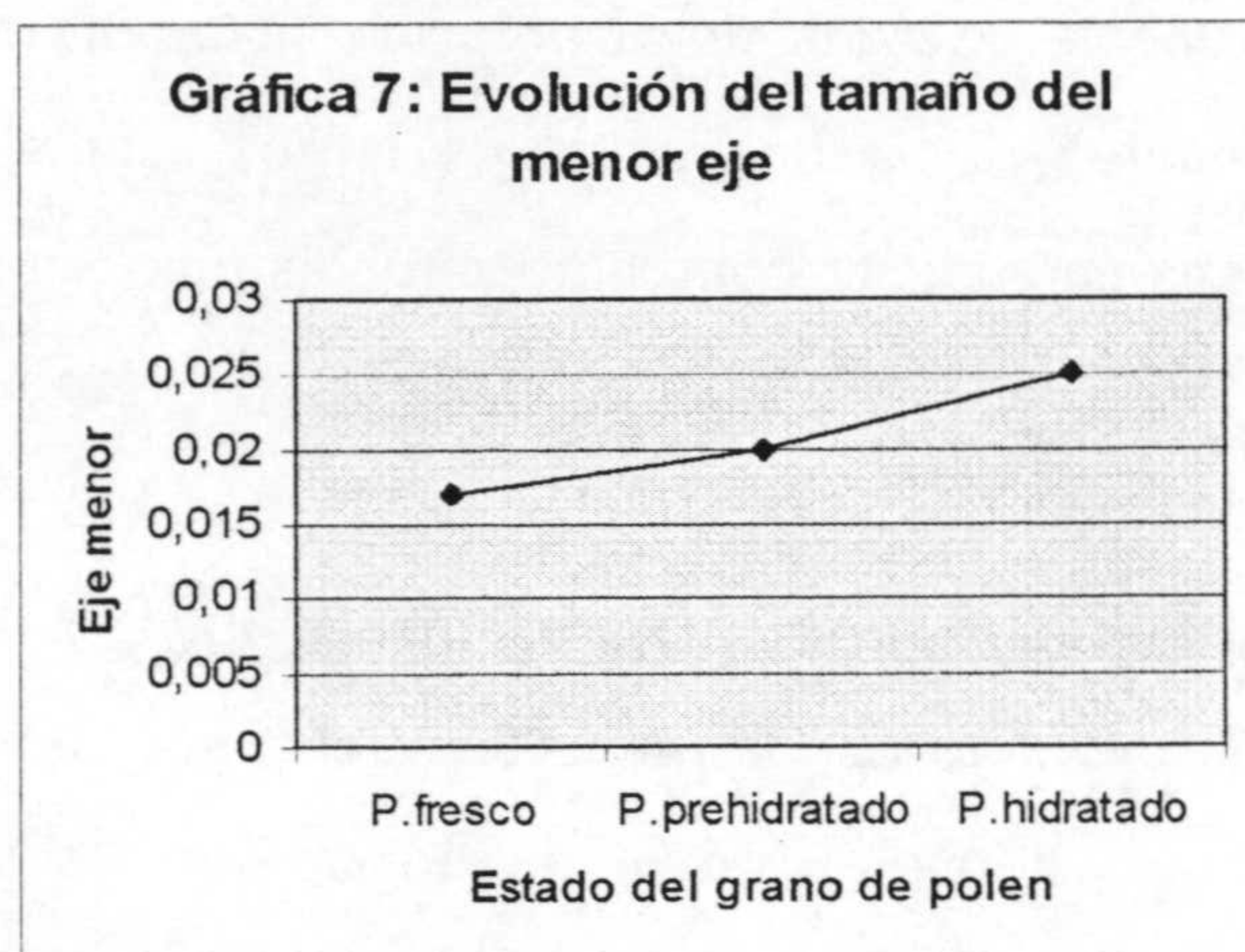
La gráfica 6 resume la evolución encontrada. Así, a las 2 horas sólo el 10 % de los granos han germinado. A las 3 horas germinan el 21 % de los granos. A las 4 horas el porcentaje es de 27 %. A las 6 horas es de 38 %. A las 7 horas es de 44 %. A las 8 horas es de 53 % y a las 24 horas el porcentaje alcanza un 69 % de germinación.



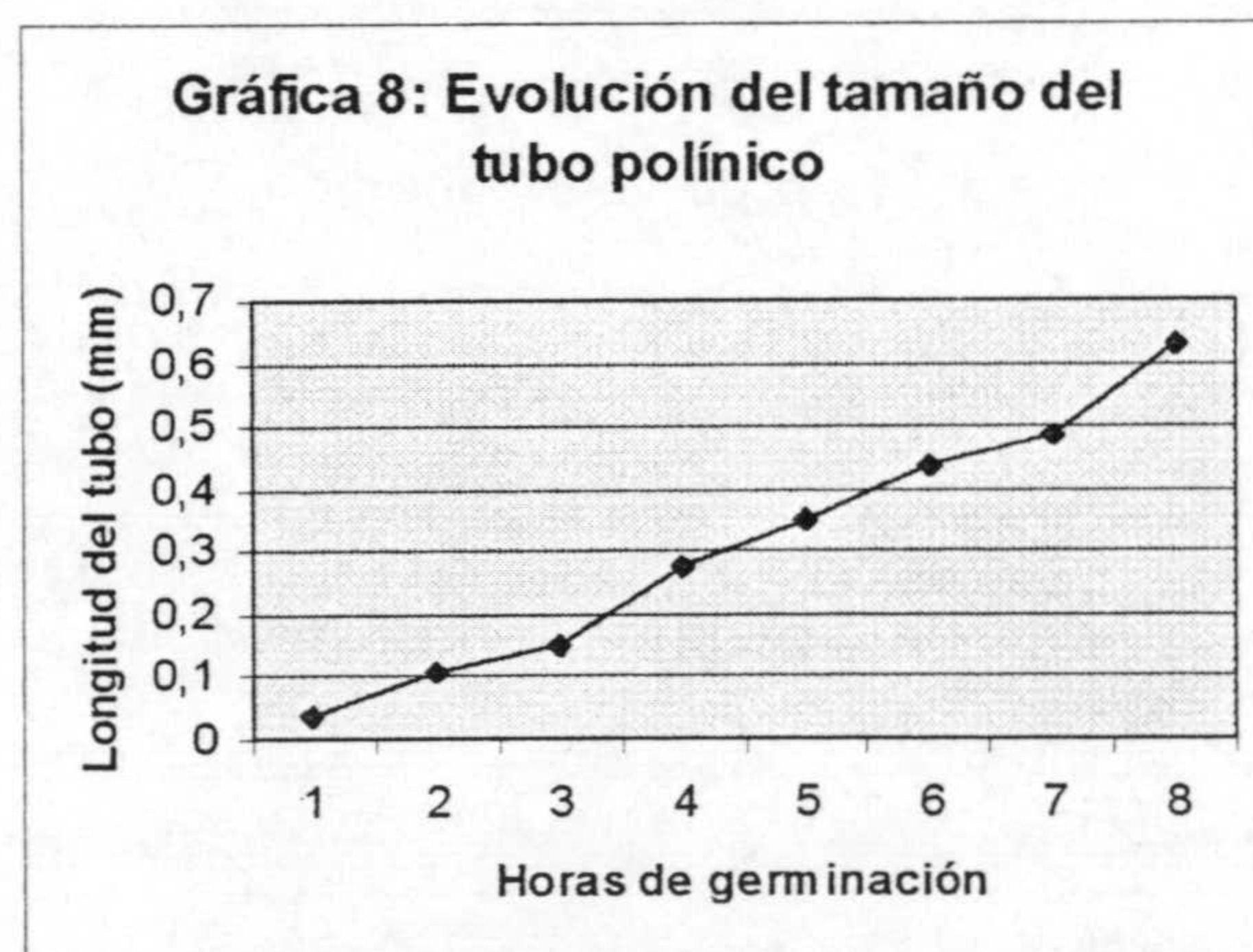
Según esta gráfica se observa que la germinación tiene dos fases, una fase rápida pasando de un 10 % a las 2 horas hasta un 53 % a las 8 horas, mientras que la segunda fase es más lenta ya que a las 24 horas llega al 69 % los granos germinados.

2.3.2. Tamaño del grano y el tubo polínico durante la germinación

El polen dentro de la antera tiene una forma más o menos tetraédrica y cuando después de la dehiscencia queda libre, presenta una forma más alargada. Finalmente cuando se hidrata antes de la germinación vuelve a adoptar la anterior forma tetraédrica. Estos cambios de forma van acompañados de cambio de volumen. Para determinar estos cambios se han medido los diámetros o ejes del grano. El polen seco de forma alargada presenta un eje mayor de medio de 0.025 mm y otro menor de 0.017 mm. Cuando se pone durante 2 horas en cámara húmeda los ejes son de 0.025 mm y 0.020 mm. En el medio de germinación, antes de que se inicie el desarrollo del tubo polínico, los granos se ven hinchados, esféricos y alcanzan su máximo volumen en todos los ejemplos con un diámetro de 0.025 mm (Gráfica.7).



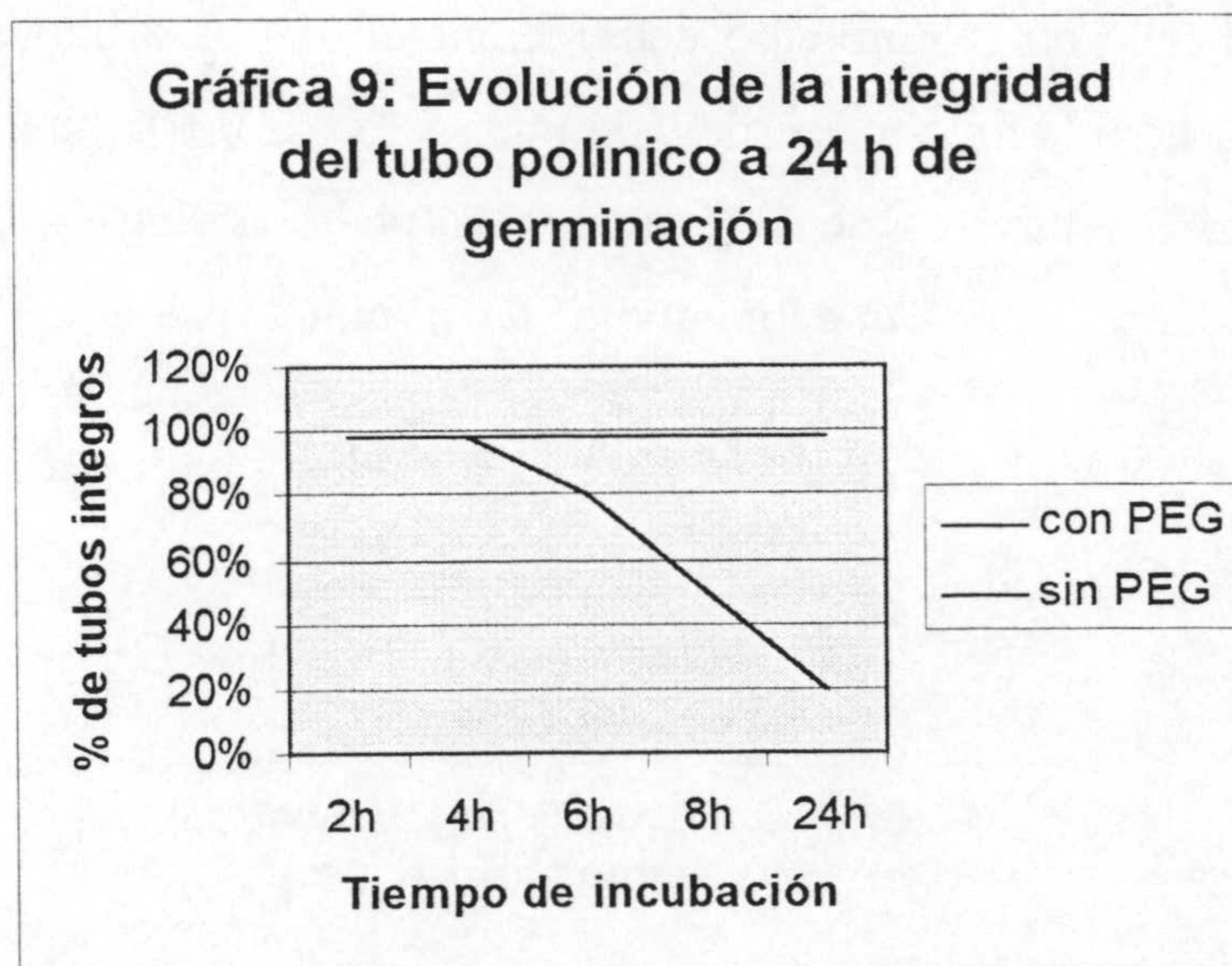
También se ha hecho un seguimiento del crecimiento del tubo durante las 8 horas de germinación. A 1 hora la longitud es de 0.04 mm. A 2 h de 0.107 mm, mientras que a 3 horas la longitud del tubo es de 0.15 mm, a las 4 horas llega a 0.275 mm y así progresivamente hasta llegar a una longitud de 0.630 mm a las 8 horas (Gráfica.8).



2.3.3. Integridad del tubo polínico durante 24 horas de incubación

Ya se ha mencionado anteriormente que cuando el polen se mantiene durante muchas horas en el medio de germinación, los tubos polínicos largos estallan y se rompen principalmente por el ápice apareciendo el contenido citoplasmico en su proximidad. También se ha mencionado la influencia positiva del PEG en la conservación de la estructura de los tubos en buen estado.

Utilizando el test de la reacción fluorocromática mediante FDA a microscopia de fluorescencia, se ha seguido la evolución de la integridad del tubo polínico (viabilidad) durante la incubación de granos de polen en el medio óptimo de germinación en presencia y ausencia del PEG (10 %).



Los granos sin tubos (no germinados) mantienen la viabilidad alrededor de 80% hasta 24 h en el medio de germinación tanto con como sin PEG.

Desde el inicio hasta 4.30 horas de incubación en el medio de germinación sin PEG los granos que germinan mantienen la integridad de la membrana casi total cercana de 88 %, pero a partir de las 5h, algunos granos con tubos empiezan a perder la fluorescencia

y a las 24 horas sólo visualizamos un 20 % de tubos polínicos viables (Gráfica.9). En general los tubos que mantienen la fluorescencia son de poca longitud. Por otro lado cuando al medio de germinación le añadimos PEG, observamos que a las 24 horas los tubos polínicos se conservan bien y fluorescen mayoritariamente a nivel del ápice que es donde se encuentra principalmente concentrado el citoplasma. A nivel del grano o en la parte del tubo cercana al grano no hay fluorescencia.

2.3.4. Comportamiento de los núcleos

Mediante microscopía de fluorescencia y utilizando el fluorocromo DAPI específico para el ADN podemos hacer un seguimiento del comportamiento de los núcleos de las células vegetativa y generativa a lo largo de la germinación. En el grano antes de la germinación fluorescen dos núcleos, con diferentes intensidades (Fig.3a). A 1h de incubación en algunos granos que inician la germinación, se observa uno de los núcleos cerca de la apertura donde va a emerger el tubo polínico adoptado una forma alargada (Fig.3b). A 1h y 30min, se observa la salida clara de un núcleo en dirección del tubo polínico (Fig.3c). En algunos granos germinados se ven dos núcleos, el núcleo que fluoresce más está dentro del grano, y el que fluoresce menos en el tubo polínico (Fig.3d). En otros granos se observan los dos núcleos en el tubo polínico muy cerca de una de las aperturas: se adelanta el núcleo que fluoresce más (Fig.3e). A las 2 h ambos núcleos se ven casi al mismo nivel en la primera parte del tubo adelantándose el núcleo que fluoresce menos (Figs.3f y 10b). A las 2 h y 30min, los dos núcleos ya se encuentran en el tubo cuando este tiene una longitud alrededor de 0.15 mm.

En este momento el núcleo que fluoresce más correspondiente al núcleo generativo aún sigue detrás del que fluoresce menos y que es el núcleo vegetativo, adaptándose a la forma alargada del tubo (Fig.3g). A las 3 h y 30min, los dos núcleos están cerca el uno al otro (Fig.3h). A las 4h y 30min, los dos núcleos pueden estar al mismo nivel en tubo polínico cerca del ápice (Fig.3i) o bien todavía cerca del grano (Fig.3j) y el núcleo que fluoresce más adelanta al que fluoresce menos (Fig.3k) el cual pierde cada vez más su intensidad de fluorescencia. A las 7 h, se observan dos núcleos de menor tamaño y

ambos fluorescen intensamente y de manera similar al núcleo generativo. Probablemente se trata de núcleos gaméticos. El núcleo vegetativo pierde fluorescencia y apenas se visualiza.

3. Ultraestructura

Cuando la antera está madura y próxima a la dehiscencia, está llena de granos de polen cuyo citoplasma es tan rico que es difícil distinguir con nitidez la individualidad de sus diferentes componentes. El retículo endoplasmático (RE) rugoso se encuentra fragmentado en pequeñas bolsas cargadas de material denso y distribuidas por todo el citoplasma y también adosadas al plasmalema dispuestas a lo largo de toda la pared del grano. Se observan numerosas gotas osmiófilas de naturaleza lipídicas que se encuentran frecuentemente rodeadas por las bolsas de retículo endoplasmático rugoso y en estrecha asociación. También se localizan numerosas áreas translúcidas a los electrones, de forma y dimensiones semejantes a los cuerpos lipídicos y también en contacto con el de retículo endoplasmático rugoso. Se observan mitocondrias de forma aparentemente redondeadas algunos plastidios poco diferenciados por su forma ovoide, de gran tamaño y gran contraste del estroma.

Llamamos polen maduro libre a aquel que es procesado para su observación a microscopia directamente después de ser recolectado de la flor. Los granos de polen libres cuando se colocan en una cámara húmeda se hidratan lentamente y cuando se pasan al medio de germinación se completa la hidratación.

3.1. Polen libre

El grano recolectado después de la dehiscencia de la antera presenta un citoplasma densamente poblado por vesículas de diferente tamaño y contenido y cuerpos lipídicos, lo que dificulta la identificación de otro tipo de estructuras como mitocondrias y plastidios.

Entre las vesículas se pueden distinguir unas más pequeñas, de contenido gris y otras algo mayores translúcidas a los electrones que pueden tener pequeños tubulos en su interior (Fig.4a).

3.2. Polen en cámara húmeda

Cuando el polen se coloca en cámara húmeda se observa la presencia de un número considerable de vesículas diminutas transparentes a los electrones lo que sugiere una activación del aparato Golgi. También se distinguen claramente cisternas hinchadas de RE rugoso rodeando frecuentemente áreas translúcidas a los electrones. Diminuye la presencia de pequeñas vacuolas (o vesículas grandes) con contenido tubular (Fig.4b).

3.3. Polen en medio de germinación

El polen en el medio de germinación fué fijado y procesado a distintos intervalos de tiempo con objeto de estudiar la evolución que sufre la organización celular tanto del grano de polen como del tubo polínico. En una primera observación se pueden diferentes morfologías del grano de polen que ser comparadas con las observaciones a microscopia óptica y microscopia electrónica (Fig.5a y b). Estas diferencias reflejan el grado de viabilidad del polen vienen marcadas por la forma de la apertura y el contenido citoplásmico (Fig.5).

El polen hidratado viable y preparado para germinar tiene las tres aperturas hinchadas y un citoplasma muy denso. Consideramos aperturas hinchadas aquellas en que como la figura 5 c el plasmalema en estas regiones continua con la curvatura de las zonas interaperturales o se abomba hacia el exterior del grano. Consideramos que el citoplasma es denso cuando se aproxima aparentemente al del polen en cámara húmeda (Fig.4b).

Los granos que no serán viables suelen presentar la estructura de las aperturas lo que puede ir acompañada por diferentes grado de deterioro en el contenido citoplásmico.

Consideramos que las aperturas tienen una estructura anómala o diferente cuando el plasmalema de estas zonas presenta una depresión hacia el citoplasma quedando por tanto el espesor de la zona apertural anormalmente abultadas (Fig.5d y e). Generalmente los granos que presentan este tipo de estructura apertural también presentan una menor densidad citoplasmática reflejada por la presencia de una gran cantidad de vesículas (Fig.5d y e), a veces presentan también una levada cantidad de almidón (Fig.5a) e incluso pueden estar totalmente vacíos (Fig.5f).

Las aperturas son el primer marcador a microscopía electrónica que nos indica si el polen es viable o no. Incluso con un citoplasma aparentemente normal, si la apertura no completa su desarrollo, será es un índice de que ese grano no va a progresar durante la germinación.

A los 30 minutos de incubación en medio de germinación las diferencias que se observan con respecto al grano en cámara húmeda son escasas. En ningún caso se observa salida del tubo polínico. Continúa la presencia de diminutas vesículas en todo el citoplasma pero con preferencia cerca de la pared y de la apertura (Figs.6b y c). A grandes aumentos se puede distinguir dictiosomas, constituidos por pequeñas cisternas apiladas en número de tres o cuatro (Fig.6c). La célula generativa y el núcleo vegetativo se encuentran próximos a una de las tres aperturas. Algunos plastidios poco diferenciados de forma redondeada, de cuchara y en división (Fig.6c) y abundancia de mitocondrias de perfiles también redondeados, con crestas bien desarrolladas y tamaño considerable menor que lo plastidios. La apertura se encuentra muy bien desarrollada, el plasmalema abombado hacia el exterior y la intina con dos capas, una externa con tubulaciones y otra sin ellas y en contacto con el plasmalema, homogénea y continua con la intina interapertural (Fig.6d).

A la hora y media de incubación se observa en algunos granos el inicio de la germinación con tubos polínicos muy cortos (Fig.7). A partir de esta etapa seguiremos

tanto los cambios que ocurren a nivel de los granos como a nivel de los tubos polínicos. Las diminutas vesículas continúan siendo abundantes tanto cerca de la pared del grano como del ápice del tubo (Figs.7b y c). Las cisternas cortas del retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias y cuerpos lipídicos son los orgánulos más visibles, con una orientación hacia la apertura donde frecuentemente se observa el inicio de la germinación (Fig.7b).

El tubo polínico en esta etapa presenta dos zonas: la zona apical donde predominan vesículas claras de tamaño mediano y la pared esta constituida de una sola capa externa de estructura fibrilar (Fig.8a); y la zona subapical con numerosas vesículas; abundantes polisomas, cisternas cortas de retículo endoplasmático rugoso y mitocondrias (Fig.8b). La pared está formada de dos capas, la exterior de aspecto fibrilar electrodenso igual que en la zona apical y una interior y clara a los electrones (Fig.8b). Lo que más llama la atención en este estadio es la acumulación de cuerpos lipídicos hacia una zona cerca de la pared y/o la apertura germinativa (Fig.20c). En el polo opuesto (Fig.20b) se localizan mayoritariamente vesículas de contenido fibrilar mientras que en la zona intermedia predominan mitocondrias, retículo endoplasmico, algunos plastos y los dos núcleos vegetativo y generativo ya en dirección a la apertura de germinación (Fig.20a).

A 3 horas de incubación el tubo polínico ya presenta la organización de las cuatro zonas caracterizadas: zona apical, zona subapical, zona nuclear y de vacuolización.

Zona apical:

Zona muy rica en vesículas de dos tamaños, pequeñas y grandes. Esas vesículas representan el único orgánulo presente en el citoplasma. La pared esta formada solamente por un estrato fibrilar (Fig.9a).

Zona subapical:

El citoplasma es rico en organulos dispuestos paralelamente al eje longitudinal del tubo político. Hay una cierta polaridad en la disposición de los orgánulos. Según el nivel del

corte predominan algunos de los orgánulos. Así se puede ver que contiguo a la zona apical de las vesículas se encuentran dictiosomas (Fig.9b), seguidos de mitocondrias (Fig.9c) y a continuación cisternas de retículo endoplasmático, lípidos y algunos plastos (Fig.9d). La pared del tubo polínico en esta zona, está formada por sus dos capas, una externa de aspecto fibrilar continua con la de la zona apical y una interna más clara. (Figs. 9 a,b y c).

Zona nuclear:

Se refiere a la zona donde se encuentran el núcleo de la célula vegetativa y/o la célula generativa (Fig.10); esta última adopta una forma alargada y contiene un núcleo con cromatina muy condensada al contrario del núcleo vegetativo que presenta la cromatina más descondensada (Fig.10a).

Como esta mencionado anteriormente (en la dinámica de la germinación), los núcleos de la célula vegetativa y generativa están en movimiento durante el desarrollo del tubo, por lo que en esta zona van avanzando a lo largo de la germinación, para llegar prácticamente al ápice justo cuando ya termina la fase de crecimiento del mismo. Los núcleos no ocupan un sitio determinado en el tubo polínico, por eso podemos encontrar los núcleos juntos o no y en distintas zonas del tubo, depende del corte y el tiempo de germinación (Figs.10 y 11a).

Zona de vacuolización:

Se caracteriza por la presencia de una o más vacuolas de distintos tamaños rodeadas por citoplasma que queda en la periferia (Fig.11b). Dentro de la vacuola se observan estructuras de origen citoplasmico posiblemente en vías de degradación.

A las 8 horas de germinación observamos que los núcleos generativo y vegetativo ya se encuentran cerca del ápice lo que indica que el crecimiento del tubo ha llegado a su fin (Figs.3i y j). En este tiempo también hemos observado que el núcleo generativo esta cercano a la división mitótica que va dar lugar a las dos células gaméticas (Fig.12c). El

área que ocupa la vacuola también se incrementa notablemente (Fig.12a). Otro aspecto a destacar es la consolidación de la pared celular que se encuentra constituida por tres capas: una externa muy densa a los electrones, una intermedia de mayor grosor y menor densidad a los electrones y una interna de estructura fibrilar y próxima al plasmalema (Fig.12b). La naturaleza de estas paredes será detallada en el apartado de polisacáridos. La célula generativa se encuentra rodeada de una pared gruesa, clara a los electrones y no totalmente homogénea en grosor en todo su recorrido (Figs.10a y 12c).

4. Comportamiento de los polisacáridos durante la germinación

4.1. Polisacaridos

Tinción de PAS

Mediante la tinción de PAS, específica para carbohidratos, se ha podido distinguir a nivel de microscopía óptica, una ligera reacción positiva en el citoplasma del polen. A nivel de toda la intina, tanto en las zonas no aperturales como en las aperturales, la reacción es muy intensa. Igualmente la reacción es positiva en la pared del tubo polínico observándose continuidad con la intina (Fig.13c).

Tinción de THIÉRY

La localización de polisacáridos a nivel de la microscopía electrónica se ha realizado mediante el test de Thiéry. El resultado de la reacción positiva del test de Thiéry se manifiesta como un precipitado denso a los electrones. Se localiza este precipitado denso en las pequeñas vesículas del citoplasma tanto en el polen como del tubo (Fig.13 a,b y d). En la pared del grano se observa reacción positiva en la parte externa de la capa basal de la exina y en la intina pero de una manera más intensa en la zona en contacto con el plasmalema que presenta un contorno lobulado (Fig.13b). En la pared del tubo también da positiva a nivel del ápice que también presenta el mismo contorno lobulado que acabamos de resaltar en la intina del grano (Fig.13a), mientras que a lo largo del tubo el precipitado se localiza en la parte más externa de la pared (Fig.13d).

4.2. Calosa

Se ha localizado calosa durante la germinación mediante fluorescencia con azul anilina o inmunofluorescencia. Los resultados muestran presencia de calosa a lo largo de la pared del tubo, observándose diferentes engrosamientos que parecen ocupar todo el diámetro del tubo (Figs.14a y c). El número de estos engrosamientos depende del tiempo de germinación y tamaño del tubo. Por ejemplo, a las 8 horas de germinación se ha llegado a observar hasta 4 engrosamientos (Fig.14b). También se ha realizado inmunocitoquímica a nivel ultraestructural nos permite afirmar que la capa de calosa se encuentra en la parte interna de la pared adyacente al plasmalema, que es donde se localizan de manera muy específica los pequeños granos de oro (Figs.14d y e).

4.3. Pectinas

Se ha localizado pectinas esterificadas y de-esterificadas mediante anticuerpos monoclonales JIM7 y JIM5 respectivamente a nivel de microscopía de fluorescencia y electrónica en el polen germinado *in vitro* a distintos tiempos y sobre el estigma. De este modo, se ha seguido el comportamiento de pectinas esterificados y de-esterificados durante la germinación.

La localización de pectinas de-esterificadas muestra una fluorescencia intensa a nivel de la apertura del grano pero esta fluorescencia es más débil a nivel de la pared del tubo polínico (Figs. 15a y c). Las pectinas esterificadas por el contrario aparecen intensamente a nivel del ápice del tubo (Fig. 15b). Los granos muestran autofluorescencia (Fig. 15c).

Los resultados a microscopía electrónica muestran que las pectinas esterificadas se localizan de manera homogénea y muy abundantemente a nivel de toda la intina y la zona apertural del grano de polen durante todas las etapas de germinación (Fig.16a). También se localizan en la cubierta de la exina, concretamente sobre el material fibrilar que se condensa especialmente en la base de las arcadas y se extiende hacia la base de las columnas (Fig.16a).

En el citoplasma del polen, aparecen partículas de oro en el interior de vesículas repartidas de manera homogénea y algunas cerca de la intina. Los marcadores de pectinas esterificadas encontradas en las vesículas del grano también existen el citoplasma de la parte apical del tubo polínico y en el único extracto de la pared en esa zona (Figs.17 a y b). En zonas lejanas del ápice tubo polínico y en la parte externa de la pared se localizan pectinas esterificadas con poca intensidad.

Las pectinas no esterificadas se localizan con menos abundancia que las esterificadas sobre la apertura (Fig.16b). Se localizan partículas de oro también en toda la intina y entre las arcadas de la exina con la misma intensidad (Fig.16c).

En el tubo polínico, las pectinas no esterificadas se localizan en algunas vesículas de su citoplasma, en las zonas más alejadas del ápice. A ese nivel, la parte externa de la pared del tubo polínico, está intensamente marcada con pectinas no esterificadas (Figs.17c y d). La inmunolocalización de pectinas esterificadas (Fig.18a) y de-esterificadas (Fig.18b) en el tubo polínico germinado sobre el estigma muestra también una localización específica en la parte externa de la pared del tubo y en algunas vesículas del citoplasma siguiendo el mismo patron descrito para el tubo polínico crecido *in vitro*.

5. Comportamiento de lípidos durante la germinación.

La presencia de cuerpos lipídicos en el citoplasma del polen maduro ha sido una constante observada tanto antes como inmediatamente después de la germinación. Sin embargo su distribución variaba según el tiempo de observación. El Sudan black B tiñe específicamente los lípidos de reserva de color negro. La utilización de esta tinción nos permite hacer un seguimiento de la evolución de los cuerpos lipídicos y estudiar su comportamiento durante la germinación.

En el polen maduro libre se observa que los cuerpos lipídicos están dispersos de manera homogénea por todo el citoplasma del polen (Fig.19a). A la media hora de incubación en el medio de germinación, los cuerpos lipídicos continúan esparcidos por todo el citoplasma aunque algunos se localizan ligeramente desplazados hacia las paredes del polen (Fig.19b).

Progresivamente al ir aumentando el tiempo de incubación se incrementa el número de cuerpos lipídicos desplazados cerca de la pared (Fig.19c) y su cantidad se va incrementando también progresivamente (Figs.19d y e) hasta que a las 2 horas de incubación se observa que la acumulación de los cuerpos lipídicos es mayoritaria en la apertura de germinación (Fig.19f).

Entre 1 y 2 horas de incubación, los cortes de polen observados a nivel de microscopio electrónico de transmisión muestran también una marcada polaridad. Los cuerpos lipídicos se encuentran agrupados en las cercanías de la pared y/o apertura germinativa (Fig.20c).

En el extremo opuesto encontramos acumulación de vesículas de contenido fibrilar (Fig.20b). En la zona intermedia entre ambos polos se localizan mitocondrias, plastos y el núcleo vegetativo junto a la célula generativa (Fig.20a), los cuales pueden estar más o menos próximos a la apertura germinativa dependiendo del grado de activación del grano.

A partir de las 2 horas de incubación es frecuente observar el polen germinado con un tubo en pleno crecimiento por el elevado número de vesículas de Golgi localizadas en la zona apical.

En esta etapa no es raro encontrar abundantes cuerpos localizados cerca de la apertura germinativa o bien en el tubo polínico que está saliendo de esta, lo que sugiere el paso de lípidos de reserva del citoplasma del grano hacia el tubo (Fig.21).

6. Comportamiento de la proteína alergénica mayoritaria del olivo durante la germinación

A nivel bioquímico

La Figura 24 muestra preparaciones de las muestras de polen utilizadas para el análisis bioquímico de Ole e 1, observadas al microscopio óptico sin tinción específica alguna. No se apreciaron diferencias morfológicas entre el polen suelto y el polen en cámara húmeda (Figs. 24a y b). Las muestras obtenidas tras 5min y 1h de incubación en medio de germinación no mostraron tubos polínicos apreciables microscópicamente (Figs. 24c y d), mientras que éstos ya sí fueron detectados transcurridas 2h de incubación en adelante. El método utilizado para la separación del polen germinado y no germinado fue claramente efectivo a partir de las 4h de cultivo como muestra la figura 24 (f hasta k), aunque fue incapaz de separar los granos germinados de los no germinados a las 2h de cultivo, debido a la corta longitud del tubo polínico en este estadio (Fig 24e).

A nivel bioquímico, el análisis mediante SDS-PAGE de extractos proteicos crudos de polen a diversos tiempos tras la inducción de la germinación *in vitro* (Fig. 25a), mostró numerosas bandas entre las que destacan por su mayor intensidad al menos 7, correspondientes a pesos moleculares aproximados de 70, 45, 40, 32, 24, 22 y 18 kDa.

De las bandas mencionadas, el polipéptido de 18 kDa presentó la mayor intensidad relativa. En los geles teñidos con azul Coomassie no se apreciaron diferencias en el patrón de bandas correspondientes a los distintos tiempos tras el inicio del cultivo ni en la intensidad relativa de dichas bandas.

La figura 25b muestra los resultados de la detección de polipéptidos reconocidos por el anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1, tras la transferencia de geles idénticos a los mostrados en la Fig. 25a. El anticuerpo reconoció tres polipéptidos en el rango entre 17-19 kDa, presentes en todos los estadios. Los resultados de los análisis de densitometría de dichos inmunoblots se representan en la Fig. 25c. Dichos resultados mostraron un

descenso progresivo en los niveles relativos del alérgeno hasta las 8h de incubación para los granos de polen germinados, así como un incremento en la cantidad relativa del alérgeno en el intervalo 8h-16h. Sin embargo, en los granos de polen no germinados se mantuvieron niveles elevados de Ole e 1 durante todo el intervalo 4h-16h.

El análisis de proteico mediante SDS-PAGE del medio de germinación a distintos tiempos de incubación no mostró polipéptido alguno tras teñir los geles con azul Coomassie. Sin embargo, los inmunoblots correspondientes, probados con el anticuerpo anti-Ole e 1 (Figs. 25d y e) mostraron la presencia de cantidades mínimas del alérgeno a partir de las 2h de incubación. Dicha cantidad incrementó progresivamente hasta las 8h de incubación, siendo nuevo indetectable a las 16h.

A nivel celular

La inmunolocalización de (Ole e 1) en polen germinado *in vitro* muestra de manera clara y específica que esta proteína se encuentra en gran cantidad en las cisternas del retículo endoplásmico (Fig.22). En el polen germinado sobre el estigma, el inmunomarcado también da a nivel del retículo y además se observan partículas de oro en las paredes celulares del tubo y en las paredes del tejido transmisor del estigma (Fig.23)

7. Obtención y cultivo de protoplastos a partir de tubos polínicos de granos germinados

Los resultados obtenidos tras comparar las distintas soluciones enzimáticas ensayadas, muestran que las condiciones óptimas para la obtención de protoplastos a partir del tubo polínico en *Olea europaea* son:

Germinación de polen antes de someterlo a la solución enzimática durante 8 horas.

Solución enzimática: 1% maceroenzima R-10 y 2% celulasa onozuka R-10 añadiendo 1M de Manitol y 20mM de la solución salina.

Bajo esas condiciones y haciendo un seguimiento a distintos tiempos de las placas que contienen polen y la solución enzimática, se puede decir que a los 15min aparecen los primeros cambios ya que la pared del tubo polínico se adelgaza y el citoplasma aparece fragmentado en dos o tres zonas. A los 30min podemos observar frecuentemente una terminación esférica en el extremo más apical de los tubos polínicos (Fig.26a), lo que nos está señalando que comienzan a formarse los protoplastos. A partir de ese tiempo se puede ver algunas esferas aisladas libres en la solución enzimática. Desde los 60 a los 90min el número de protoplastos se va incrementando y por el contrario los tubos polínicos fragmentados van disminuyendo hasta que prácticamente desaparecen (Fig.26b). Tiempos superiores de 2 horas en la solución enzimática, originan que los protoplastos se vacuolicen aumentan de tamaño y disminuyan en número (Fig.26c).

Los protoplastos así obtenidos a 90min y aislados de la solución enzimática, son esféricos, de tamaño igual o menor a los granos de polen y pueden no presentar núcleo o bien presentar uno, dos o tres como lo revela su observación con Dapi (Fig.26d).

A microscopia electrónica, se observa como la pared del tubo polínico desaparece totalmente en los protoplastos y el plasmalema es el límite celular alrededor de un citoplasma lleno de organelas (Figs.27a y b). En el citoplasma se destaca la presencia de vacuolas, plastidios, cuerpos esféricos de contenido electrodensos, mitocondrias y abundancia de dictiosomas en todo el citoplasma y en una disposición próxima al plasmalema (Figs.27a y b).

Cuando fueron observados los protoplastos cultivados 24 horas en el medio de Murachy suplementado por 5 μ M naphthalen acetic (NAA) y 2 μ M.6-benzyloaminopurine (BAP), se observaron rodeados de una pared visible a microscopia óptica (Figs.26f y h).

La pared de dichos protoplastos cultivados fluorescen tras su observación con calcufluor (Fig.26g) y al ser utilizado el anticuerpo JIM 7 específico para pectinas esterificadas (Fig.26e).

A microscopía electrónica, Los protoplastos después de ser sometido al cultivo durante 24 horas, presenta una pared celular fibrilar y un citoplasma lleno de vacuolas, cuerpos esféricos electrodensos de gran tamaño, característicos de los protoplastos y mitocondrias cerca del plasmalema (Fig. 27c).

Figuras de microscopía

Figura 1. Polen germinado en la superficie del estigma. Microscopía óptica.

P= Polen, T= Tubo polínico, Pp= Papilas de estigma.

- a. Campo claro (x 5249).
- b. Tinción de DAPI: núcleos en el tubo polínico (flechas) (x 5249).
- c. Tinción de azul anilina. Dobles flechas señalan la fluorescencia de calosa en la pared del tubo polínico (x 2666).
- d. Tinción de PAS. Las paredes celulares del tubo polínico y del estigma se tiñen intensamente de color rosado (flecha). En la superficie del estigma se observa un material tenido muy tenuemente (dobles flechas) (x 4199).
- e. Tinción de Sudan Black B. La reacción da positiva con una coloración negra en la superficie de la exina del grano y en pequeños corpúsculos en el citoplasma del tubo polínico germinado entre las papilas del estigma (doble flecha) (x 4199).

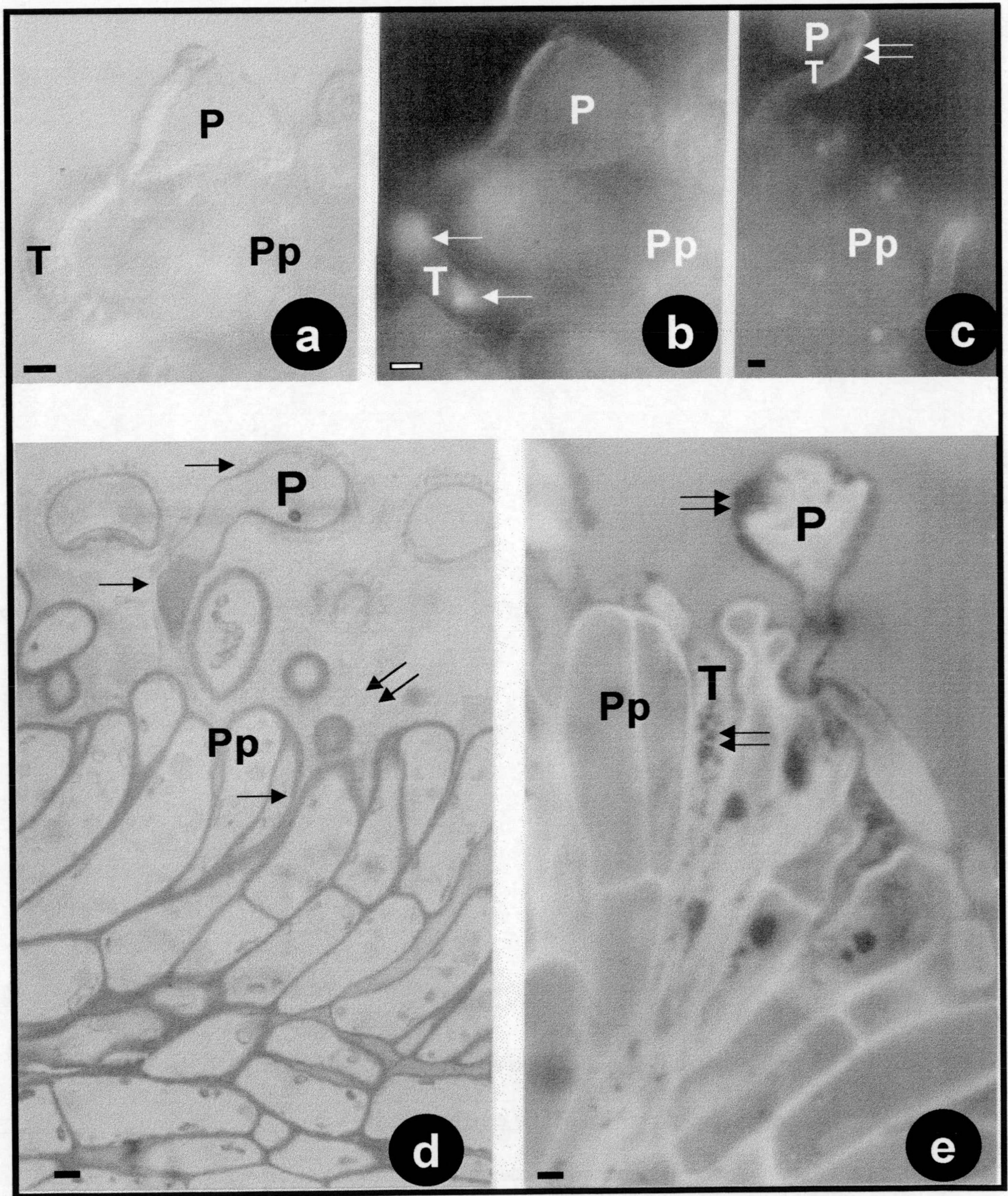


Figura 1

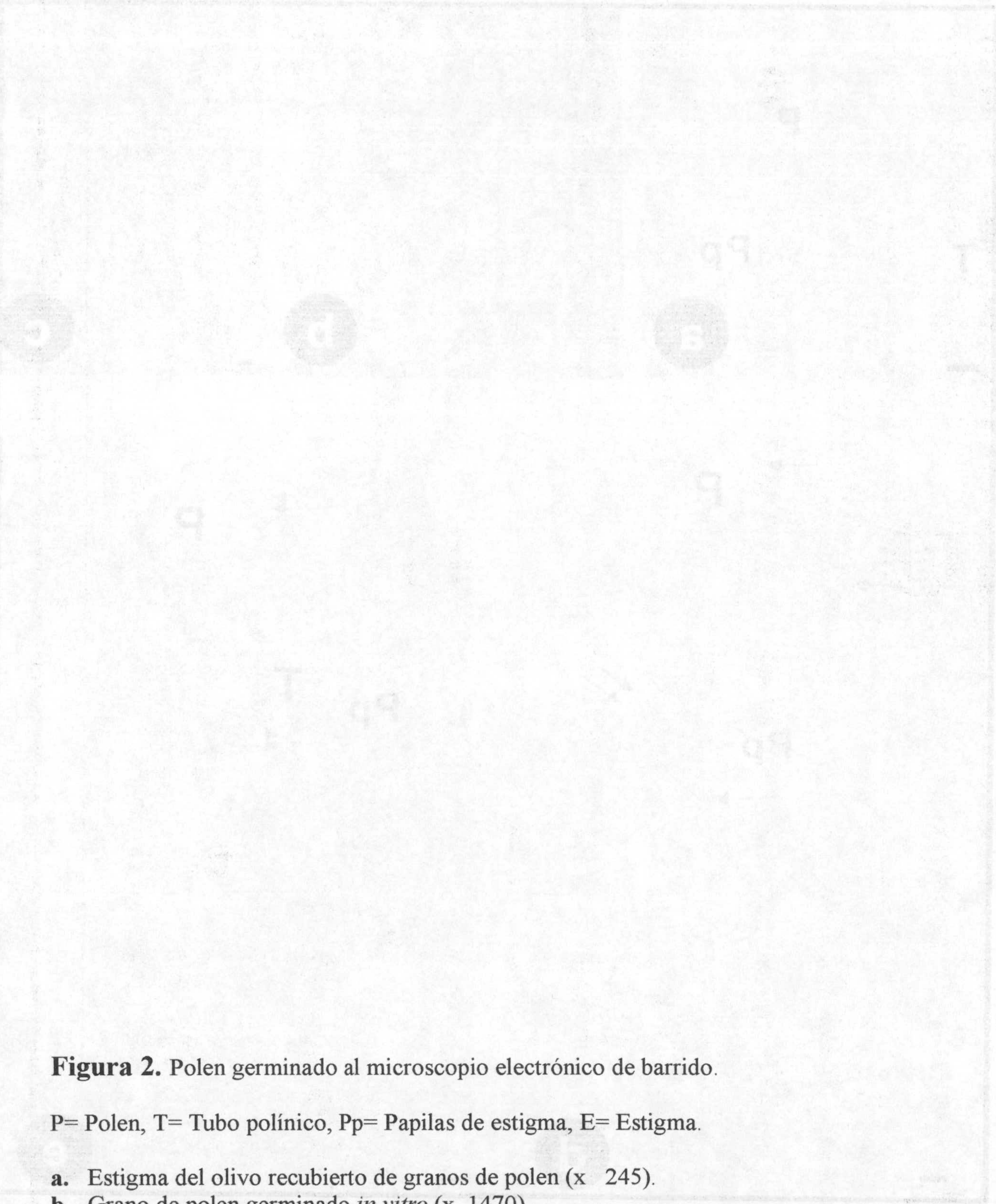


Figura 2. Polen germinado al microscopio electrónico de barrido.

P= Polen, T= Tubo polínico, Pp= Papilas de estigma, E= Estigma.

- a. Estigma del olivo recubierto de granos de polen (x 245).
- b. Grano de polen germinado *in vitro* (x 1470).
- c. Detalle de granos de polen germinados entre las papilas de estigma (x 4900).

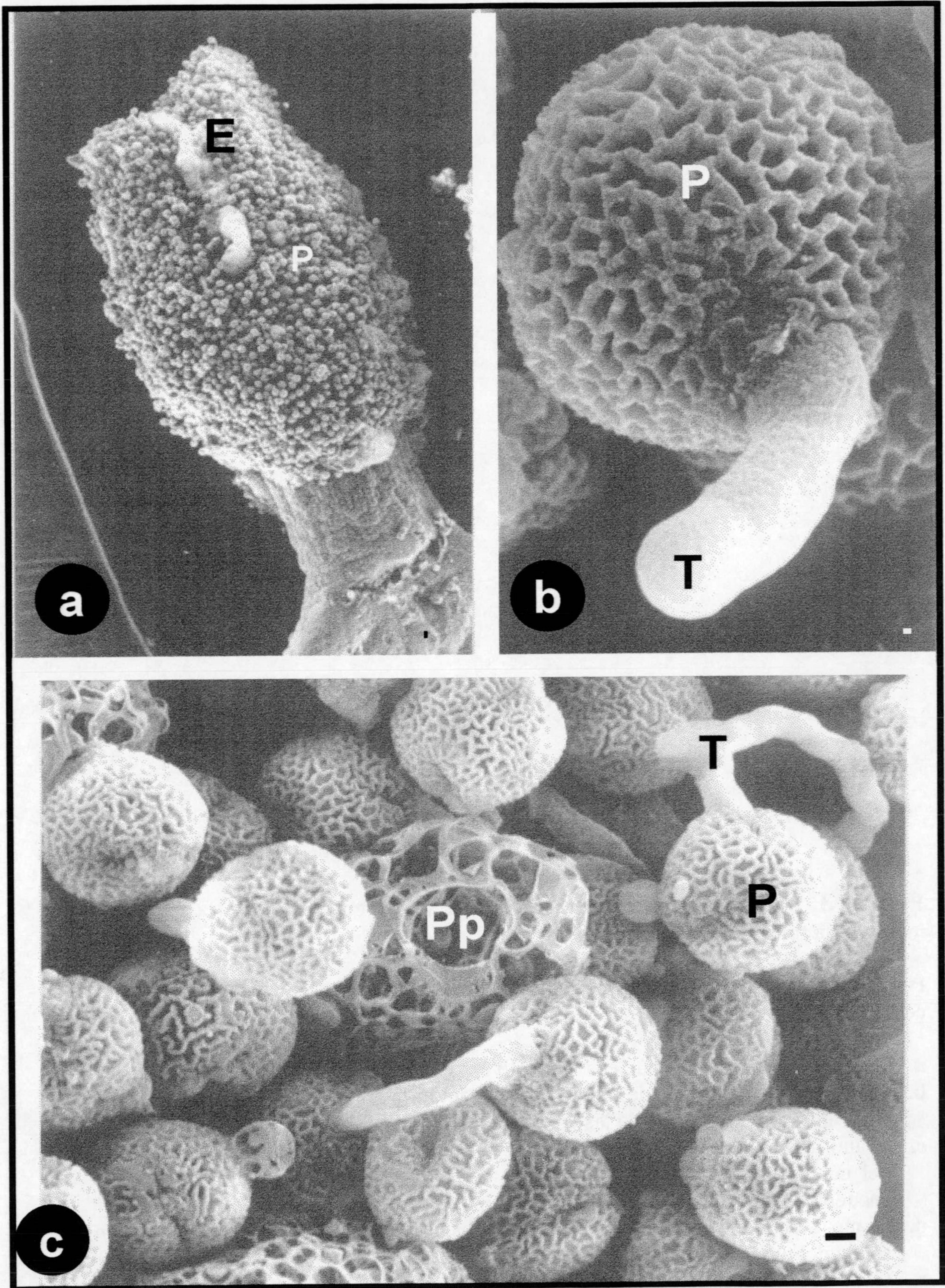


Figura 2

Figura 3. Trayectoria de la célula vegetativa y generativa durante la germinación mediante la tinción de DAPI.

P= Polen, T= Tubo polínico, NV= Núcleo vegetativo, NG= Núcleo generativo, CE= células espermáticas.

- a. Grano de polen con los núcleos vegetativo y generativo (x 3136).
- b. Grano de polen después de 1 hora de incubación. Se observa uno de los dos núcleos en la aproximidad de una de las aperturas (flecha) (x 3136).
- c. Grano germinado después de 1 h y 30 min de incubación. Se observa la presencia del núcleo vegetativo a la salida del tubo polínico mientras que el generativo se encuentra todavía en el grano (x 3136).
- d. Grano germinado después de 2 h de incubación. Los dos núcleos ya están en la salida del tubo. El núcleo vegetativo se encuentra ligeramente adelantado (x 3920).
- e. Grano germinado después de 2 h y 30 min de incubación. Se observa que los dos núcleos están en el tubo, continuando el núcleo vegetativo en primer lugar (x 3920).

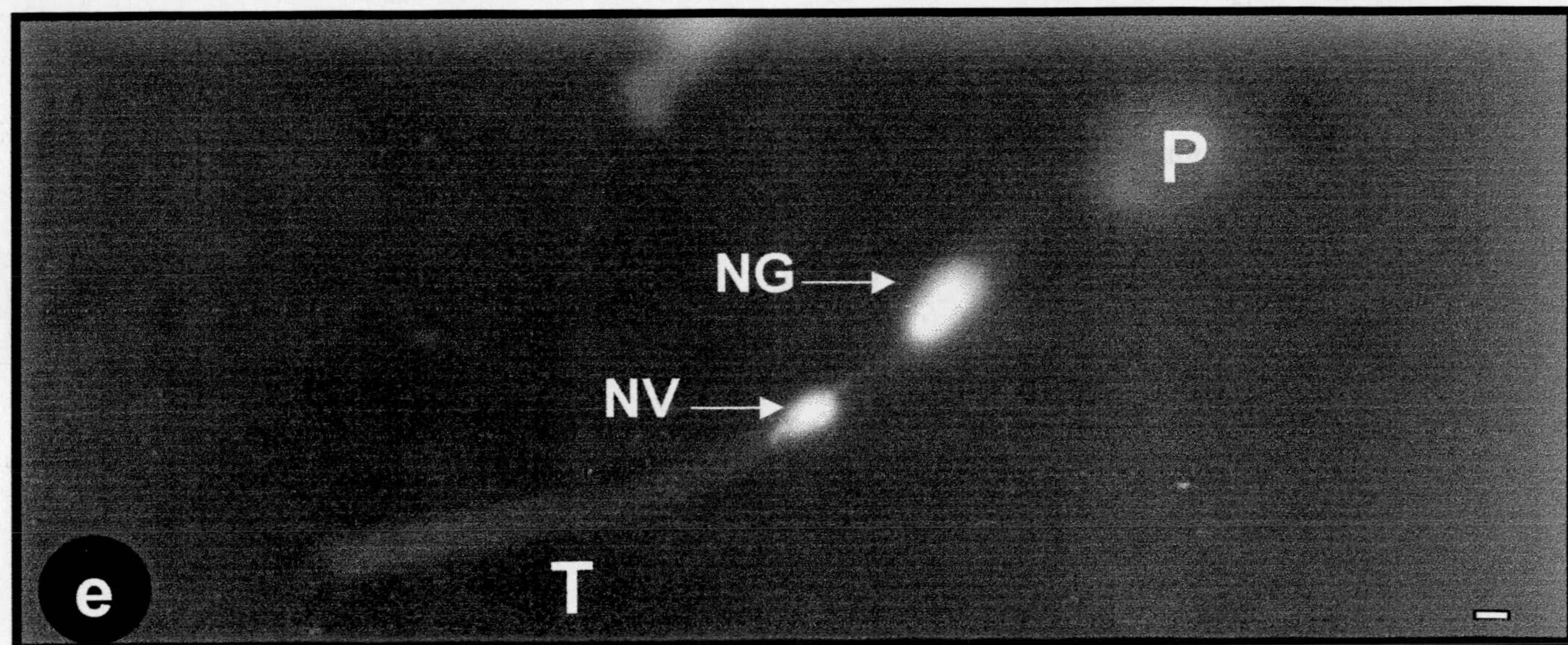
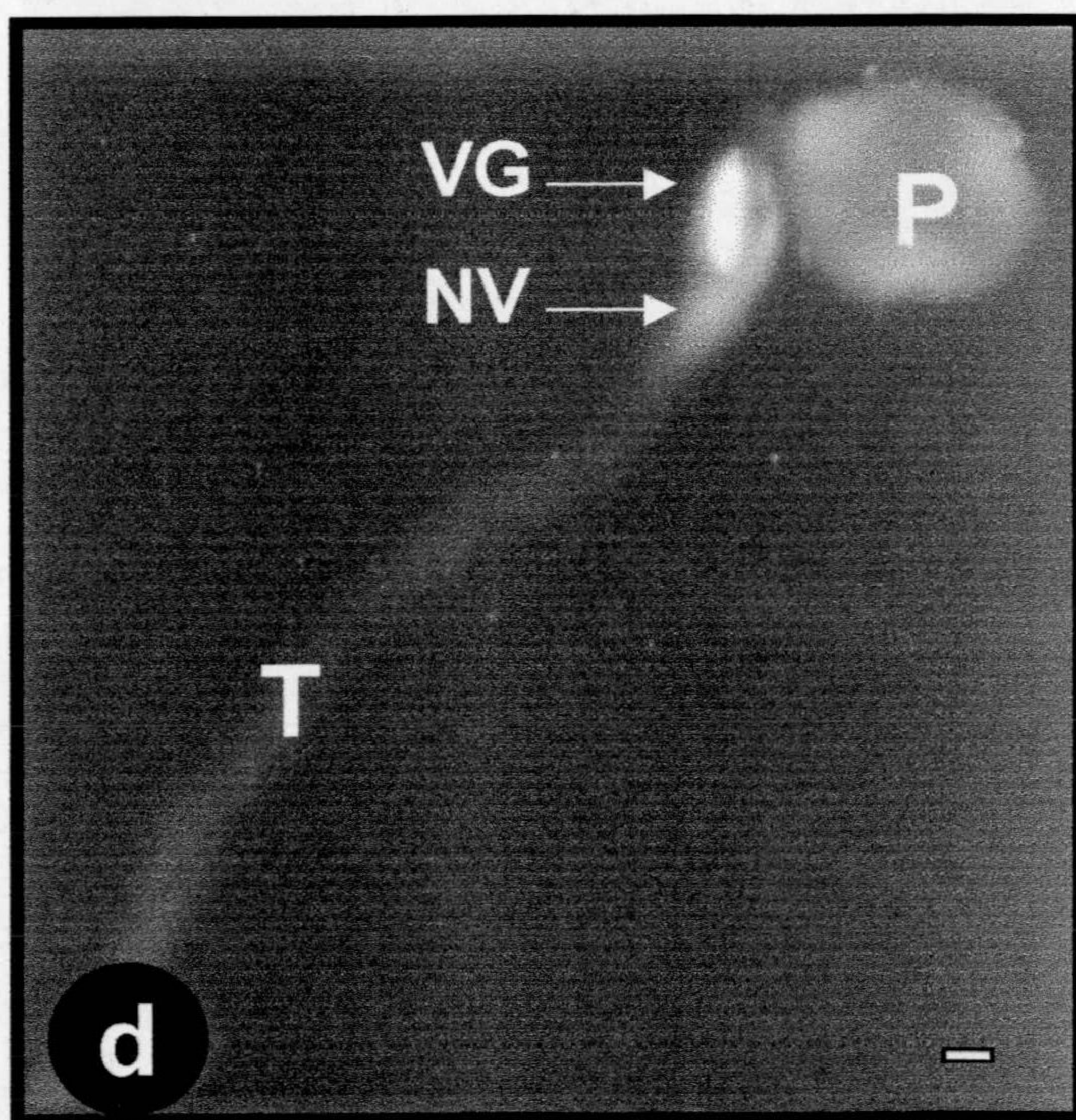
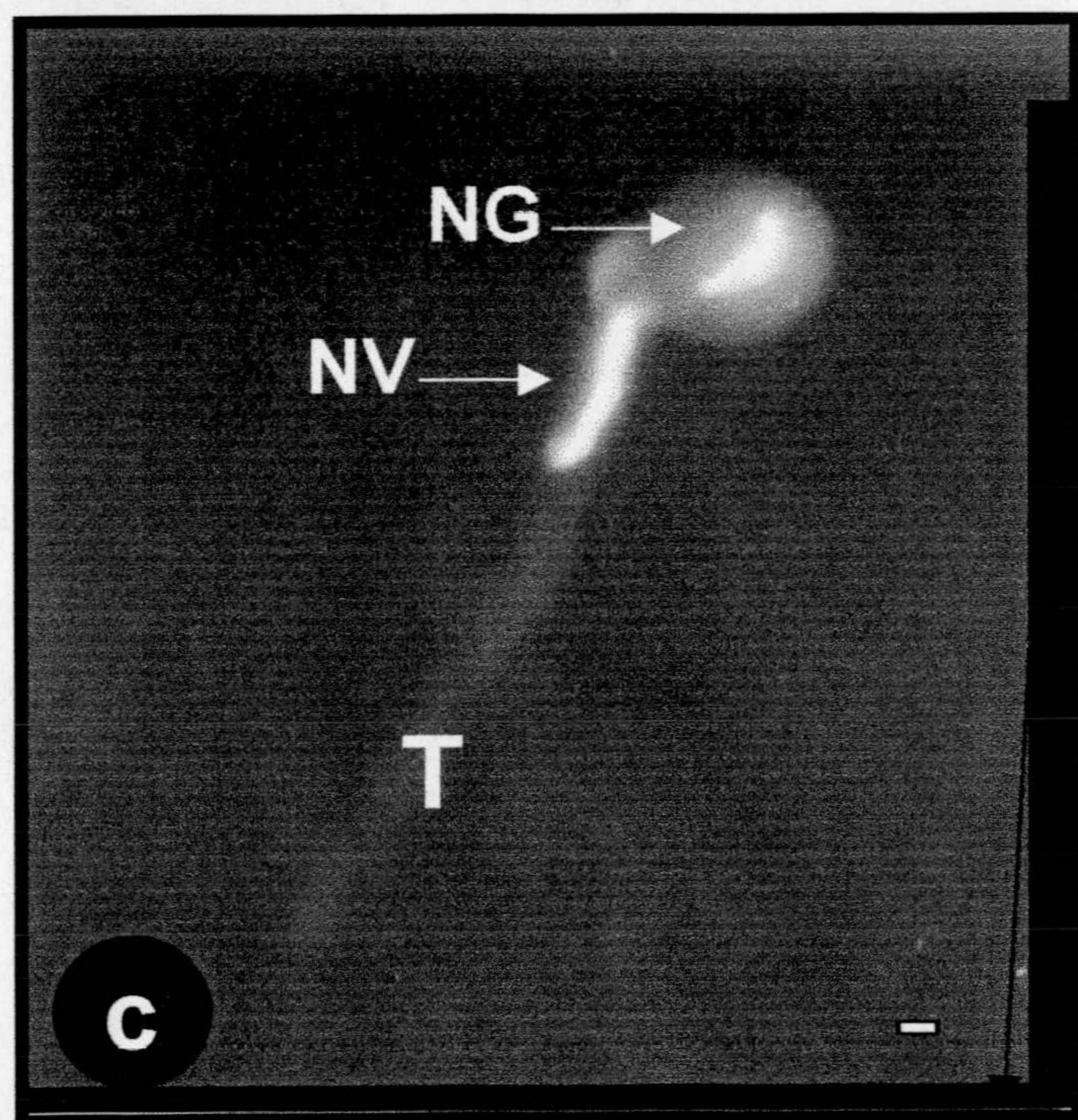
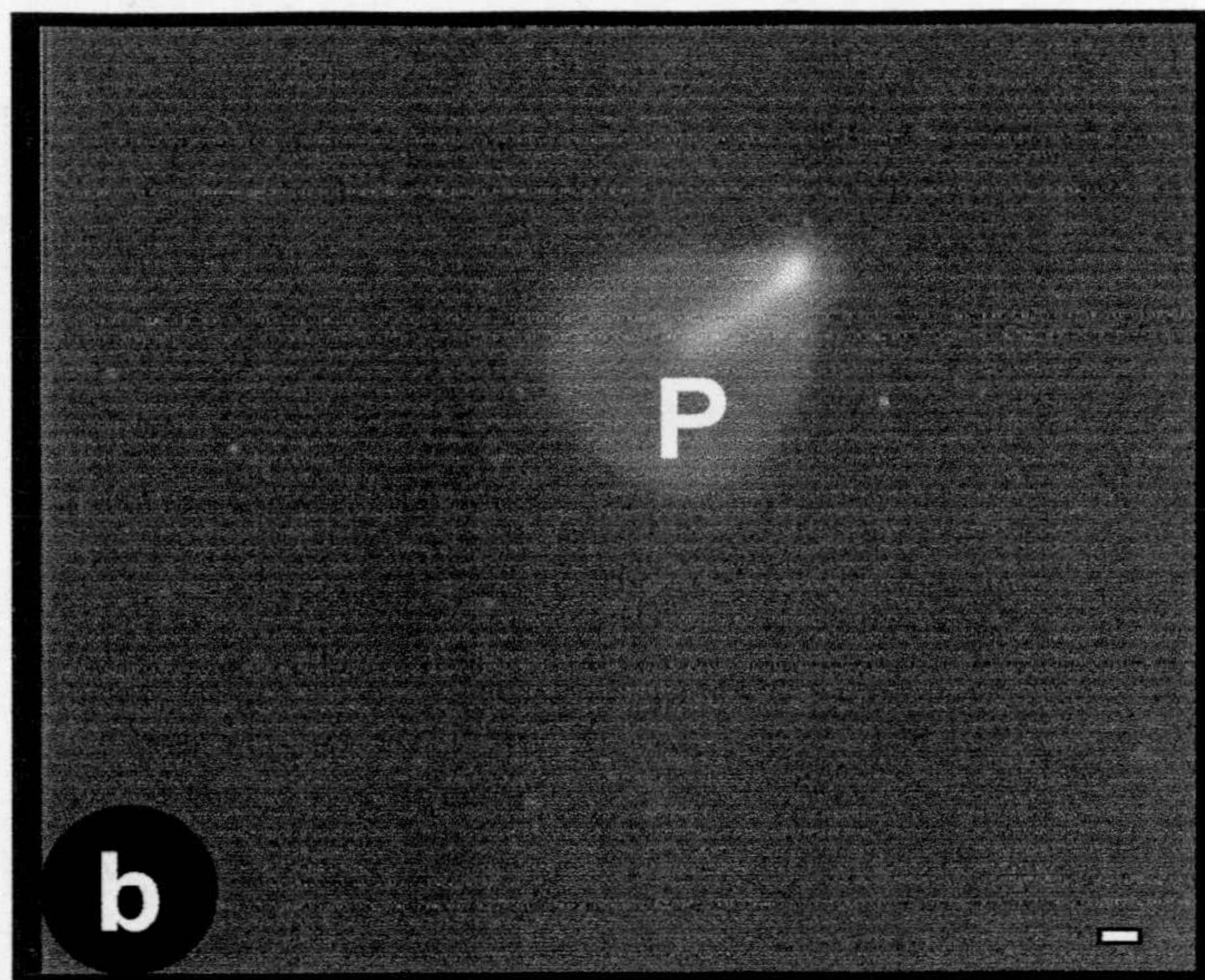
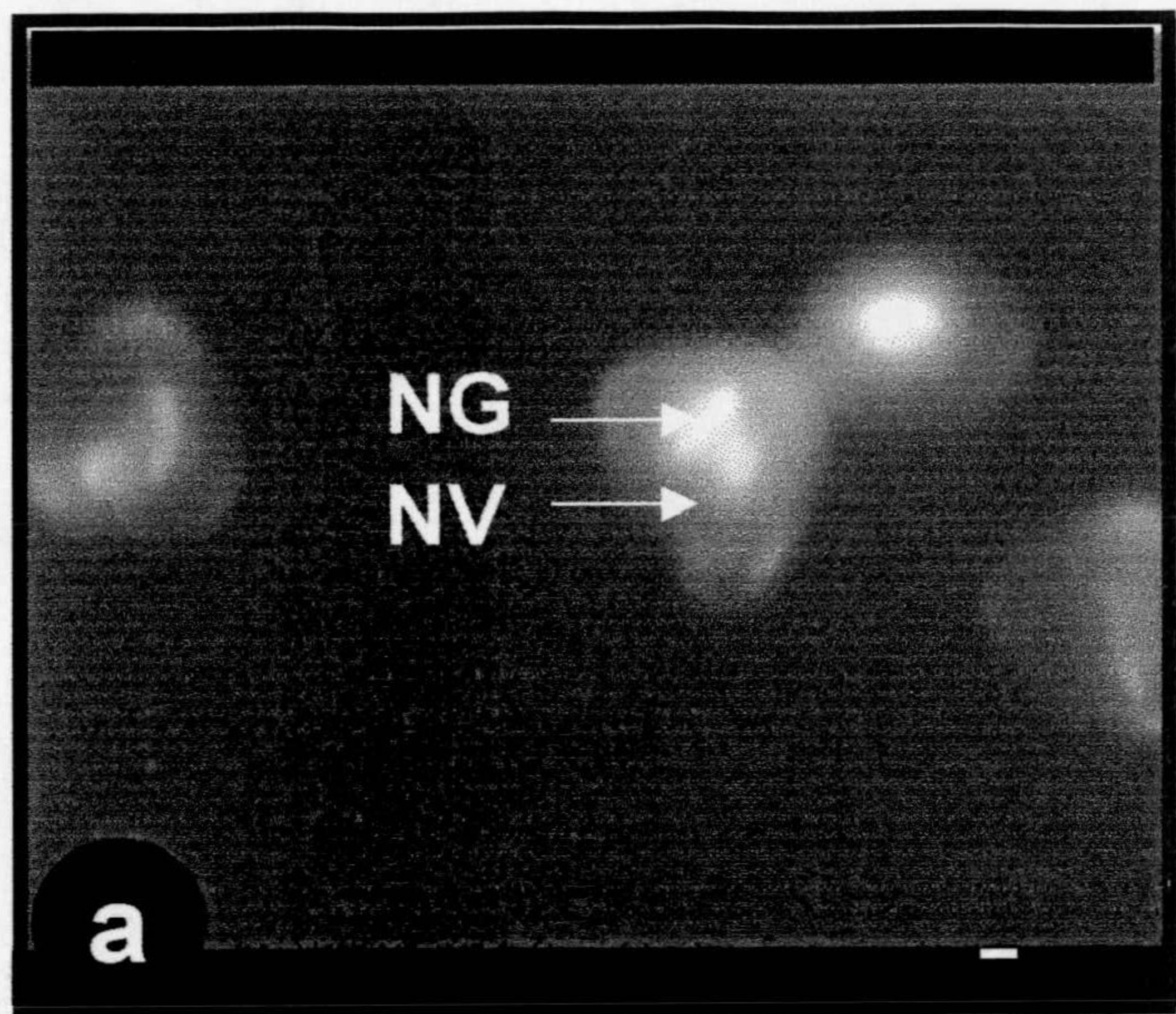
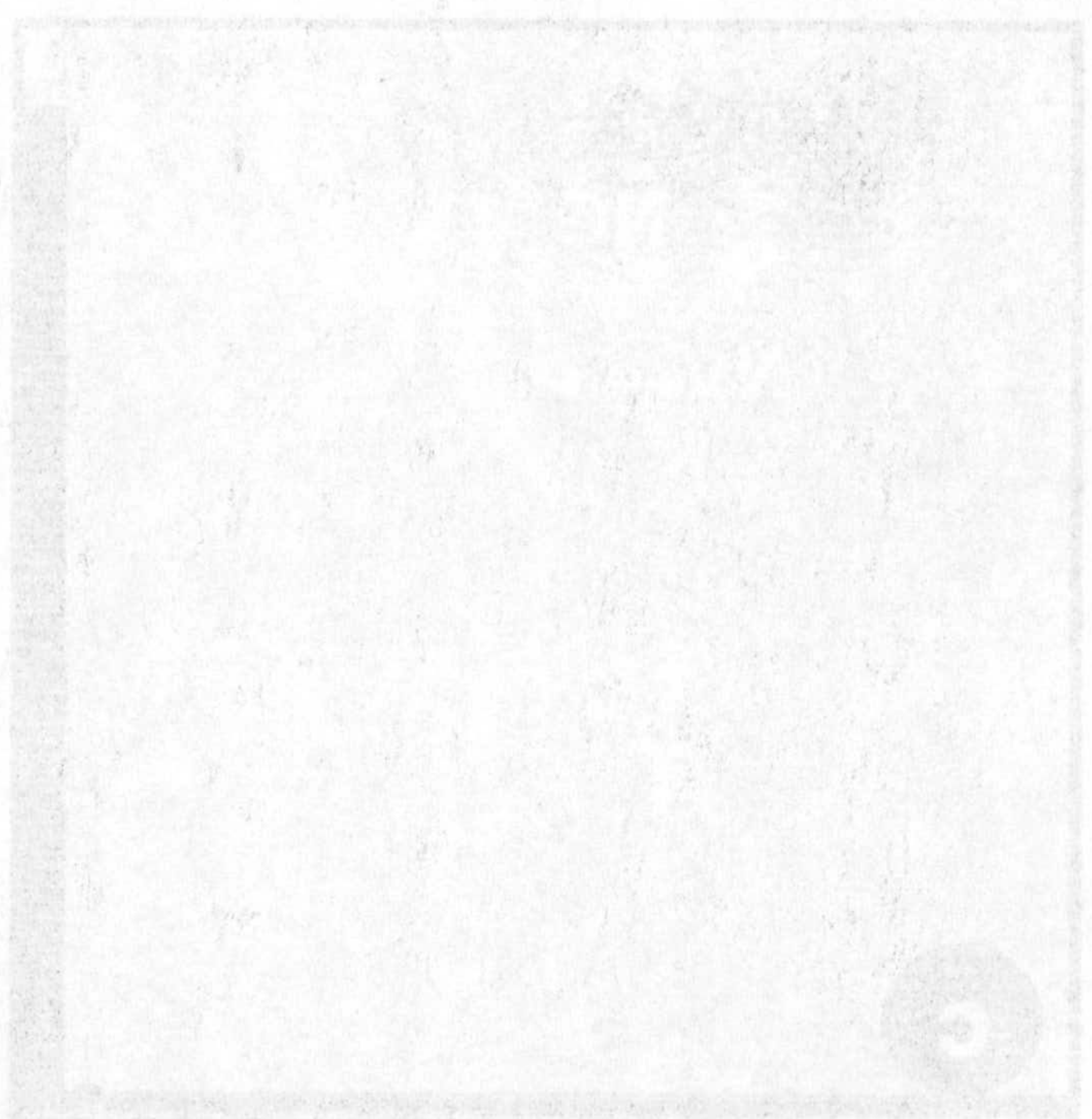
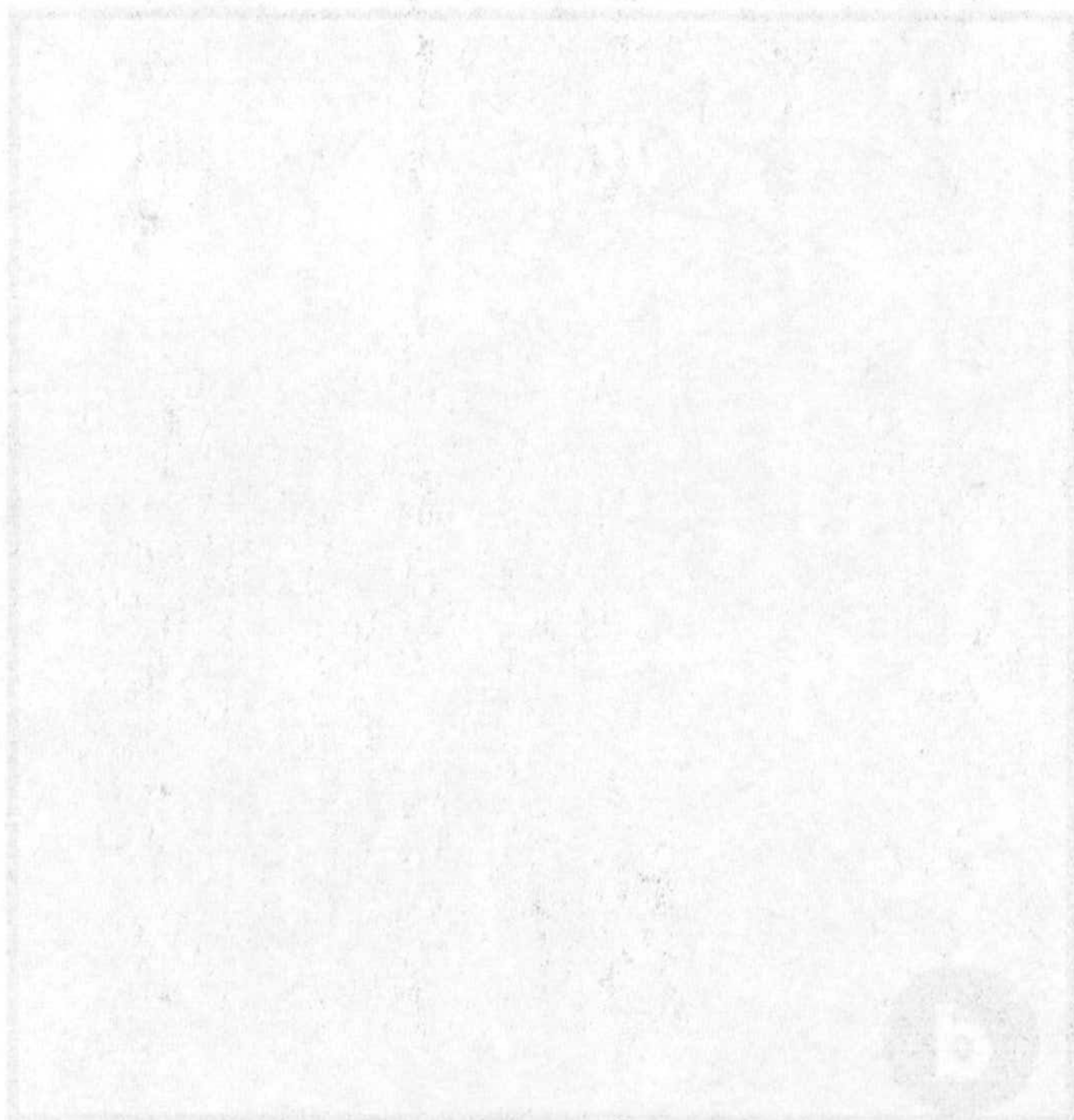
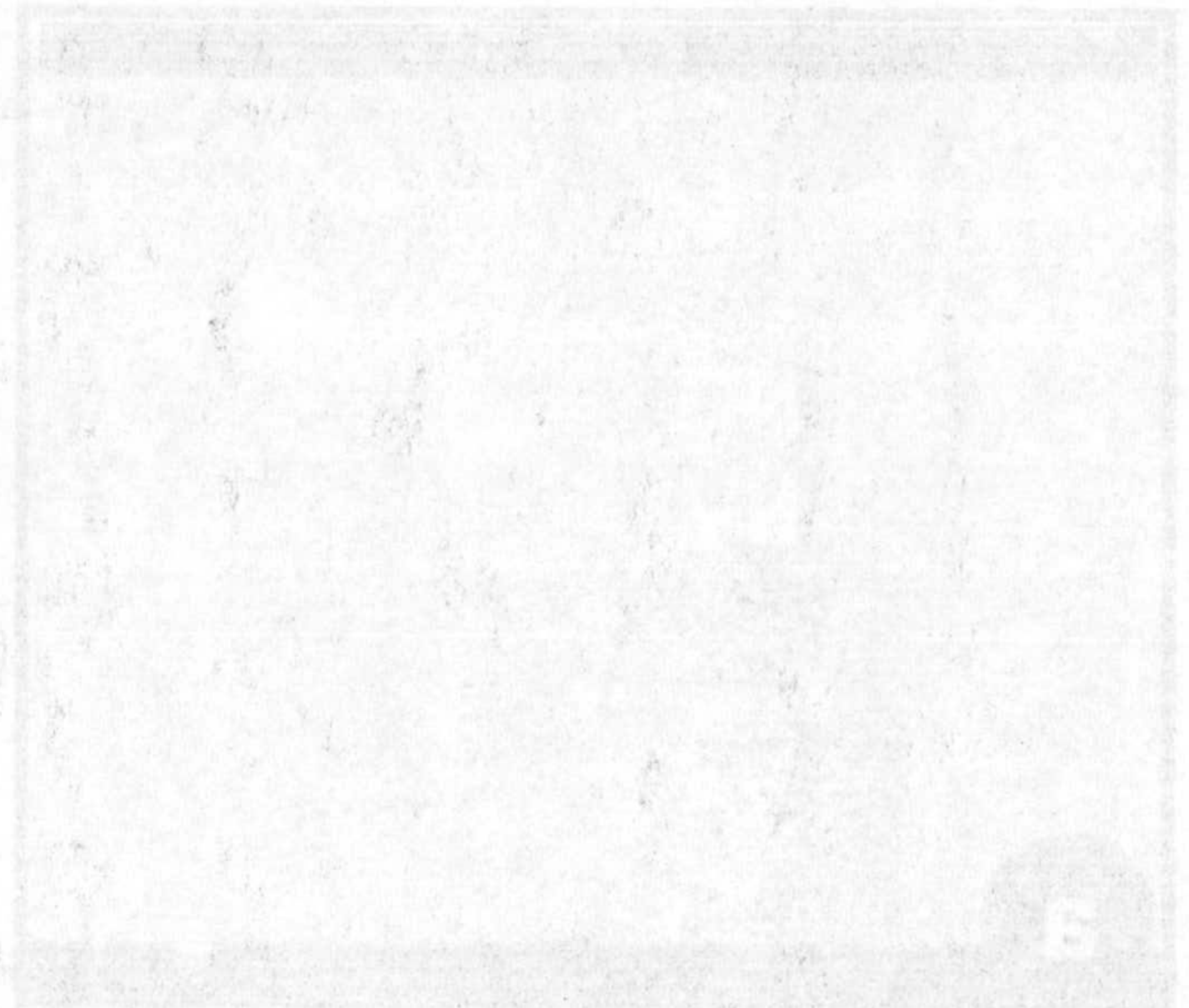
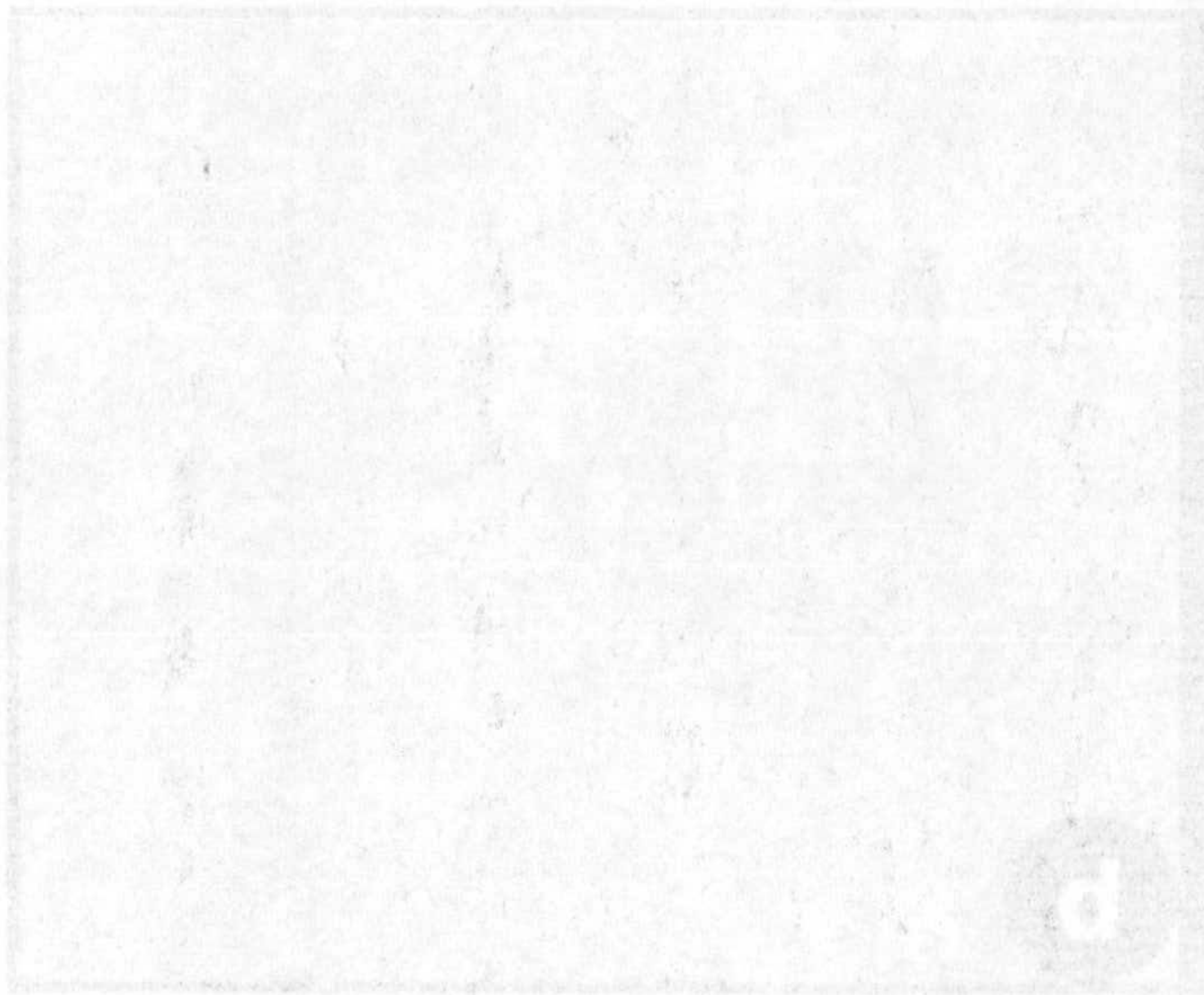


Figura 3



- f.** Grano germinado después de 3 h de incubación. El núcleo vegetativo fluoresce mucho menos y adopta una forma muy alargada y el núcleo generativo al mismo nivel (x 4900).
- g.** Grano germinado después de 3h 30 min de incubación. Los núcleos vegetativo y generativo continúan estando juntos en el mismo nivel cerca del grano (x 3920).
- h.** Tubo polínico germinado después de 3 h 30 min. En este caso se aprecia que el núcleo germinativo se adelanta con respecto a la posición del núcleo vegetativo (x 3920).
- i.** Grano germinado después de 5 h 30 min de incubación. Se observa que el núcleo generativo ya ha adelantado al núcleo vegetativo que fluoresce mucho menos. (x 3920).
- j.** Grano germinado después de 7h de incubación. Se observa la presencia de los dos núcleos espermáticos con la misma intensidad de fluorescencia, resultado la división mitótica del núcleo generativo (x 3920).

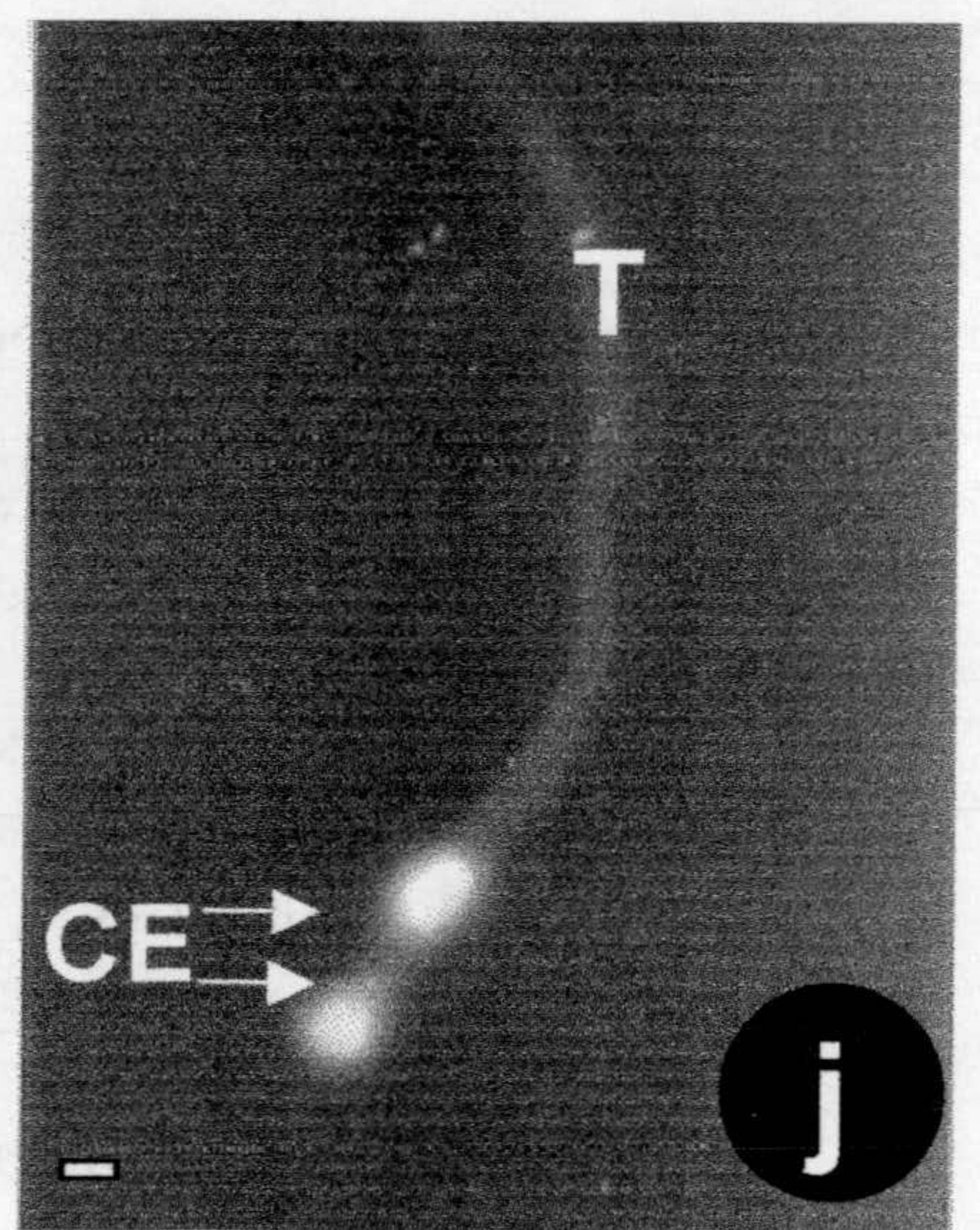
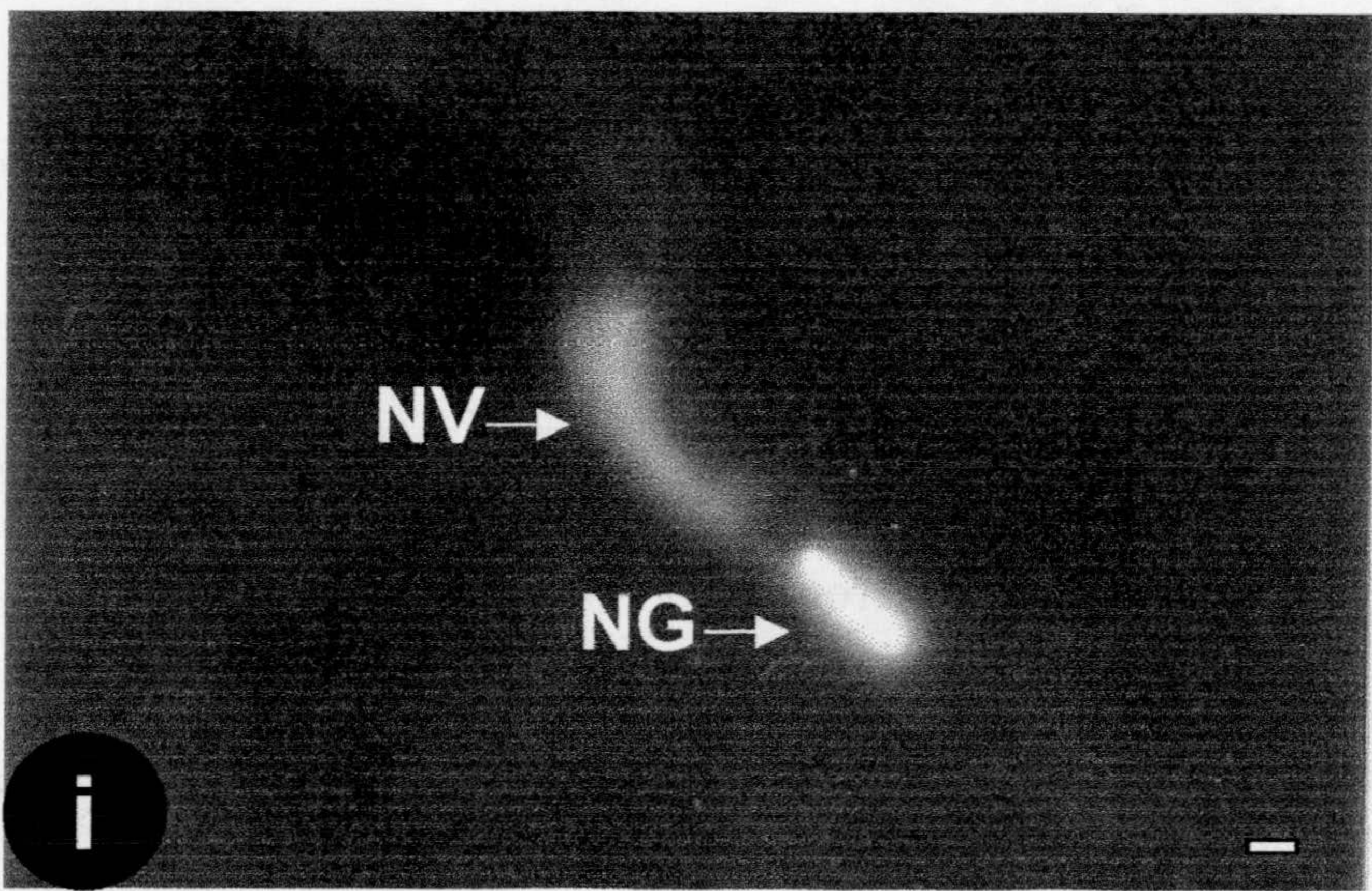
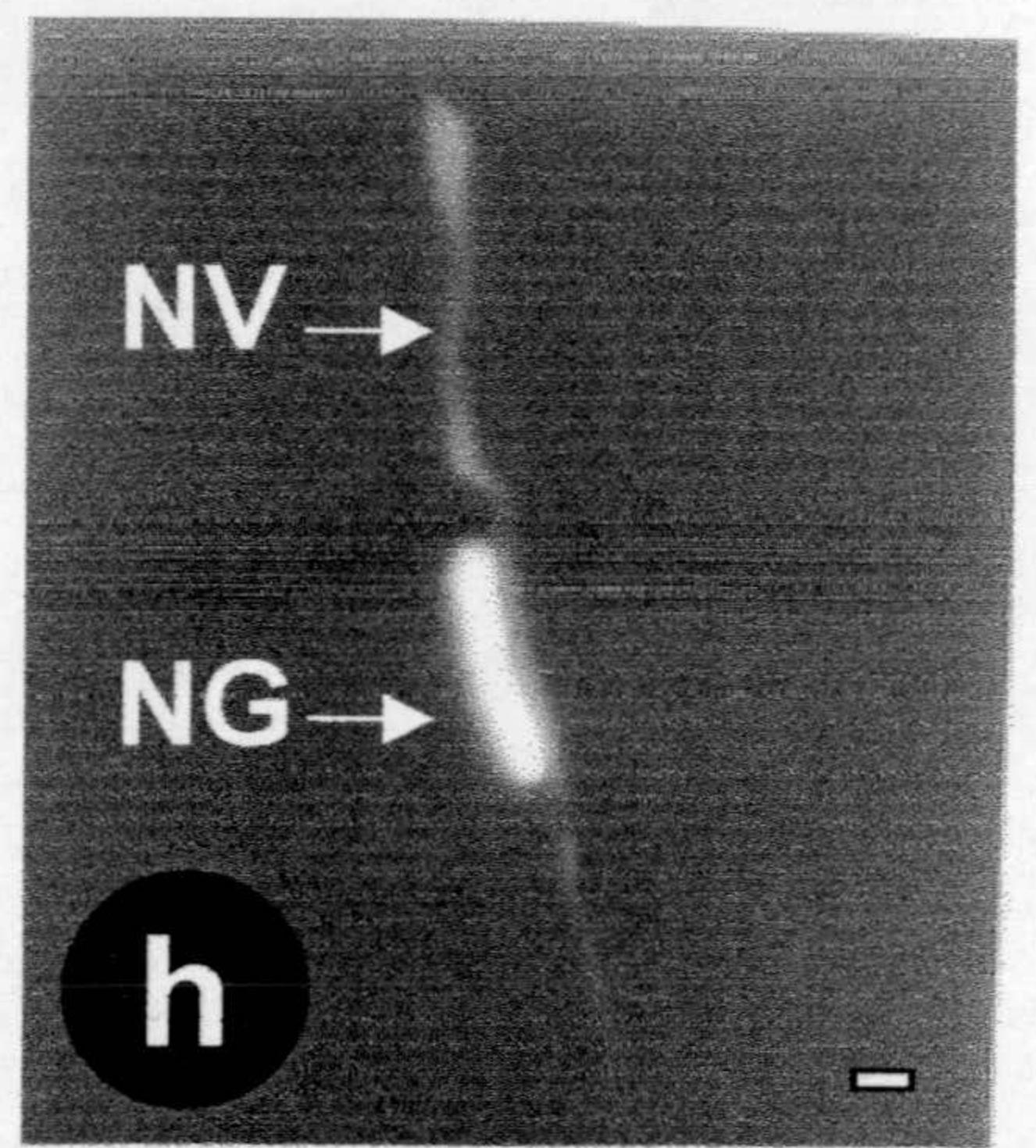
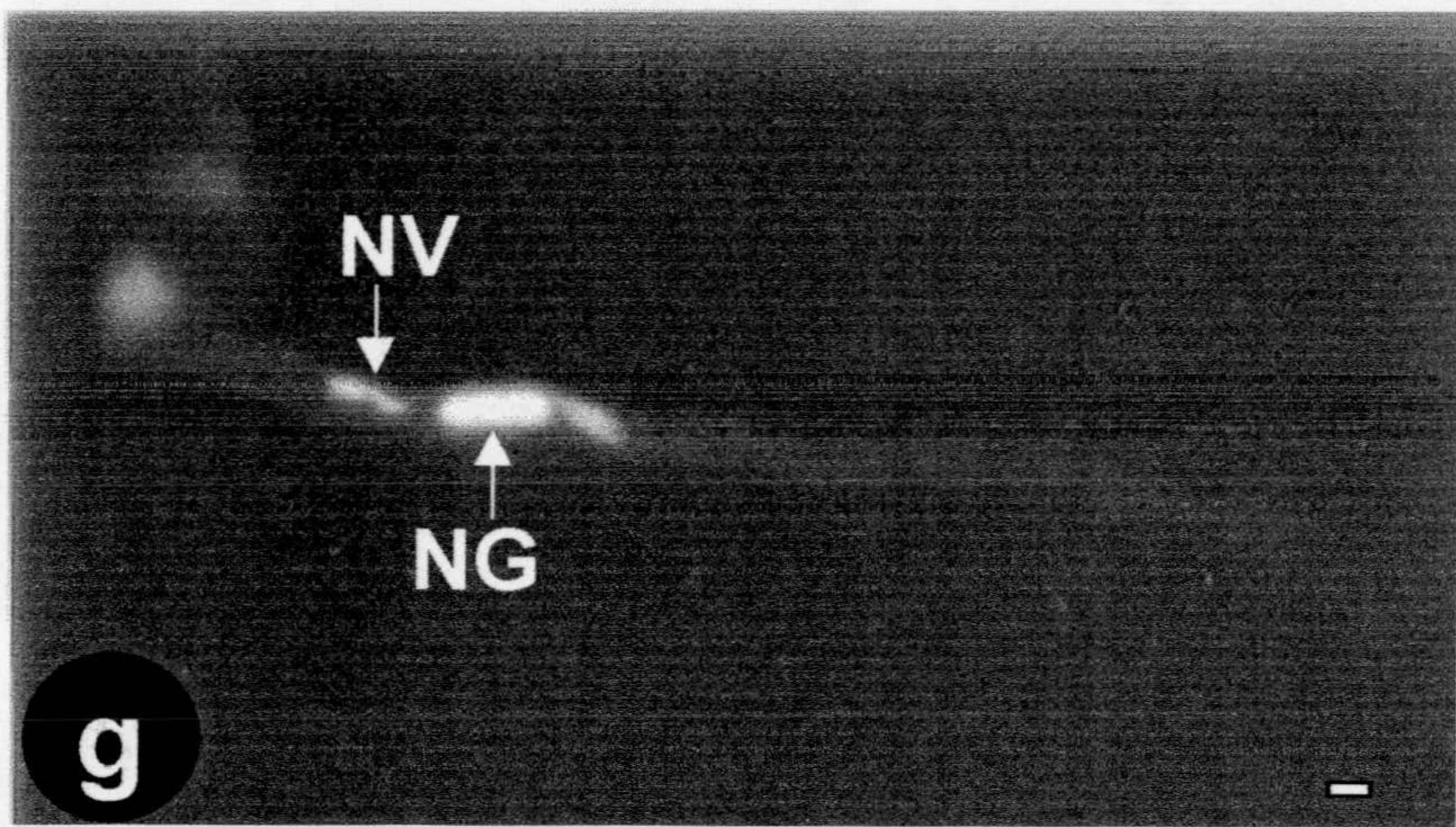
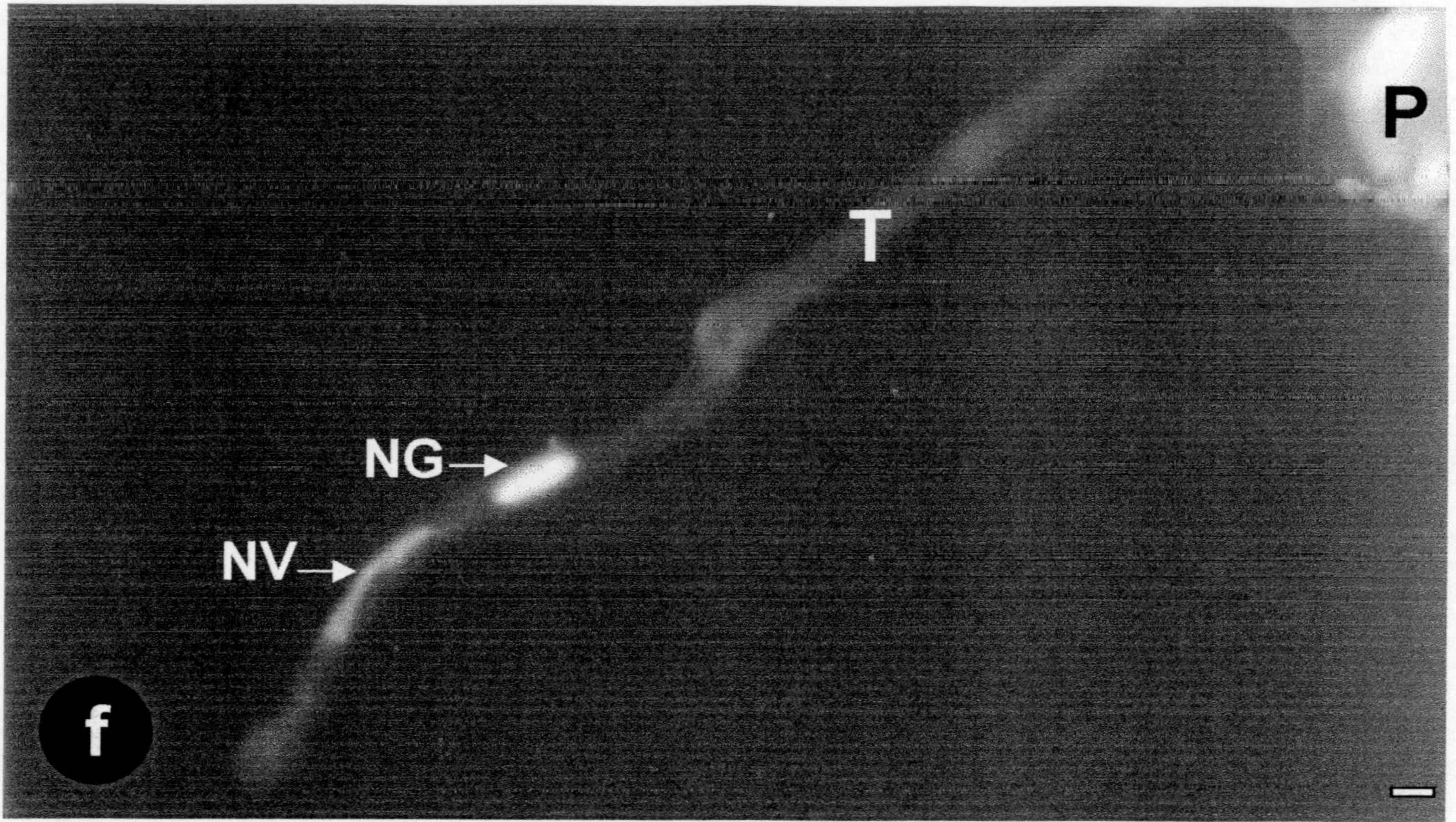


Figura 3

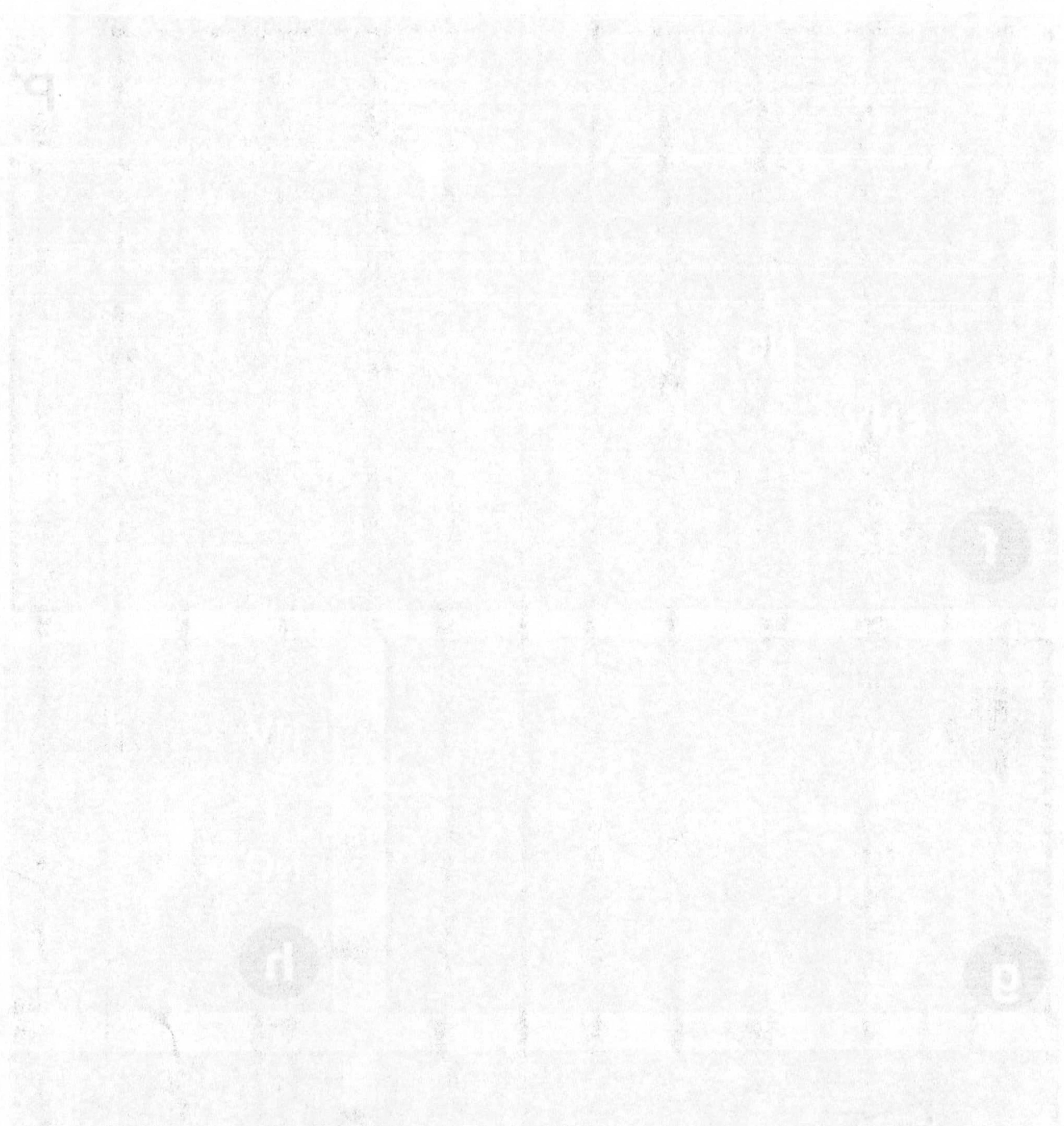


Figura 4. Detalle del citoplasma de granos de polen. Microscopía Electrónica.

V= Vesículas grandes claras, Vd= Vesículas pequeñas gris, RE= cisternas de retículo endoplasmático, L= cuerpos lipídicos, Ex= Exina, In= Intina, N= Núcleo.

- a. Grano de polen libre. Se observa que el citoplasma contiene dos tipos de vesículas unas grandes de contenido translúcido a los electrones y otras pequeñas de densidad media a los electrones (x 12600).
- b. Grano de polen después de 2 h en cámara húmeda. En el citoplasma se destaca la presencia de diminutas vesículas (flechas) muy abundantes debajo de la pared del grano. También se observa gran cantidad de retículo muy denso (x 25400).

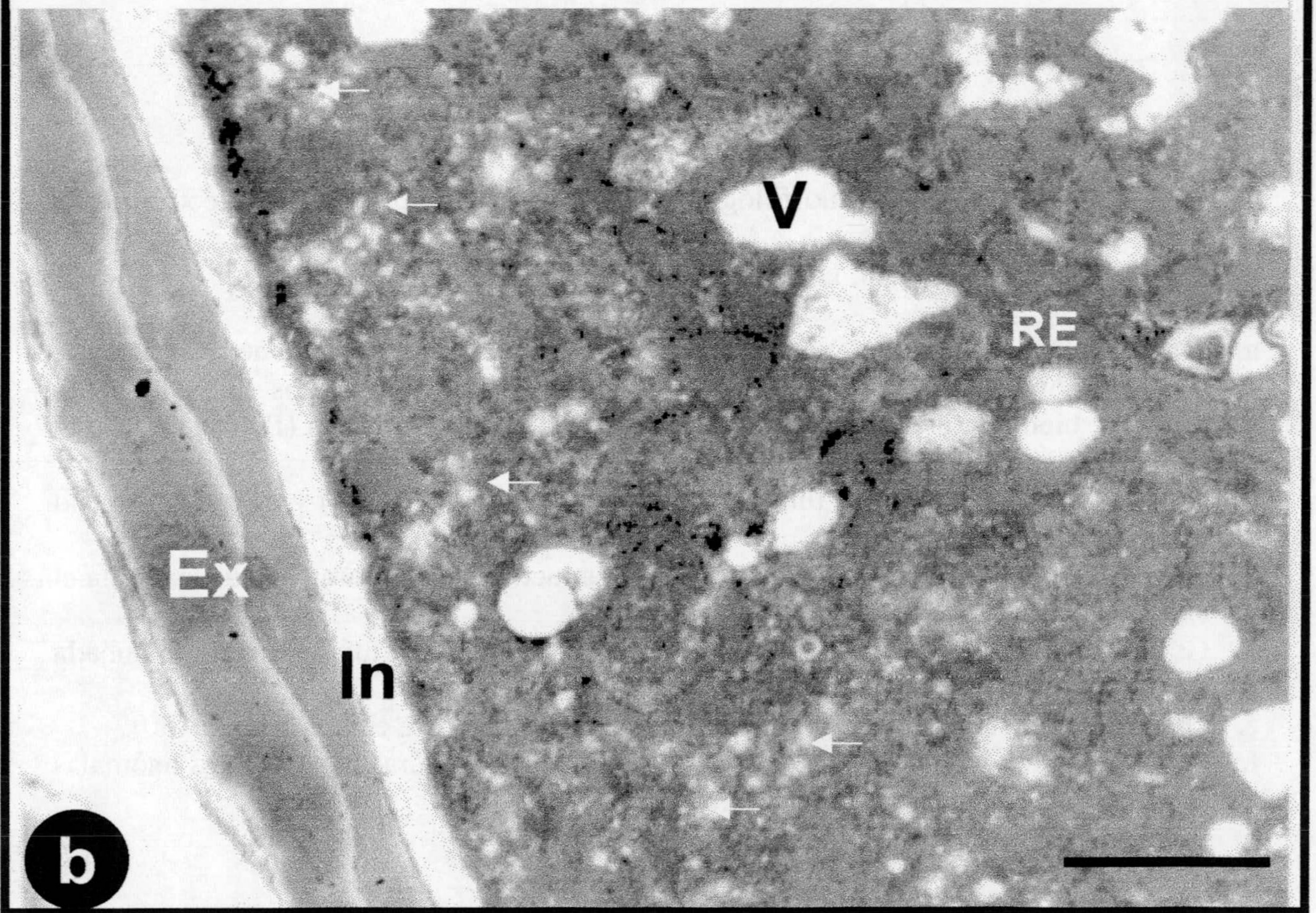
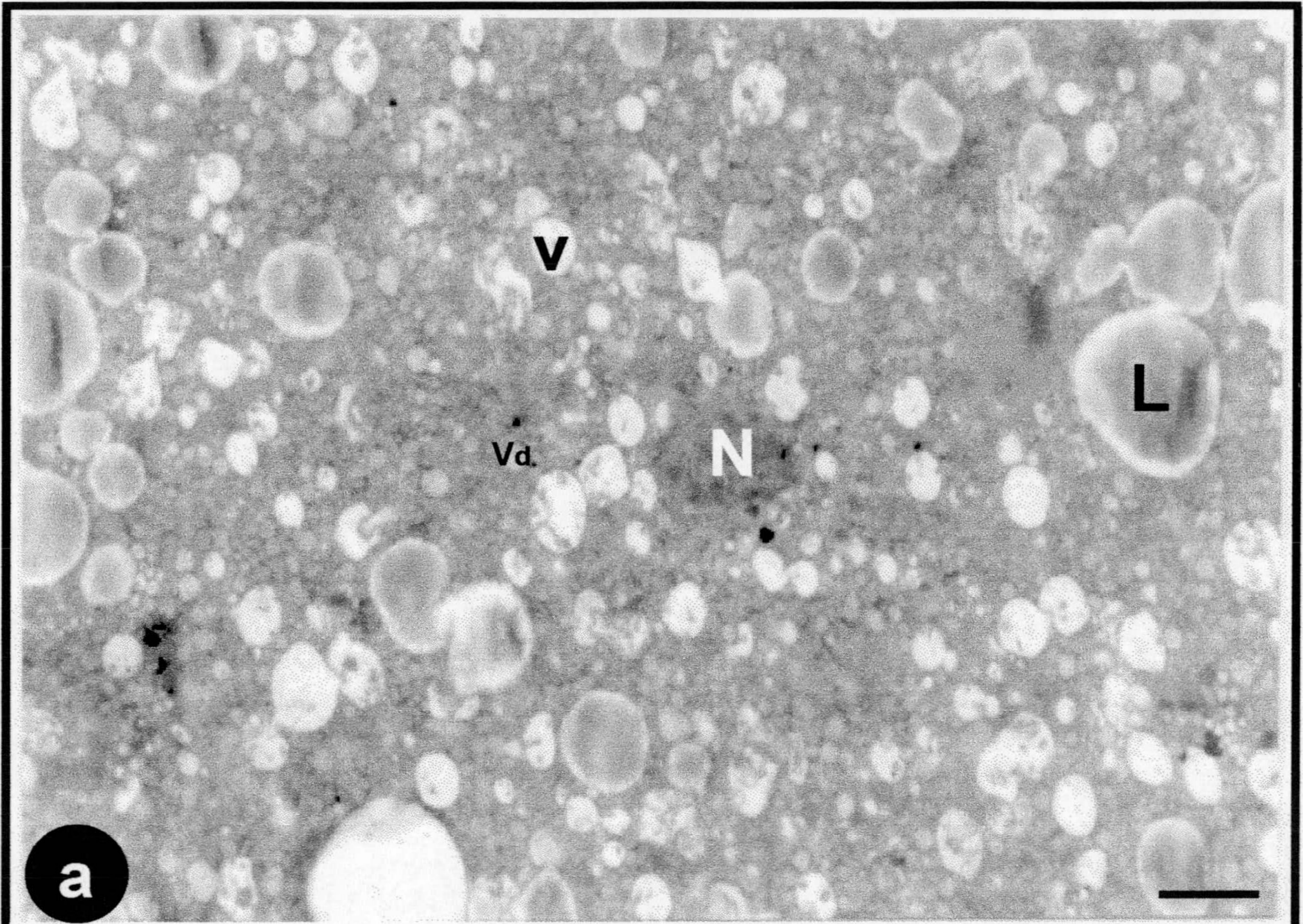


Figura 4

Figura 5. Diferentes tipos y morfologías de polen. Microscopía óptica y electrónica.

Ap= Apertura, *= Polen vacío, L= Lípidos

- a. Tinción PAS. Se distinguen tres tipos de polenes. Unos en buen estado de conservación del citoplasma (cabeza de flecha) y los otros dos aparentemente estériles, bien con elevado contenido de almidón en el citoplasma (flechas) o con el citoplasma vacío (*) (x 4199).
- b. Test de FDA. Se distinguen unos granos que fluorescen (viables) y otros que no (no viables) (x 1333)
- c. Grano de polen con citoplasma muy rico en estructuras y aperturas hinchadas hacia el exterior (x 2650).
- d. Grano con una elevada cantidad de almidón (flecha) y apertura anómala abombada hacia el interior (x 4240).
- e. Grano de polen con tres aperturas anómalas abombadas hacia el interior (x 3150).
- f. Grano de polen totalmente vacío con la pared bien estructurada y aperturas anómalas (x 4851).

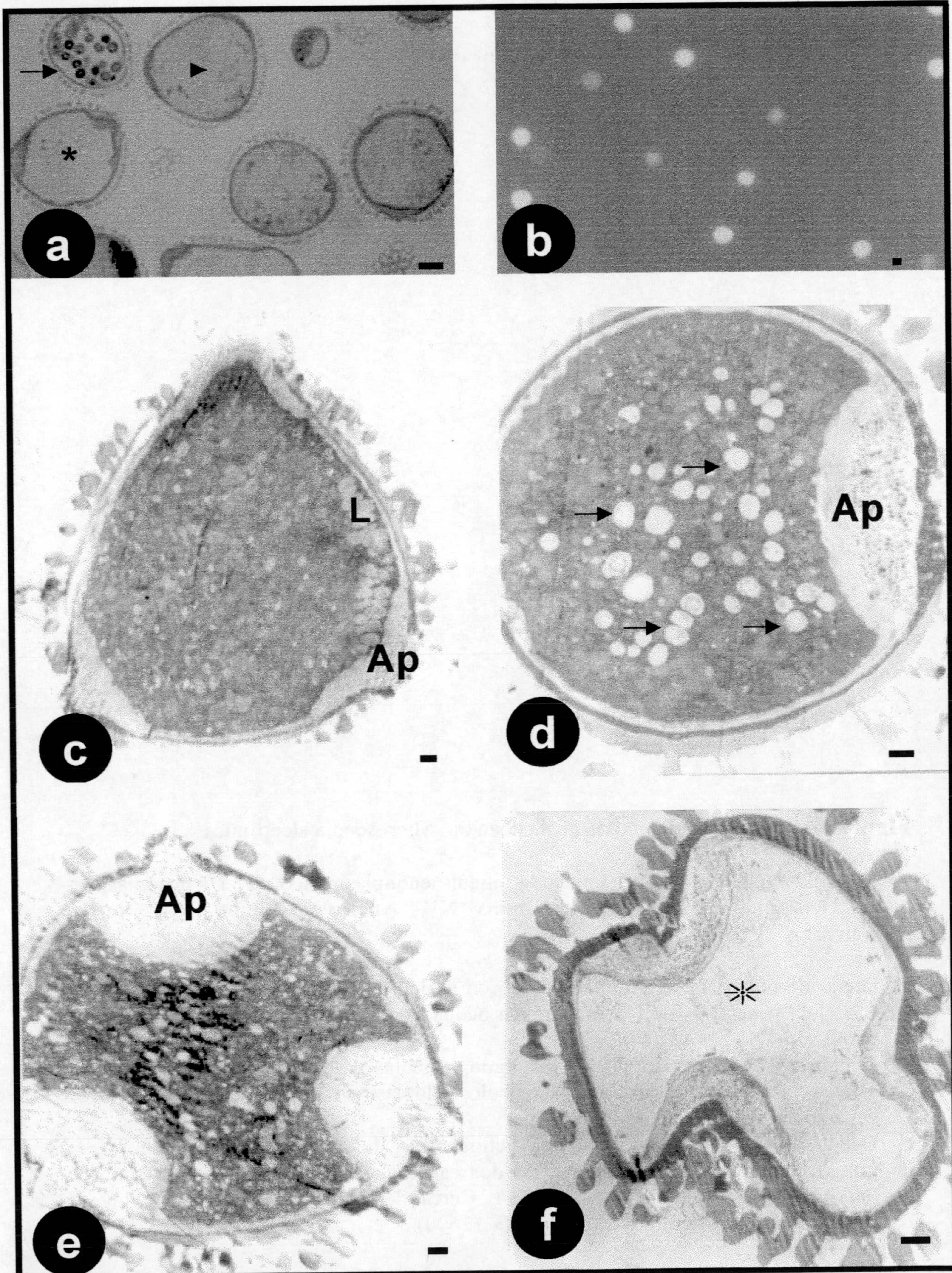


Figura 5

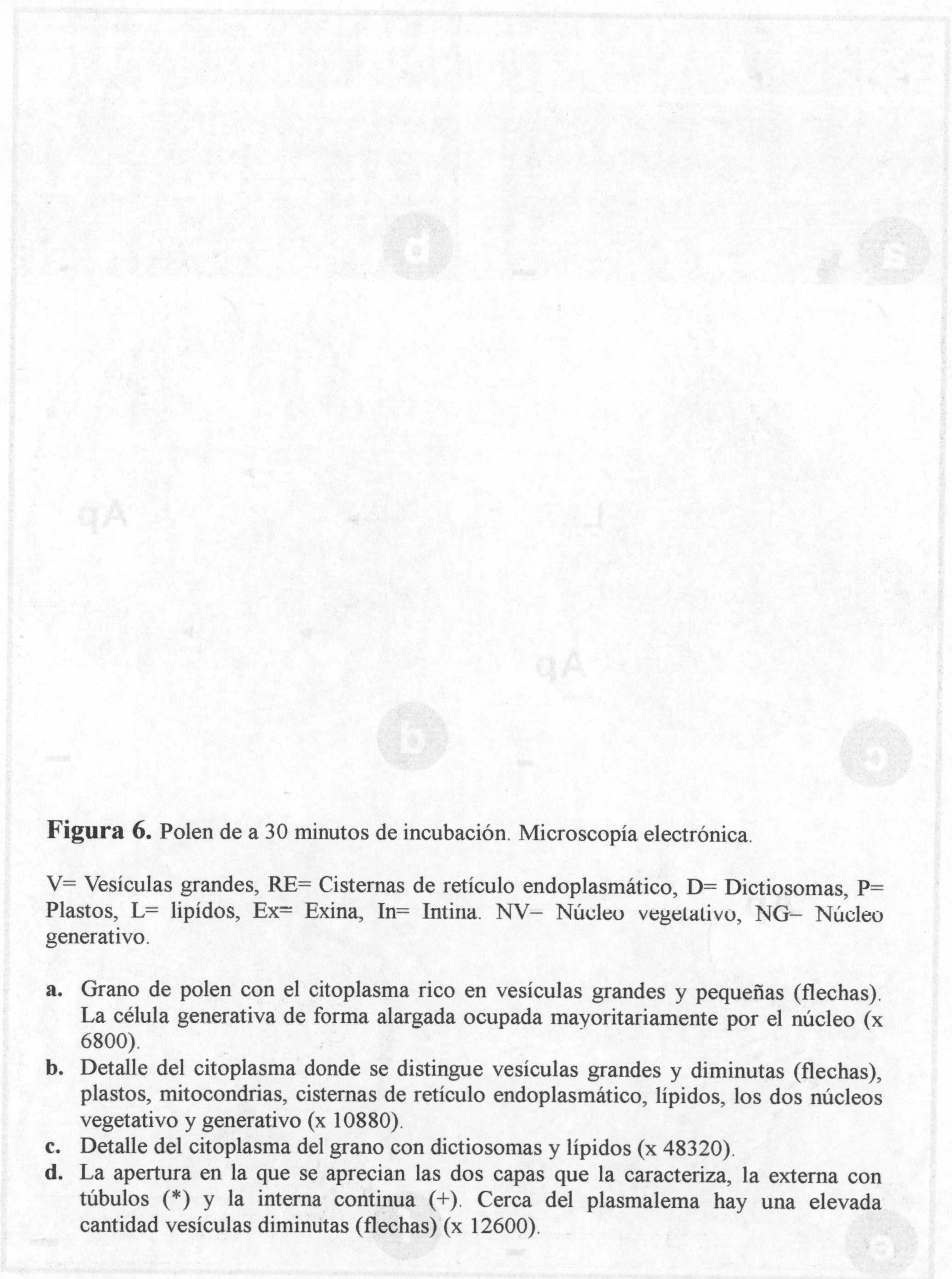


Figura 6. Polen de a 30 minutos de incubación. Microscopía electrónica.

V= Vesículas grandes, RE= Cisternas de retículo endoplasmático, D= Dictiosomas, P= Plastos, L= lípidos, Ex= Exina, In= Intina. NV= Núcleo vegetativo, NG= Núcleo generativo.

- a. Grano de polen con el citoplasma rico en vesículas grandes y pequeñas (flechas). La célula generativa de forma alargada ocupada mayoritariamente por el núcleo (x 6800).
- b. Detalle del citoplasma donde se distingue vesículas grandes y diminutas (flechas), plastos, mitocondrias, cisternas de retículo endoplasmático, lípidos, los dos núcleos vegetativo y generativo (x 10880).
- c. Detalle del citoplasma del grano con dictiosomas y lípidos (x 48320).
- d. La apertura en la que se aprecian las dos capas que la caracteriza, la externa con túbulos (*) y la interna continua (+). Cerca del plasmalema hay una elevada cantidad vesículas diminutas (flechas) (x 12600).

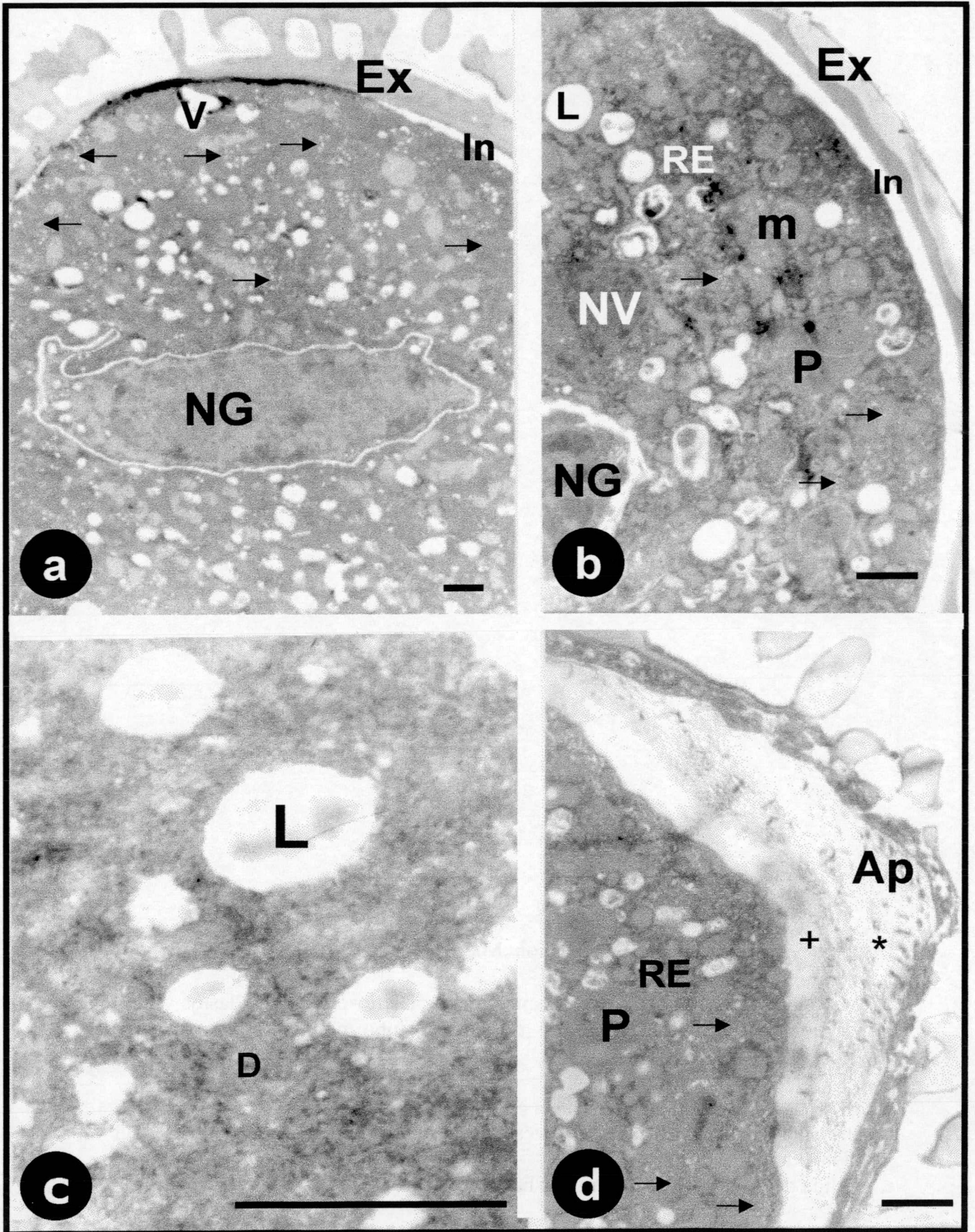


Figura 6

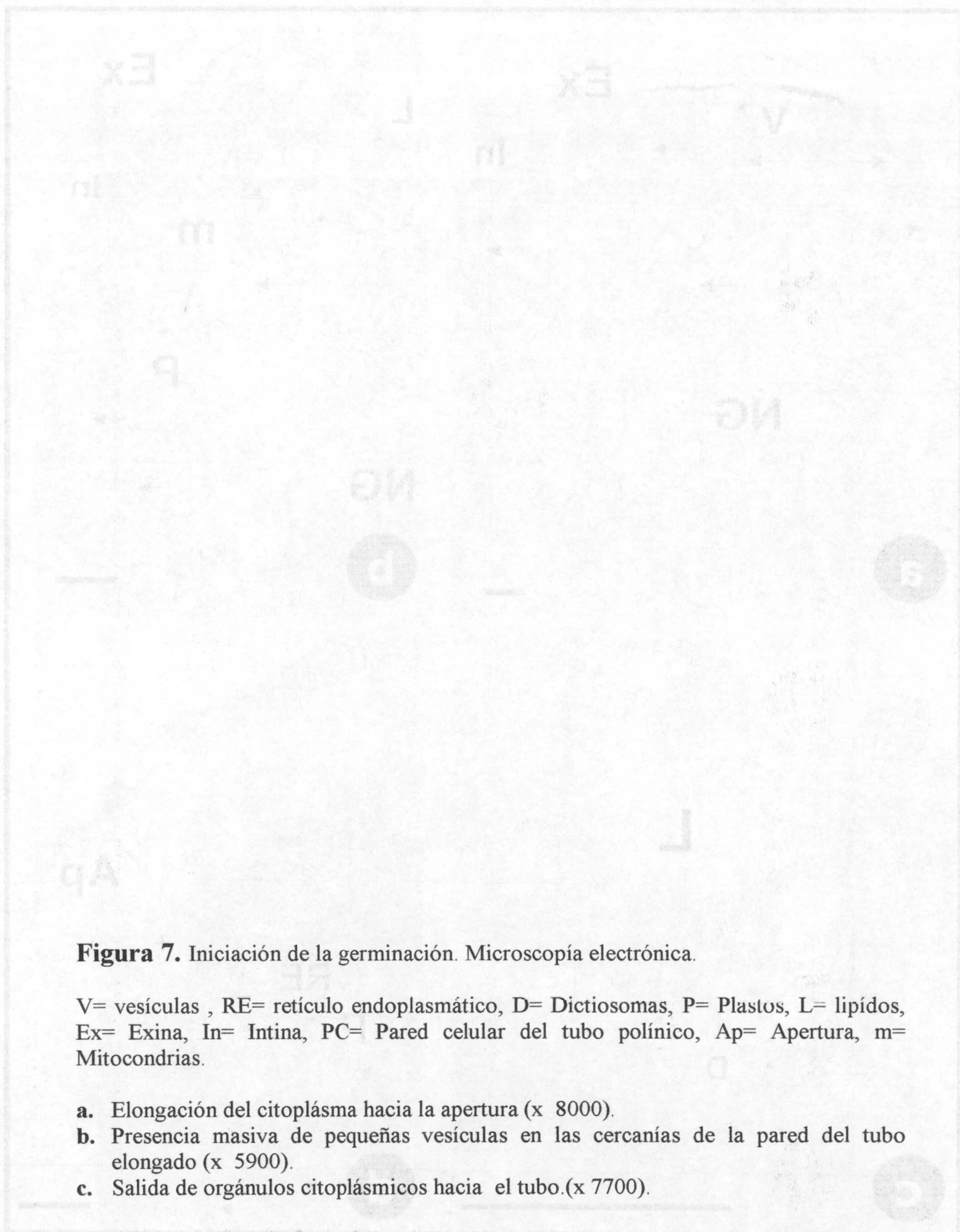


Figura 7. Iniciación de la germinación. Microscopía electrónica.

V= vesículas , RE= retículo endoplasmático, D= Dictiosomas, P= Plastos, L= lipídos, Ex= Exina, In= Intina, PC= Pared celular del tubo polínico, Ap= Apertura, m= Mitocondrias.

- a. Elongación del citoplasma hacia la apertura (x 8000).
- b. Presencia masiva de pequeñas vesículas en las cercanías de la pared del tubo elongado (x 5900).
- c. Salida de orgánulos citoplásmicos hacia el tubo.(x 7700).

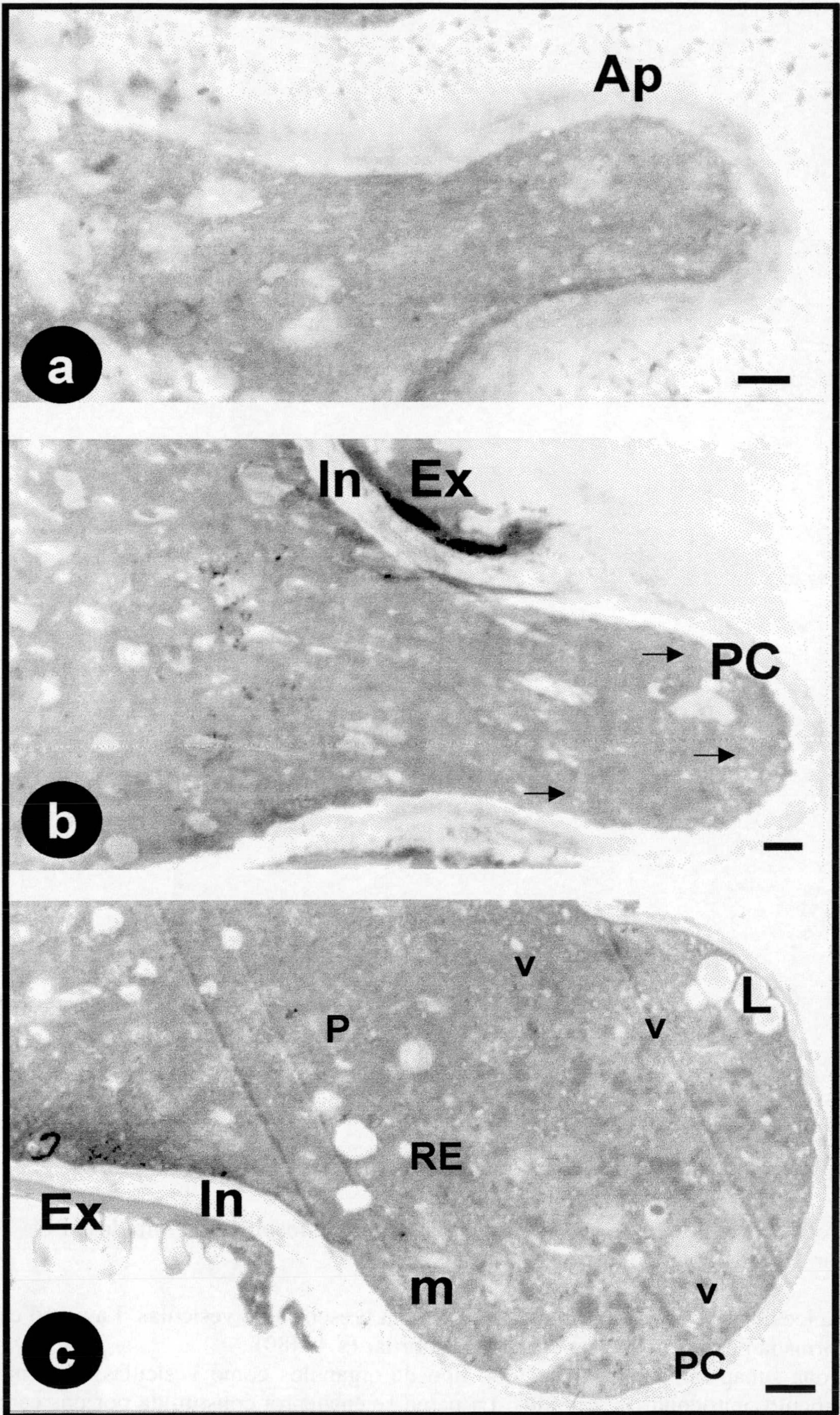


Figura 7

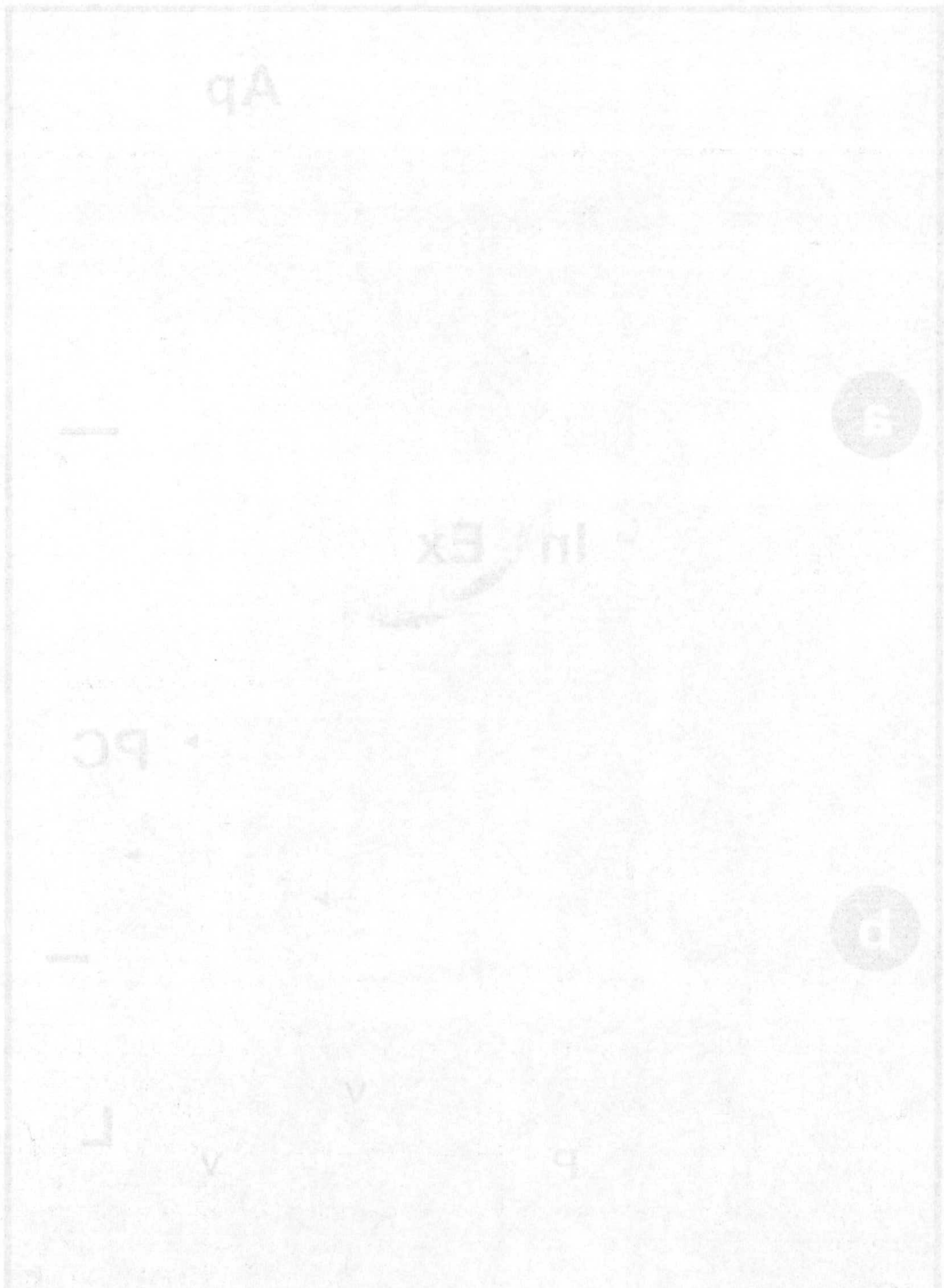


Figura 8. Tubo polínico. Microscopía electrónica.

V= vesículas, RE= retículo endoplasmático, D= Dictiosomas, L= lípidos, PC= Pared celular del tubo polínico, m= Mitocondrias.

- a. Ápice del tubo polínico donde predomina la presencia de vesículas. La pared celular formada por una sola capa de material fibrilar (x 44480).
- b. Zona subapical donde existe todo tipo de organulos como vesículas, cisternas del retículo, mitocondrias y lípidos. La pared se encuentra constituida por dos capas de diferente estructura (x 20000).

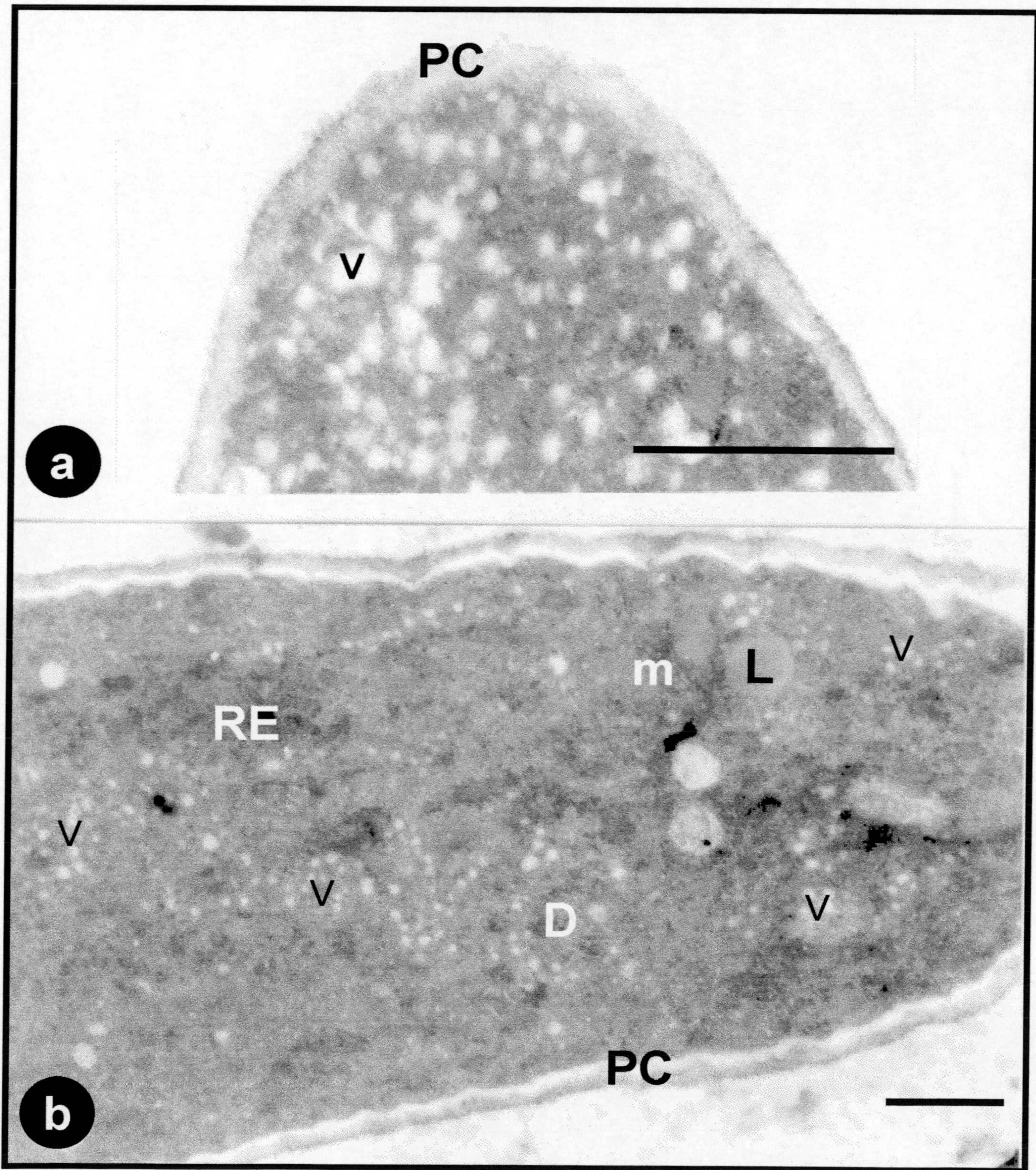


Figura 8

Figura 9. Secciones transversales de la zona apical y subapical del tubo polínico.

V= vesículas, RE= retículo endoplasmático, D= Dictiosomas, P= Plastos, L= lípidos, PC= Pared celular del tubo polínico, m= Mitocondrias.

- a. Citoplasma del ápice del tubo rico en vesículas. Pared celular formada por una capa fibrilar (x 217600).
- b. Zona subapical donde predominan las dictiosomas y vesículas de Golgi. Se observa también cisternas del retículo, mitocondrias, lípidos, plastos. La pared formada dos capas (x 12400).
- c. Zona subapical donde predominan las mitocondrias (x 15500).
- d. Zona subapical donde predominan cisternas del retículo endoplasmático y cuerpos lipídicos (x.17000).

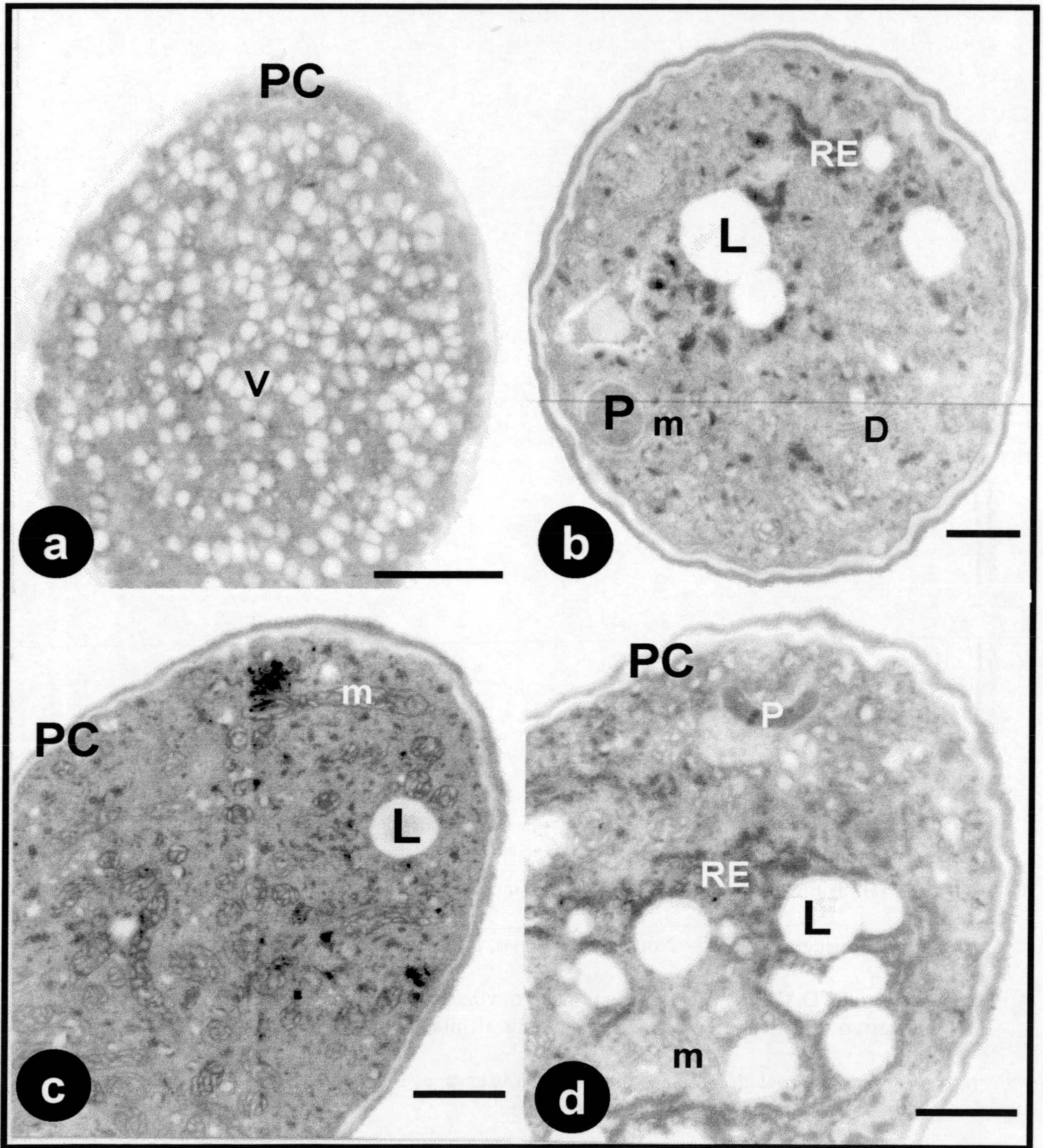


Figura 9

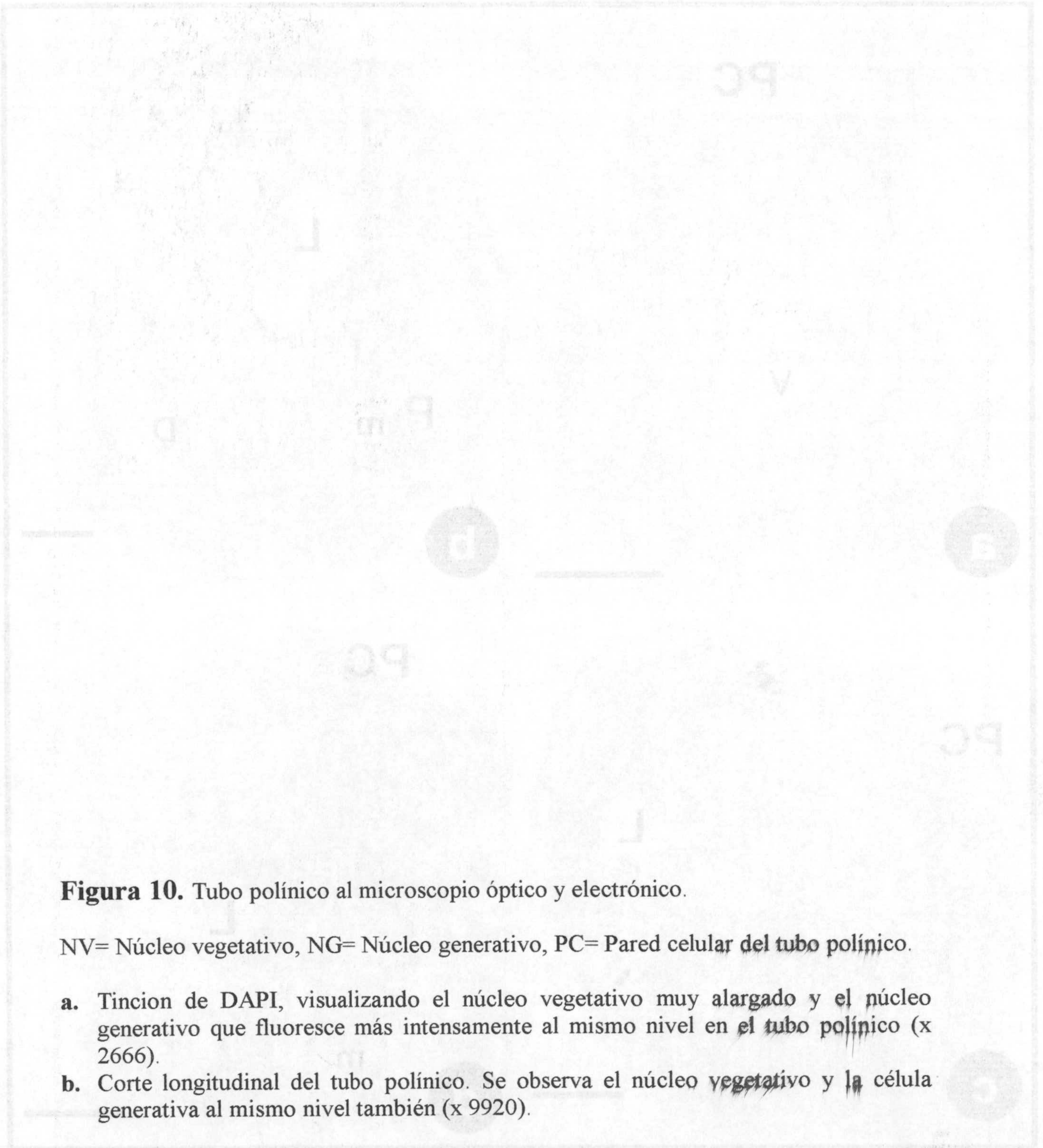


Figura 10. Tubo polínico al microscopio óptico y electrónico.

NV= Núcleo vegetativo, NG= Núcleo generativo, PC= Pared celular del tubo polínico.

- a. Tinción de DAPI, visualizando el núcleo vegetativo muy alargado y el núcleo generativo que fluoresce más intensamente al mismo nivel en el tubo polínico (x 2666).
- b. Corte longitudinal del tubo polínico. Se observa el núcleo vegetativo y la célula generativa al mismo nivel también (x 9920).

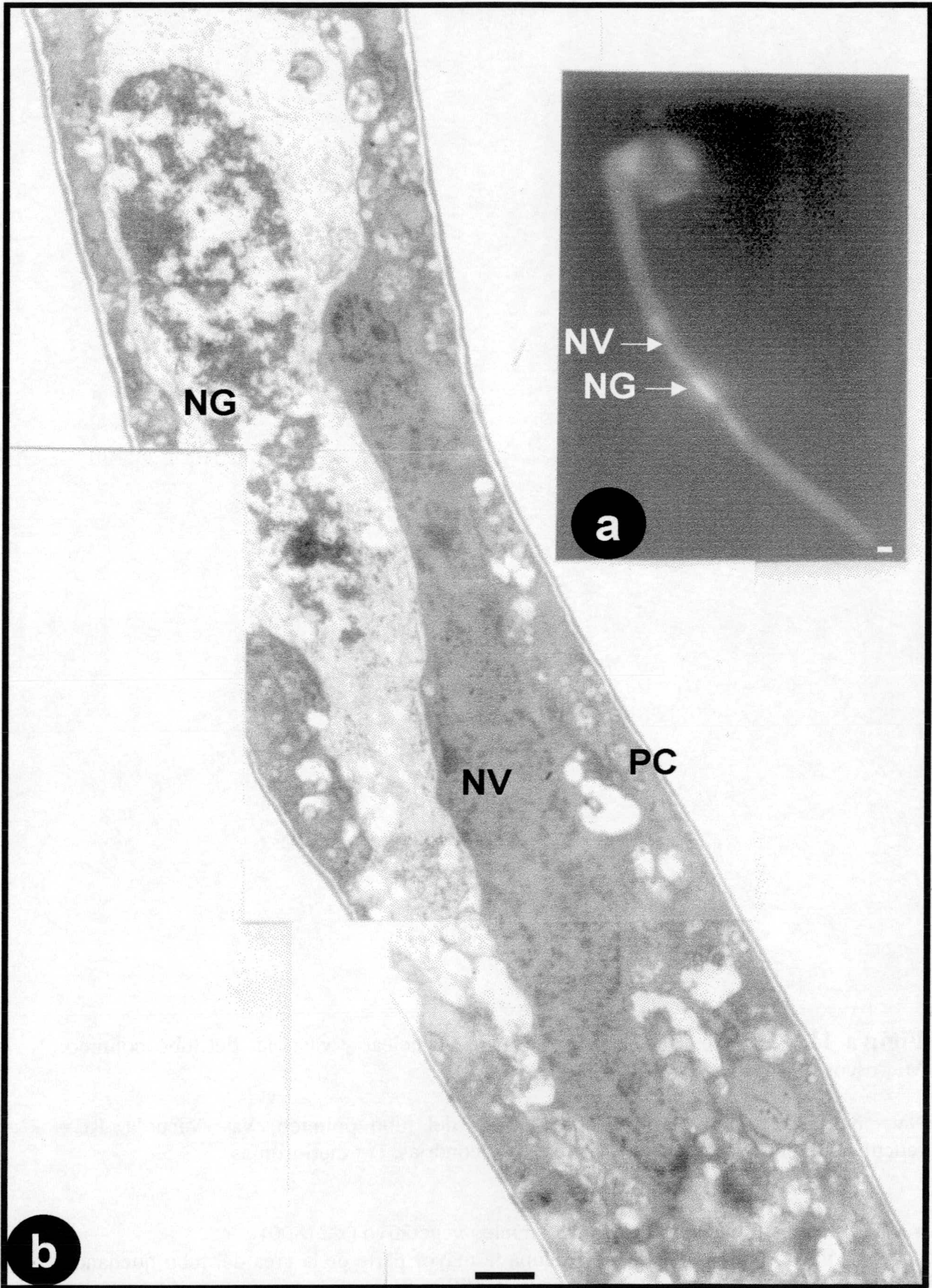


Figura 10

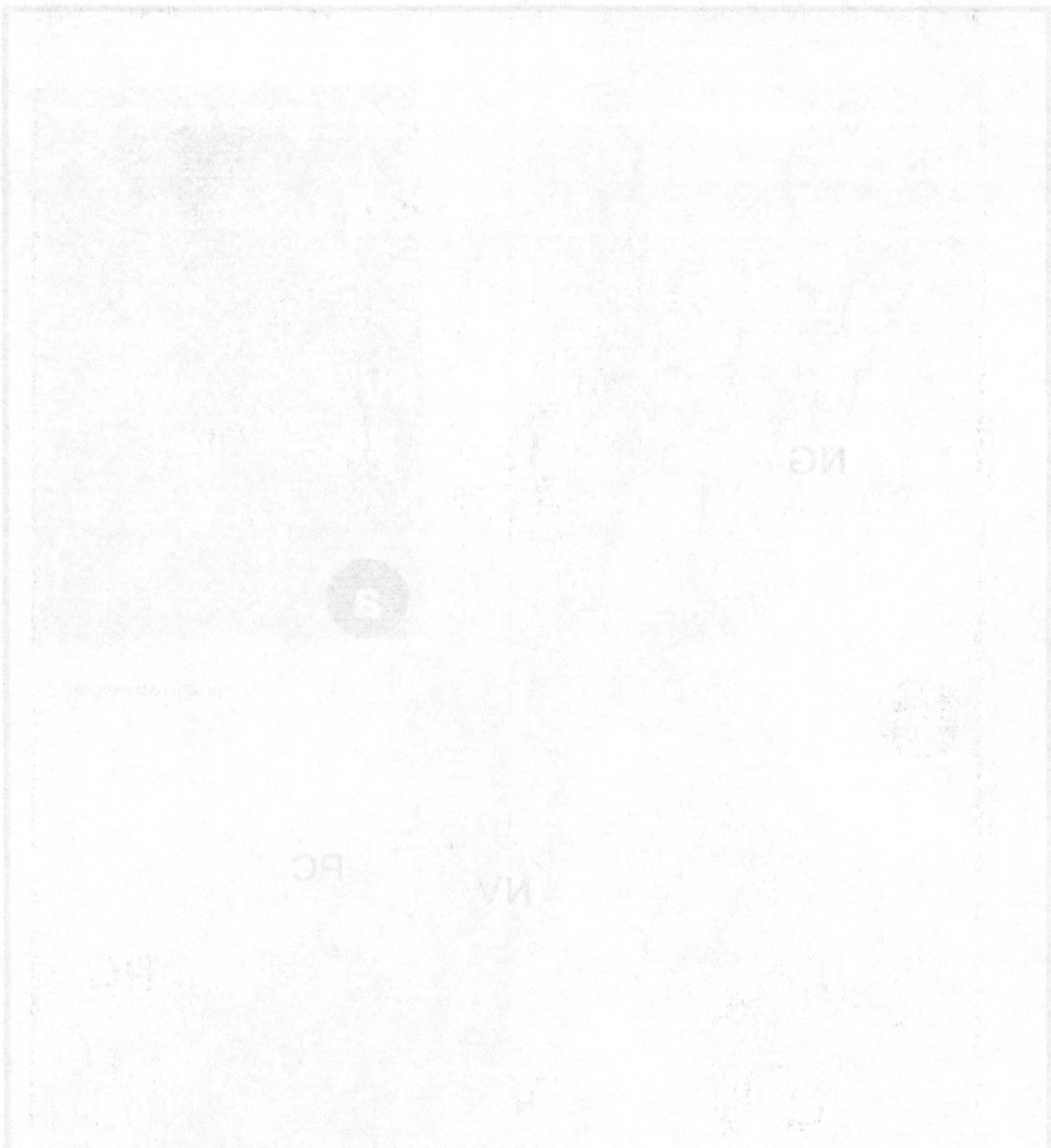


Figura 11. Secciones transversales de la zona nuclear y vacuolar del tubo polínico. Microscopía electrónica.

NV= Núcleo vegetativo, PC= Pared celular del tubo polínico, Va= Vacuola, RE= retículo endoplasmático, L= lípidos, m= Mitocondrias, D= dictiosomas.

- a. Zona nuclear donde este presente el núcleo vegetativo (x 21800).
- b. Zona vacuolar donde la vacuola ocupa la mayor parte de la área del tubo quedando el citoplasma reducido a la periferia (x 24500).

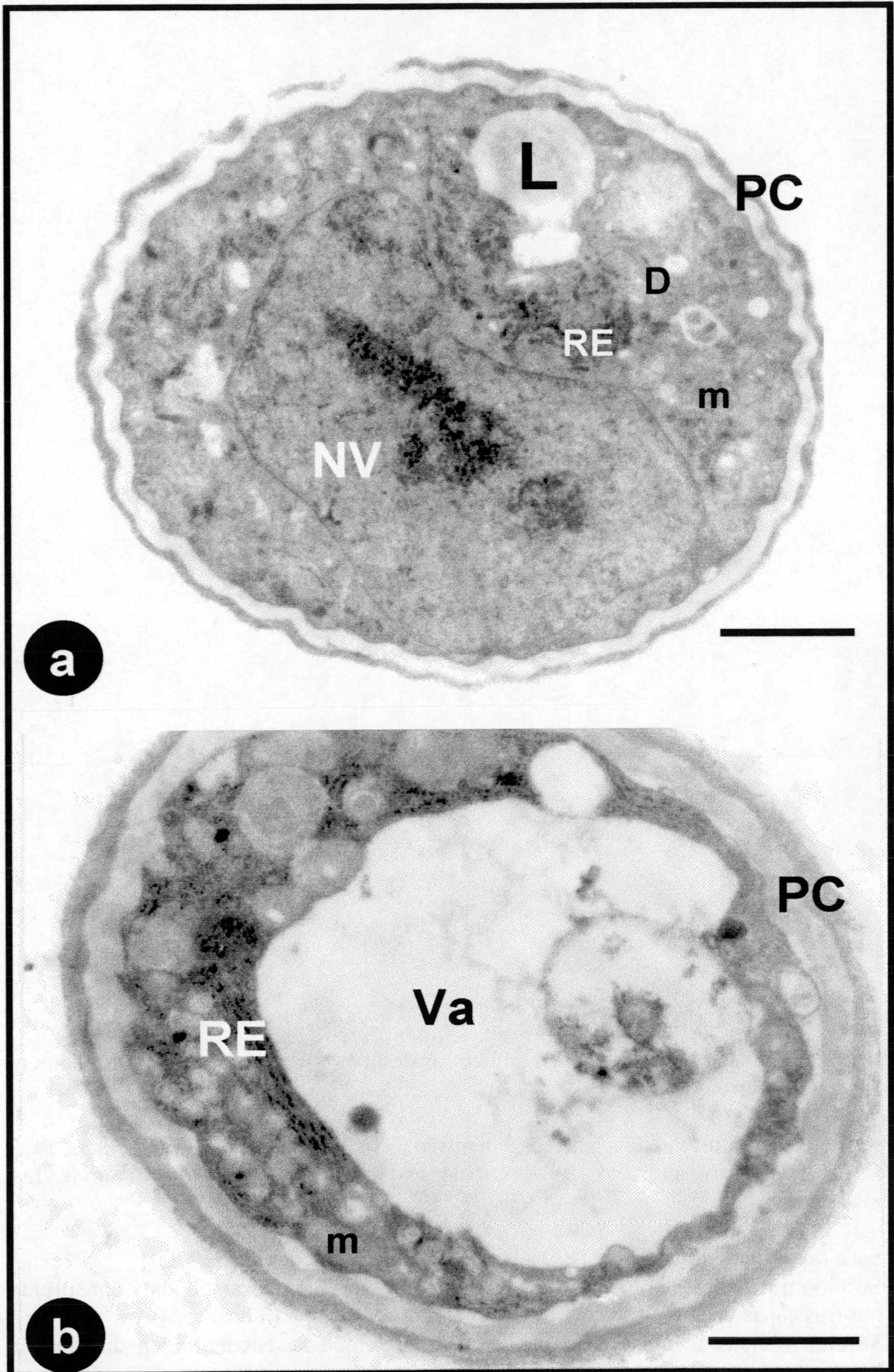


Figura 11

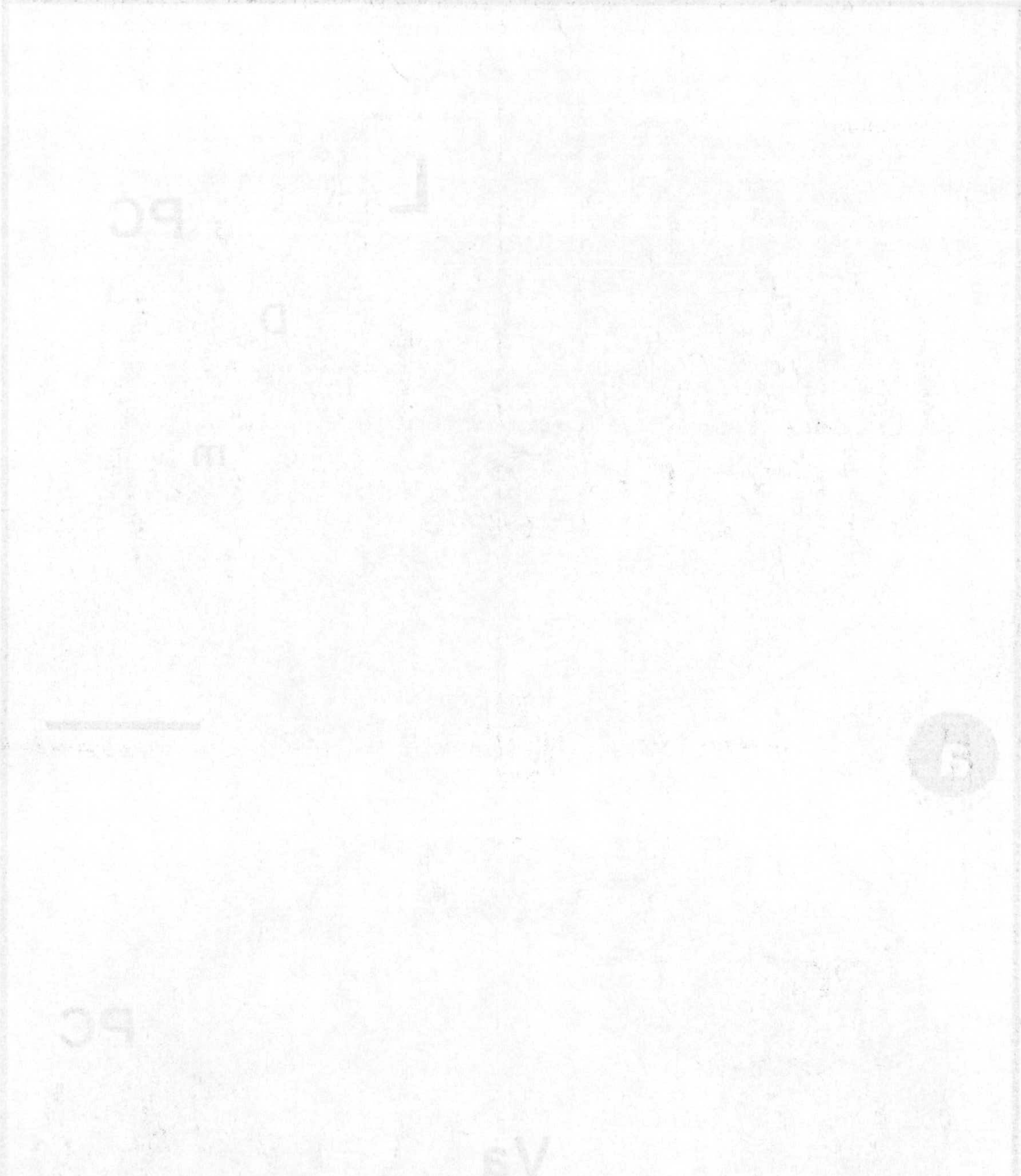


Figura 12. Secciones del tubo polínico a después de 8 horas de germinación. Microscopía electrónica.

NV= Núcleo vegetativo, NG= Núcleo generativo, Va= Vacuola, Cr= Cromosomas, PC= Pared celular del tubo polínico, RE= retículo endoplasmático, m= Mitocondrias, D= dictiosomas.

- a. Sección oblicua donde se visualiza la zona nuclear y vacuolar (x 19000).
- b. Sección transversal del tubo destaca la pared del tubo bien desarrollada y constituida por tres capas diferenciadas estructuralmente (flechas) (x 13760).
- c. Sección oblicua a nivel de la célula generativa que se encuentra en división (x 8600).

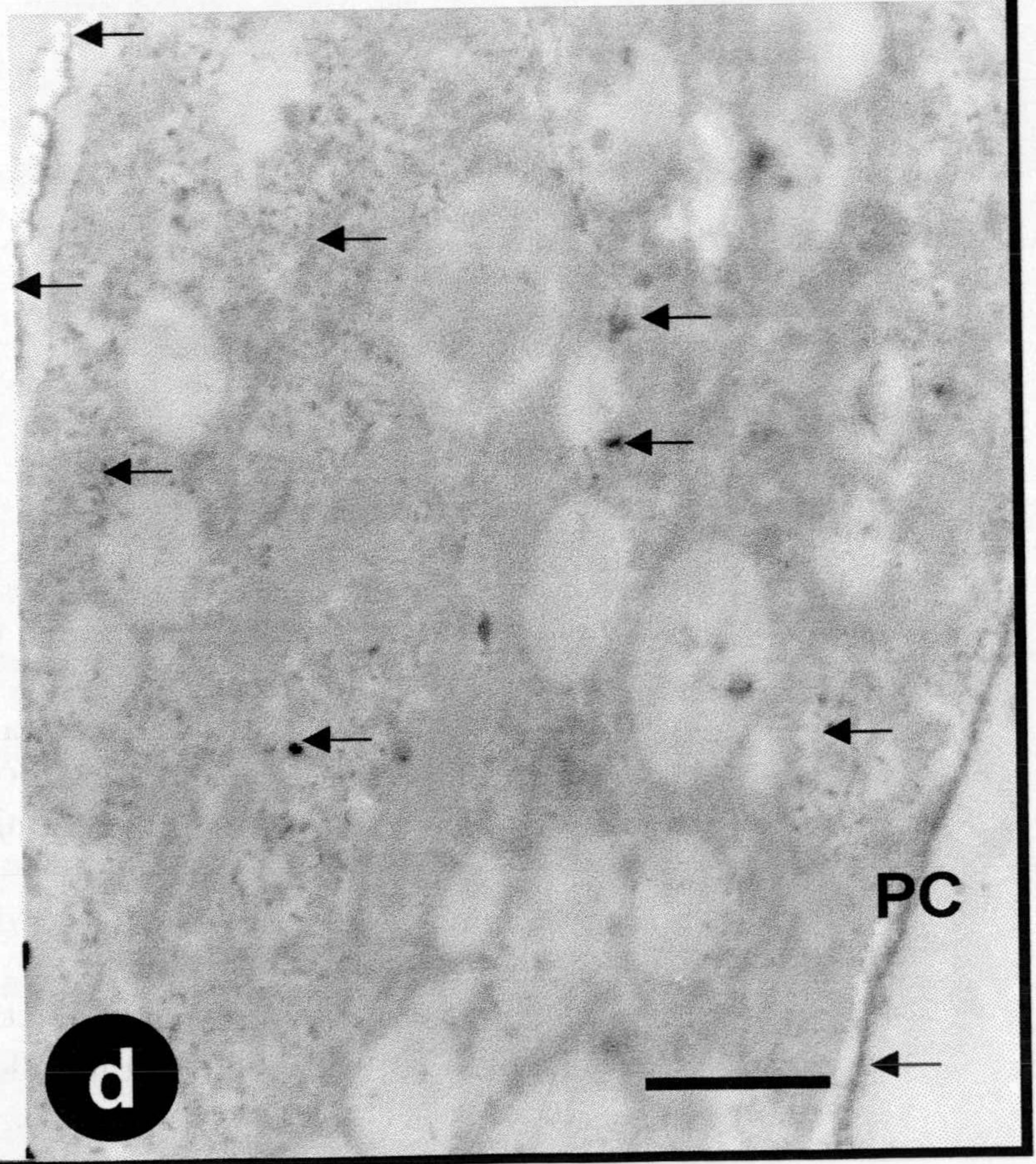
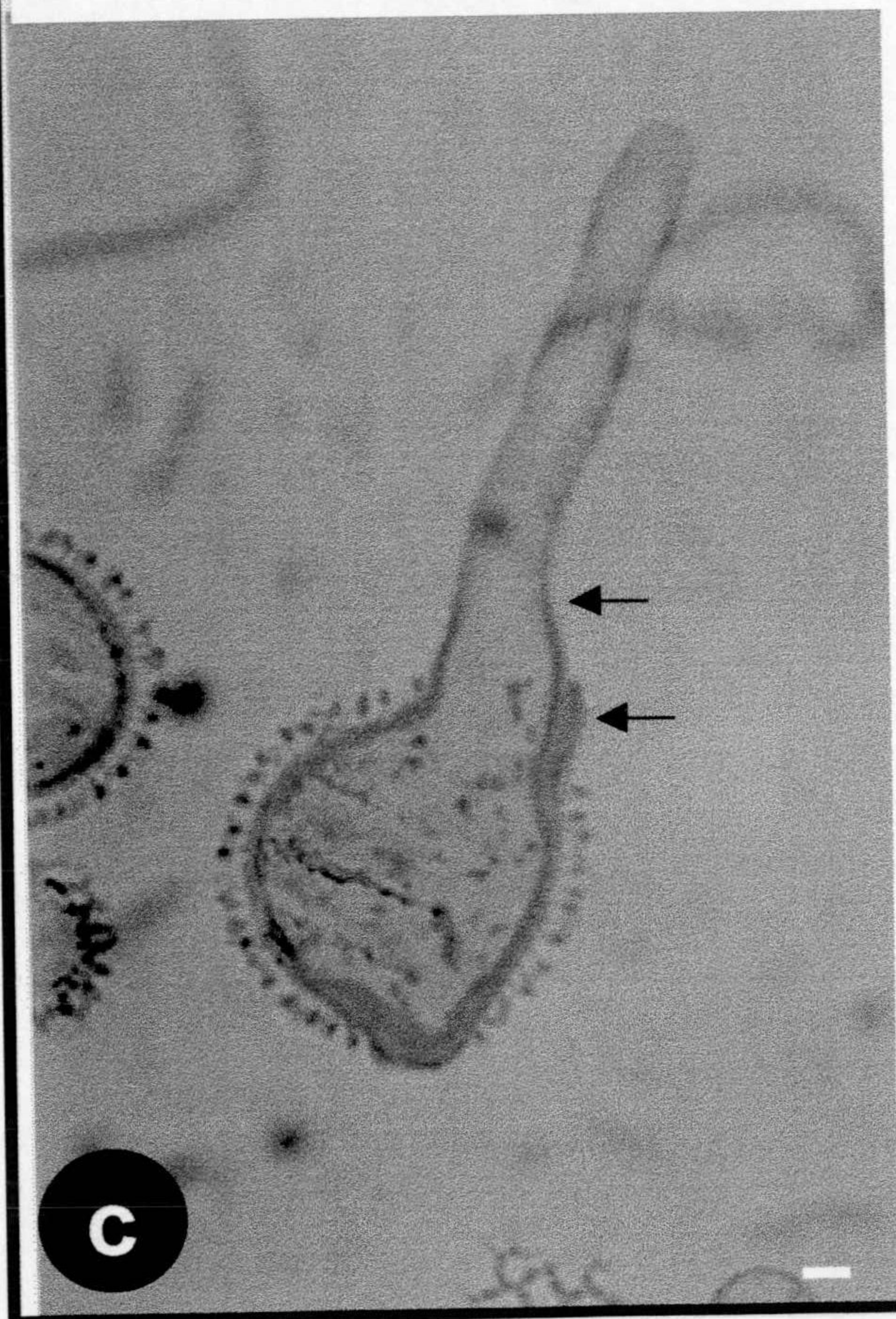
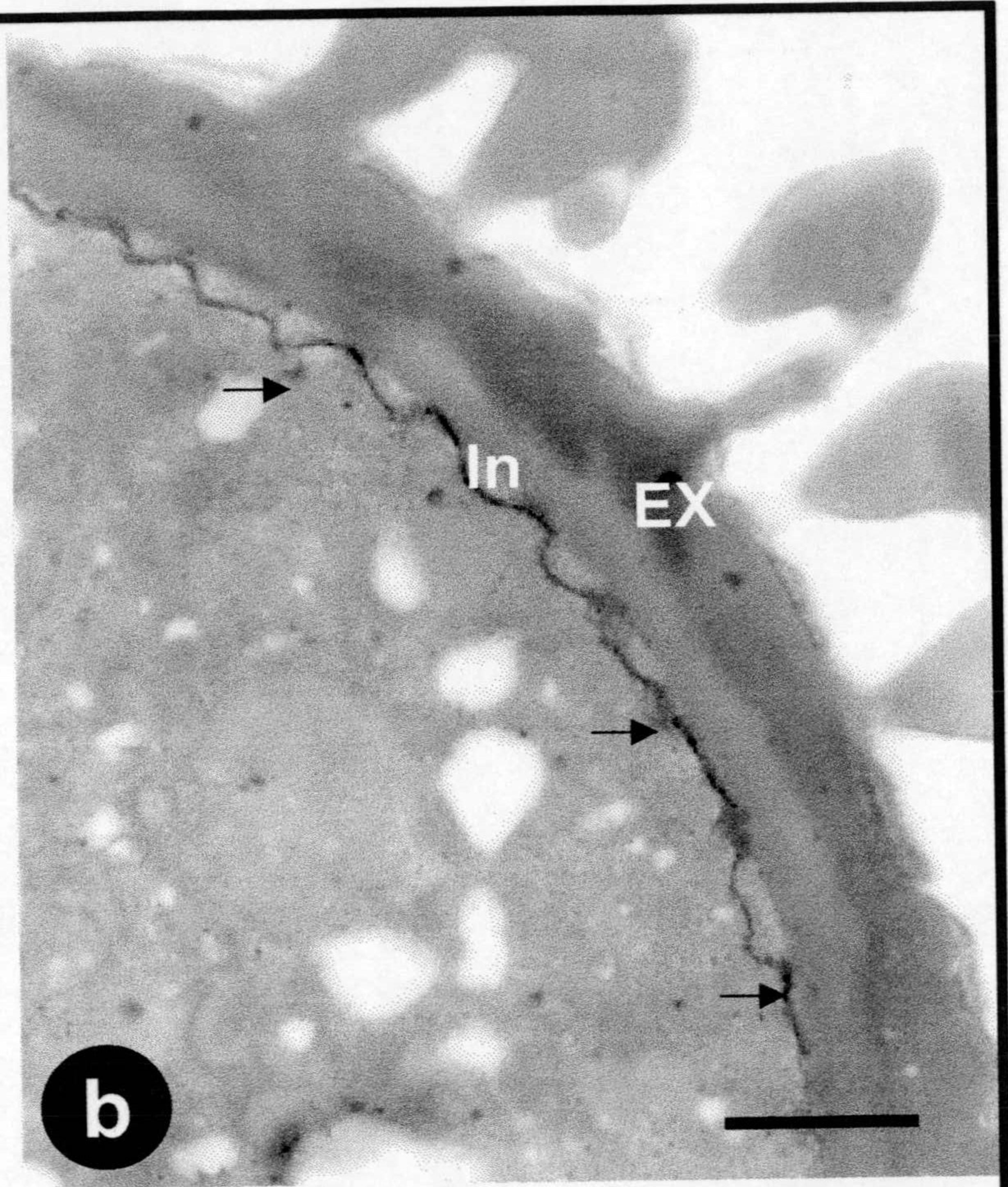
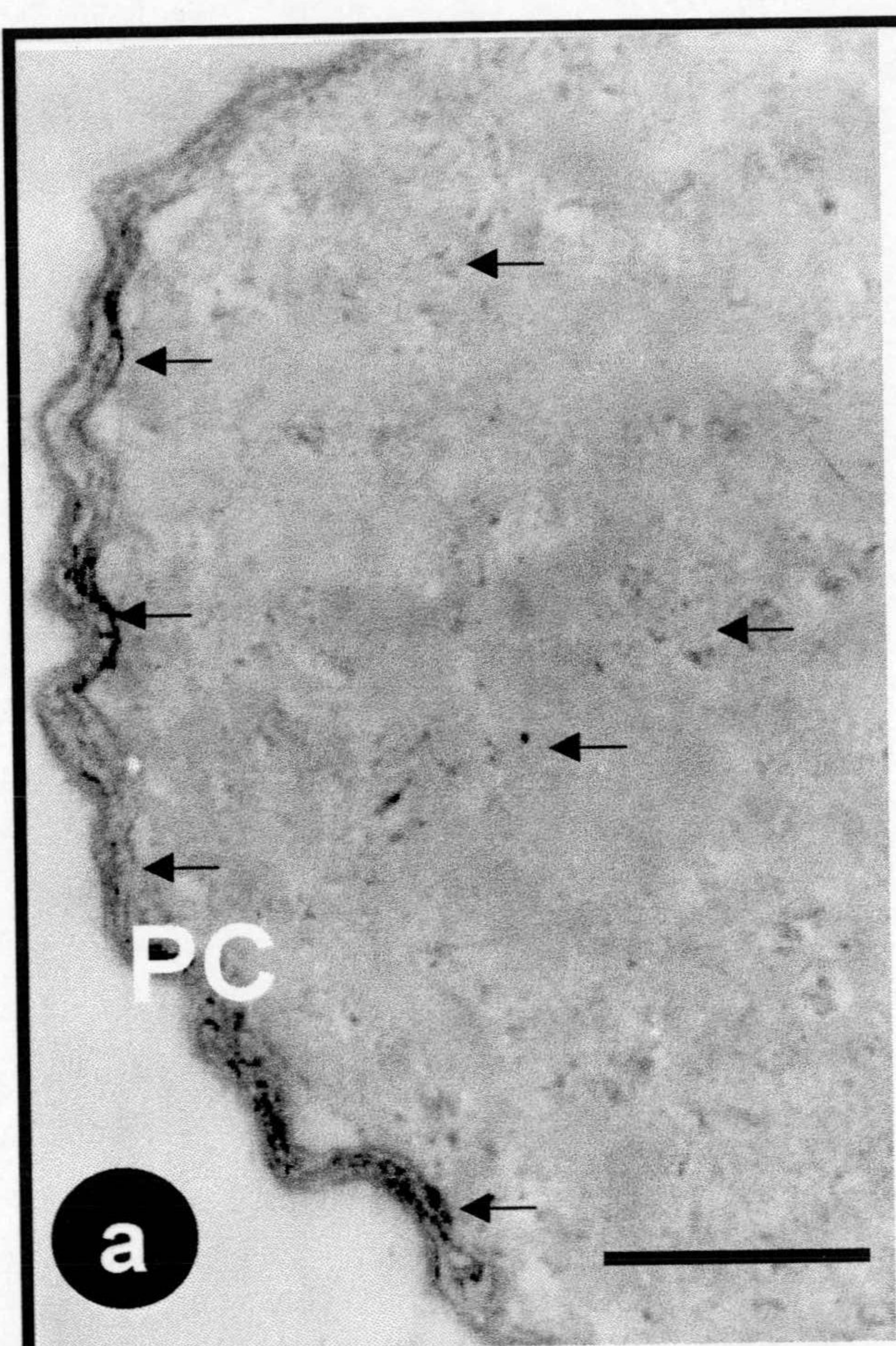


Figura 13

Figura 14. Localización de calosa. Microscopía óptica y electrónica.

P= Polen, T= Tubo polínico, PC= Pared celular del tubo polínico.

a. y b Tinción de azul anilina. Fluorescencia de la pared de calosa a lo largo del tubo polínico (flecha), así como la formación de tapones o engrosamiento dentro del tubo polínico (doble flechas) después de 8 h de germinación (x 2666) (x 1333).

c. Inmunofluorescencia de calosa a lo largo de la pared del tubo (flechas) y los engrosamiento (dobles flechas) (x 2666).

d y e. Inmunolocalización a microscopía electrónica de la calosa a nivel del tubo mostrando el marcado a nivel de la capa interna de la pared (flechas) (x 13280), (x 9920).

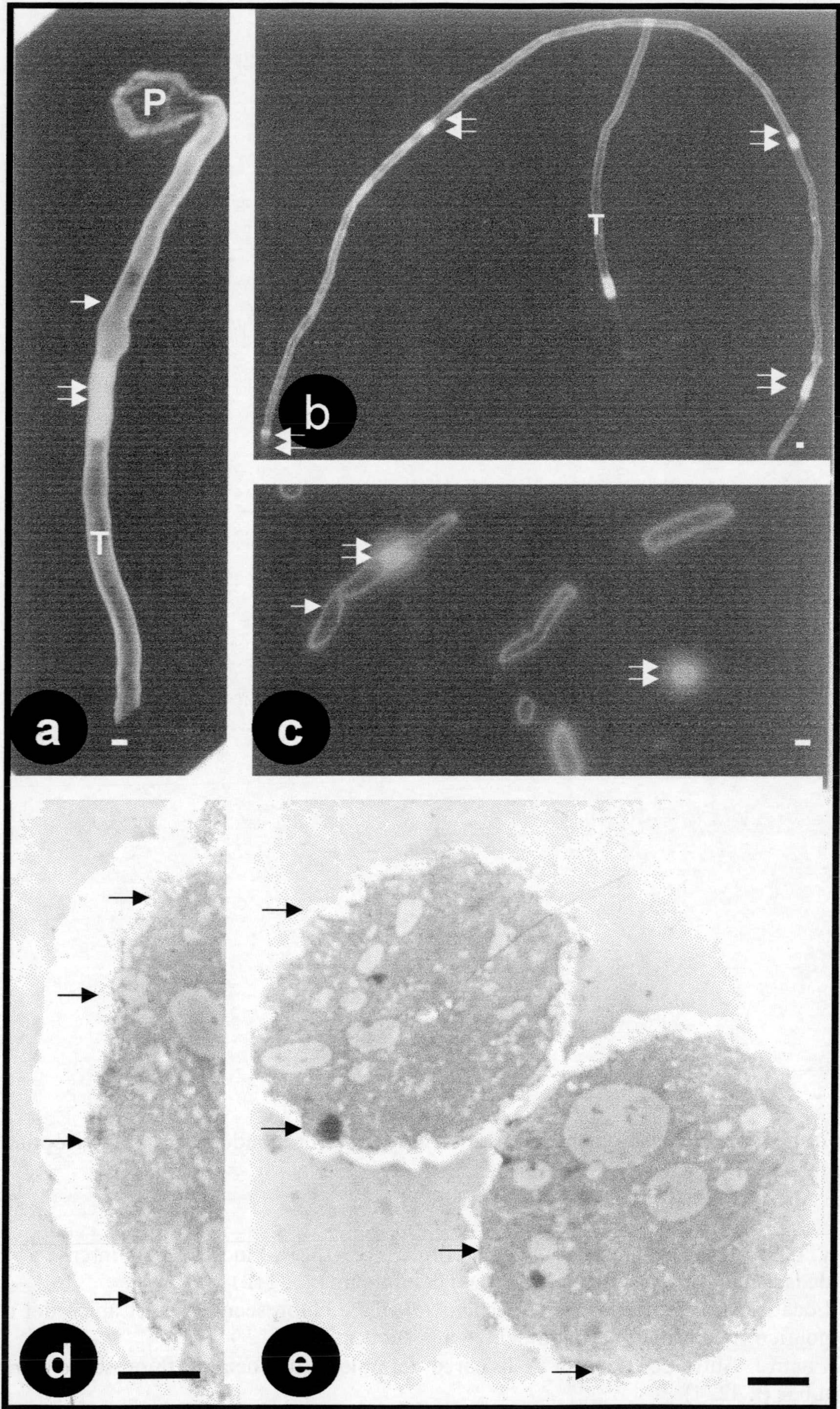


Figura 14

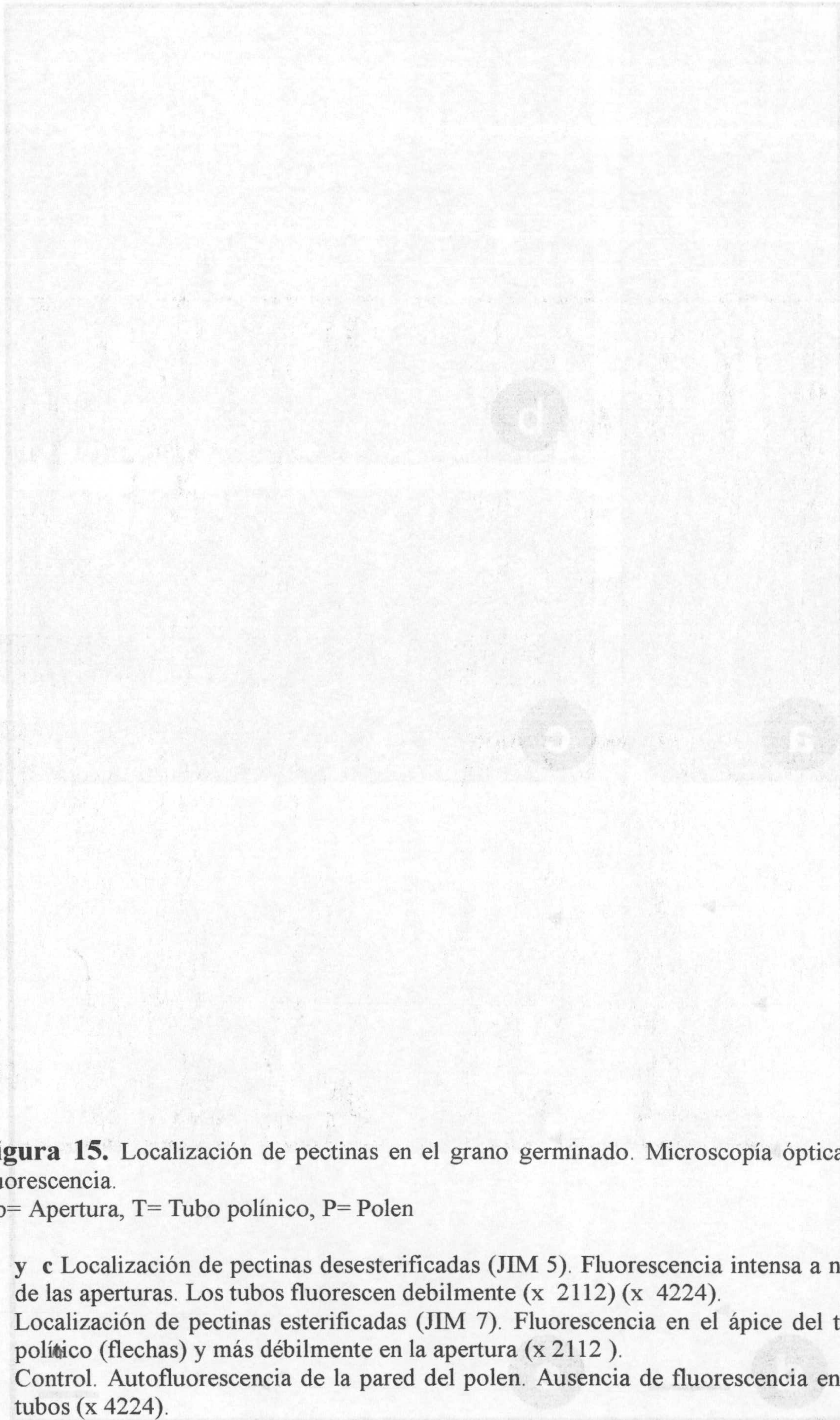


Figura 15. Localización de pectinas en el grano germinado. Microscopía óptica de fluorescencia.

Ap= Apertura, T= Tubo polínico, P= Polen

- a. y c Localización de pectinas desesterificadas (JIM 5). Fluorescencia intensa a nivel de las aperturas. Los tubos fluorescen debilmente (x 2112) (x 4224).
- b. Localización de pectinas esterificadas (JIM 7). Fluorescencia en el ápice del tubo polínico (flechas) y más débilmente en la apertura (x 2112).
- d. Control. Autofluorescencia de la pared del polen. Ausencia de fluorescencia en los tubos (x 4224).

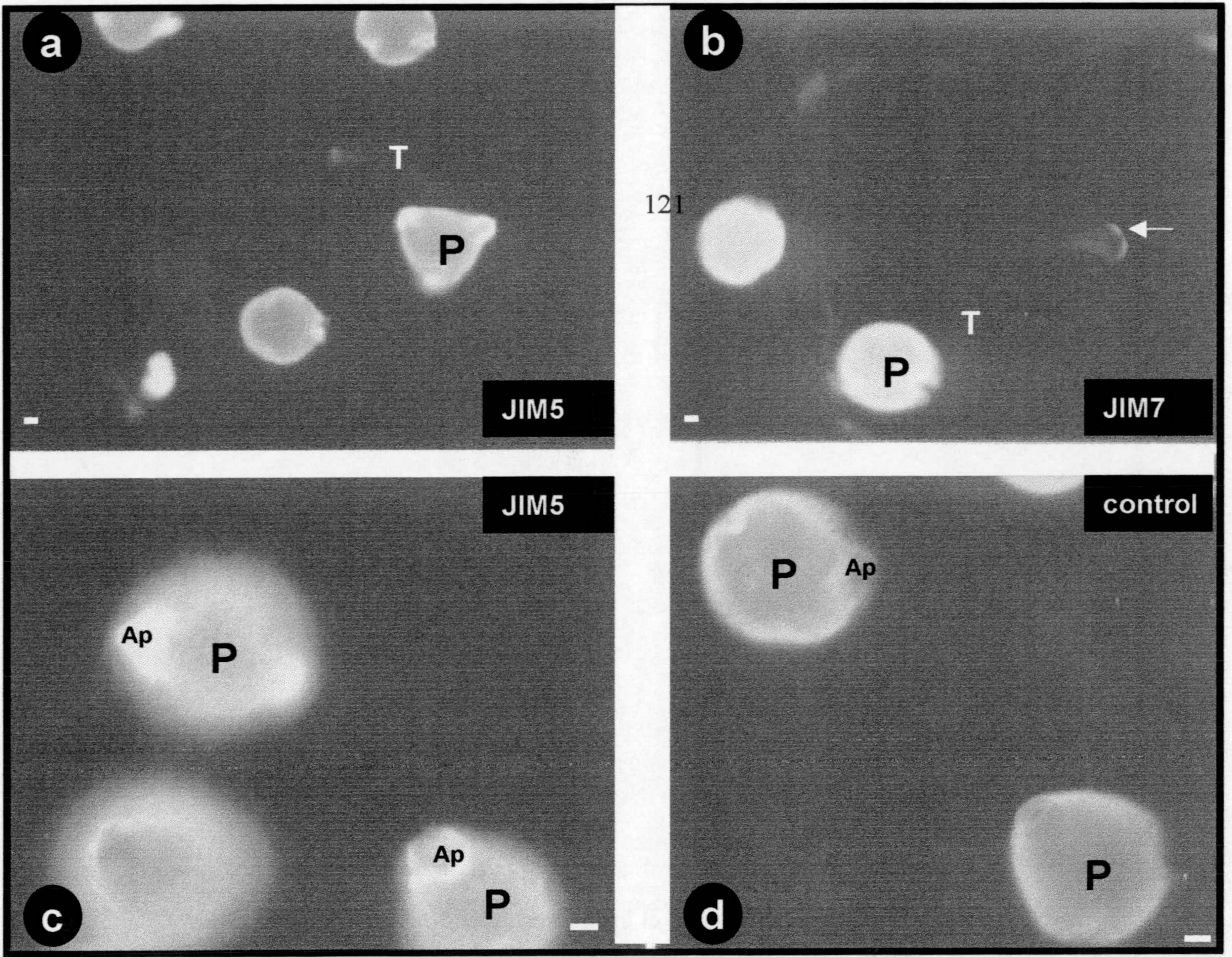


Figura 15

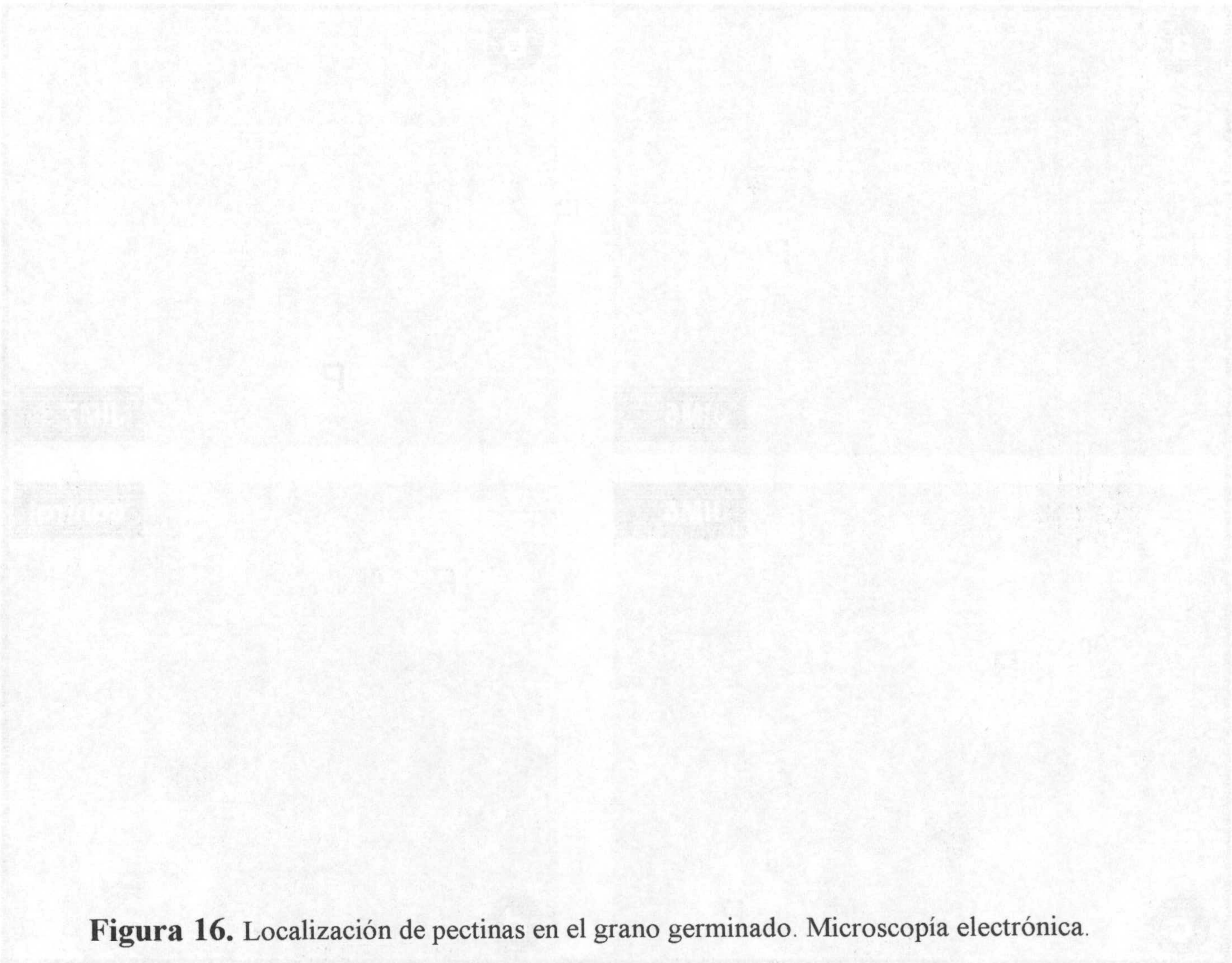


Figura 16. Localización de pectinas en el grano germinado. Microscopía electrónica.

Ap= Apertura, E= Exina, In= Intina, T= Tubo polínico, PC= Pared celular del tubo polínico

- a. Localización de pectinas esterificadas. Intenso marcado en la intina y más débilmente en la capa externa de la pared del tubo (x 10100).
- b. Localización de pectinas desesterificadas a nivel de la intina no apertural, en las que se localizan de manera específica gran cantidad de partículas de oro (x 24648).
- c. Localización de pectinas desesterificadas a nivel de la apertura, en las que se localizan de manera específica gran cantidad de partículas de oro (x 23680)

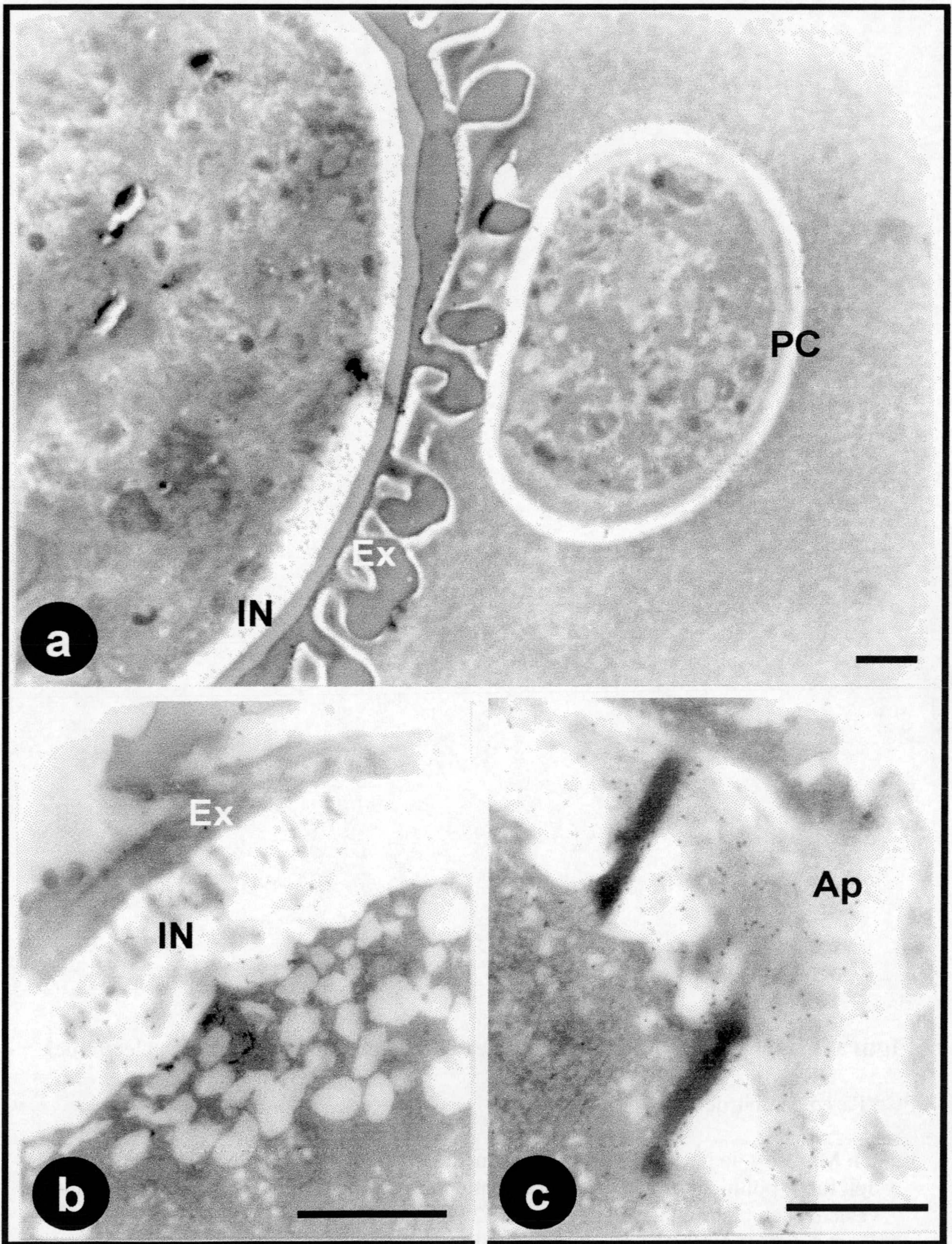


Figura 16

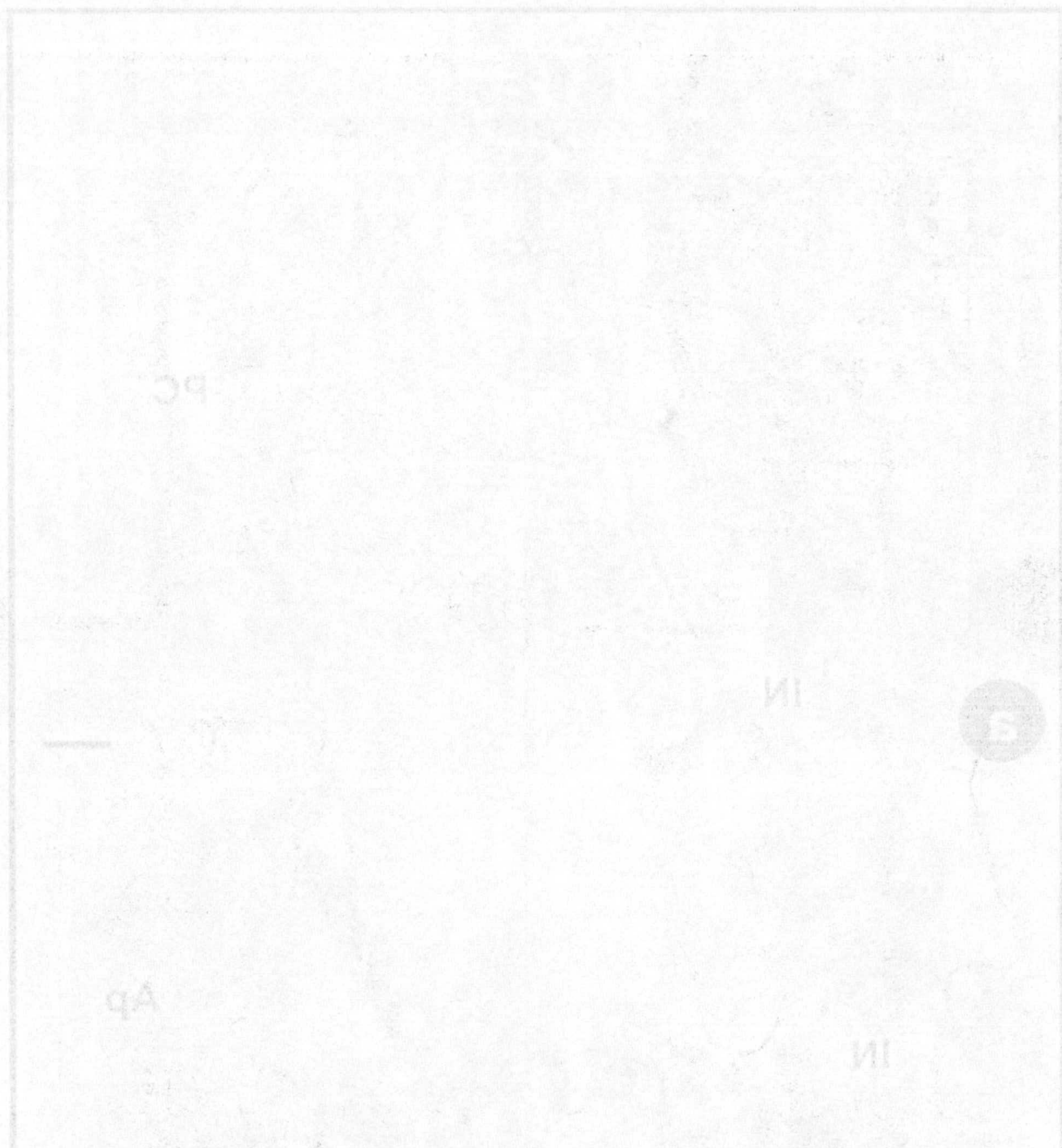


Figura 17. Inmunolocalización pectinas en el tubo polínico. Microscopía electrónica.

PC= Pared celular del tubo polínico.

- a. y b** Marcado de pectinas esterificadas mediante el anticuerpo JIM 7 a nivel del ápice del tubo polínico donde da claramente tanto a nivel de la pared como de las vesículas en el citoplasma (flechas) (x 28400), b (x 17500).
- c. y d** Marcado de pectinas desesterificadas mediante el anticuerpo JIM 5. Las partículas de oro se localizan en elevado número en la superficie externa de la pared del tubo polínico alejado del ápice (dobles flechas) (x 14750) (x 8900).

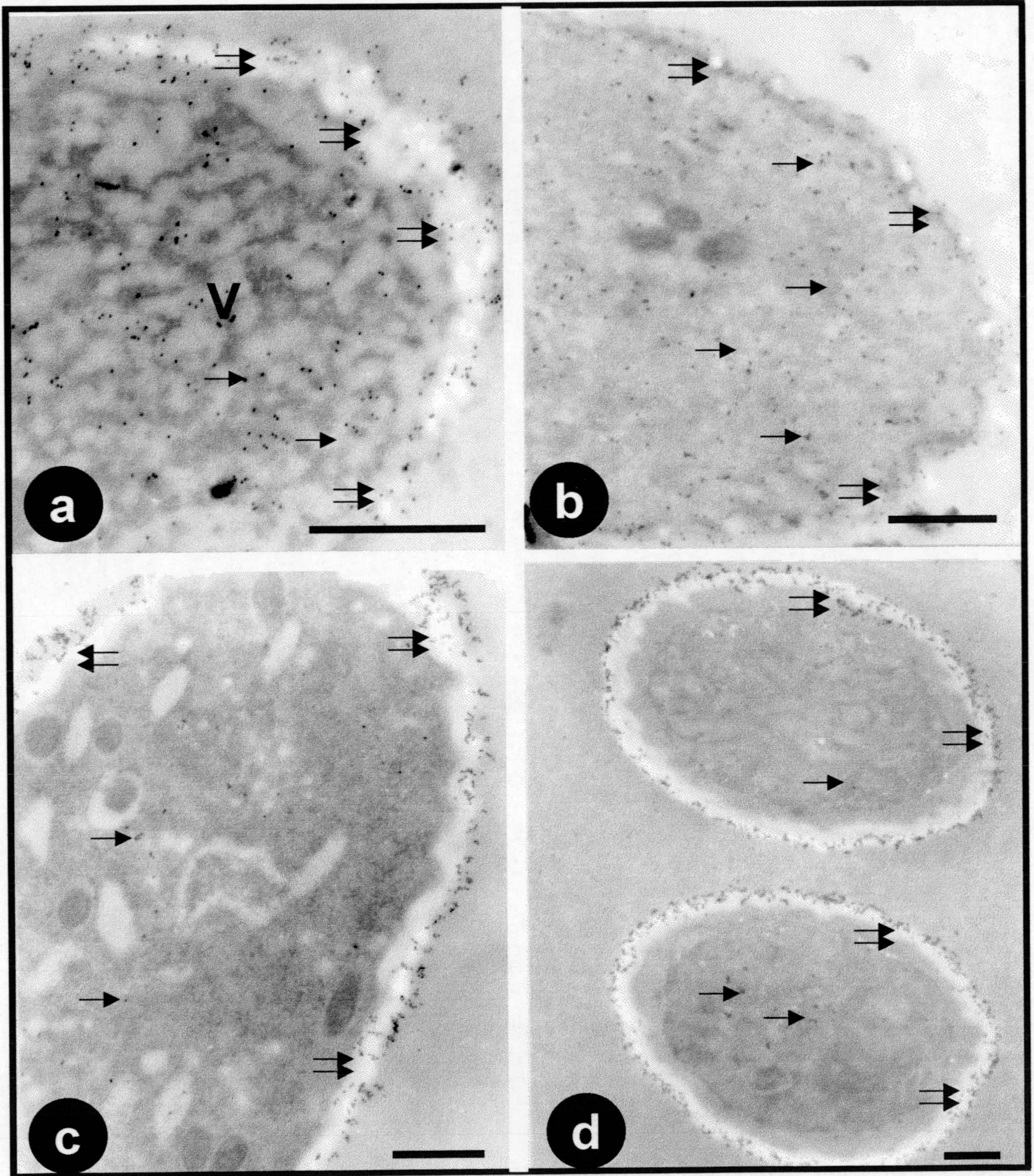


Figura 17

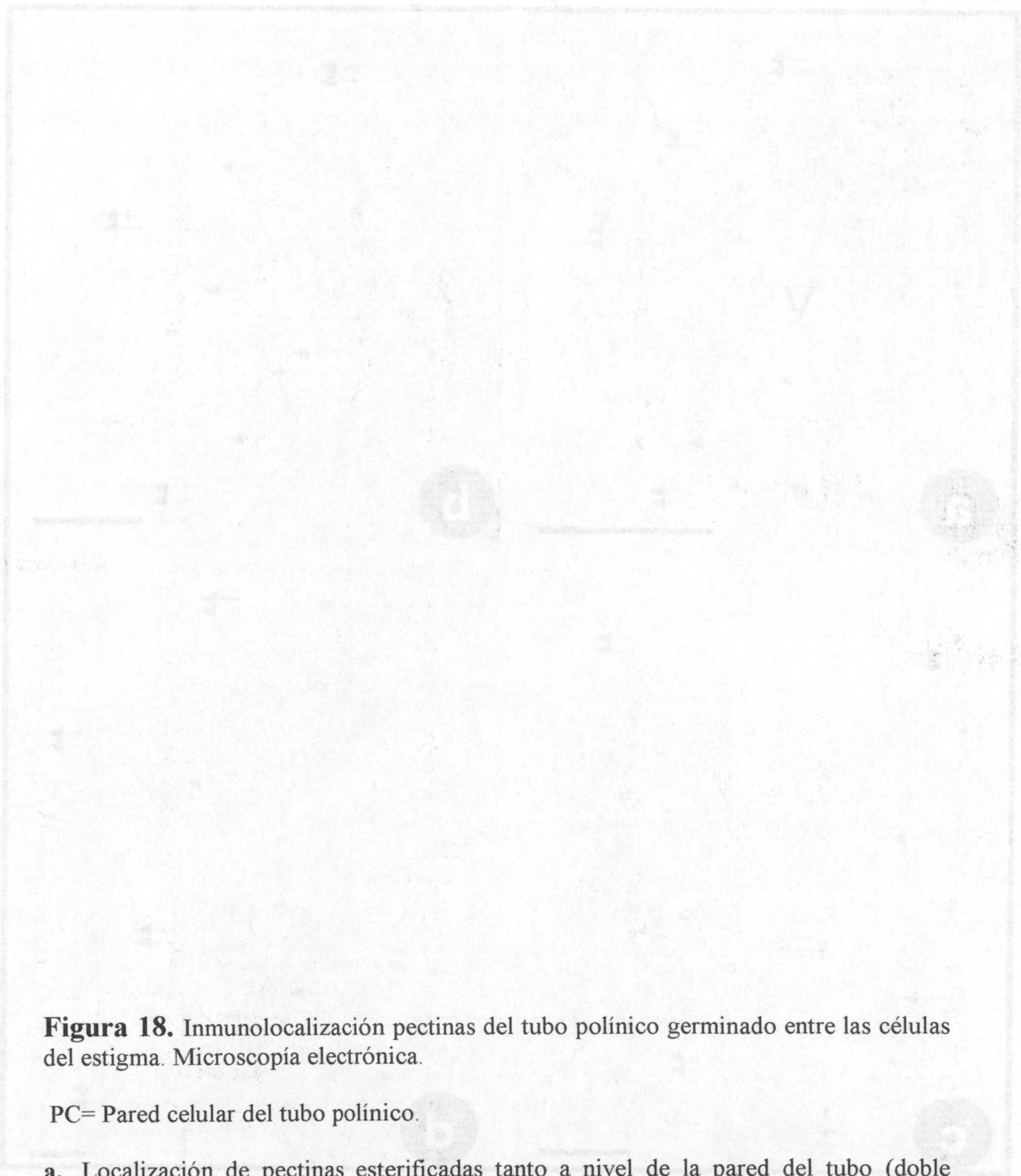


Figura 18. Inmunolocalización pectinas del tubo polínico germinado entre las células del estigma. Microscopía electrónica.

PC= Pared celular del tubo polínico.

- a. Localización de pectinas esterificadas tanto a nivel de la pared del tubo (doble flechas) como en las vesículas de dentro del tubo (flechas) (x 17800).
- b. Localización de pectinas desesterificada en la pared del tubo (flechas) (x 4240).

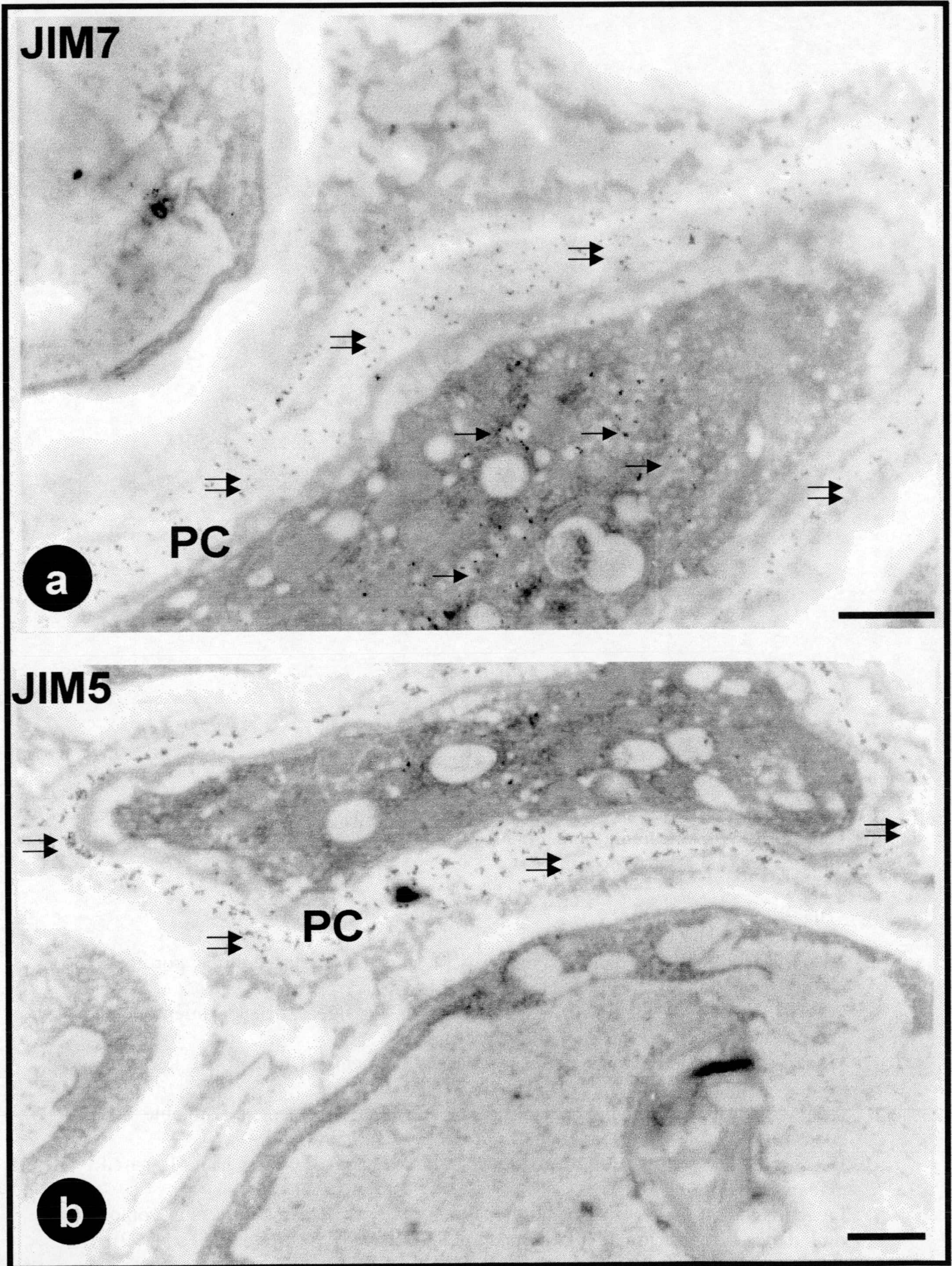


Figura 18

Figura 19. Localización de lípidos en el del grano de polen a distintos tiempos de la germinación *in vitro* mediante Sudan black B. Los cuerpos lipídicos se observan como corpúsculos negros. Microscopía óptica.

Ap= Apertura

- a. Polen libre, donde los cuerpos lipídicos se encuentran distribuidos por todo el citoplasma (x 4199).
- b. Después de 30 min de incubación, se observa un ligero desplazamiento de los cuerpos lipídicos hacia la pared del grano (x 4199).
- c. Después de 1 h de incubación, se observa que aumenta el número de los cuerpos lipídicos en una zona lateral del grano (x 4199).
- d. Después de 1 h y 30 min de incubación, hay una aglomeración notable de los cuerpos lipídicos en la cercanía de una apertura germinal (x 4199).
- e. Después de 2 h y 30min, la polarización de los cuerpos lipídicos hacia la pared es evidente (x 2666).
- f. La acumulación de los cuerpos lipídicos tanto en el citoplasma del grano como del tubo indica la migración de los cuerpos lipídicos hacia el tubo polínico (x 4199).

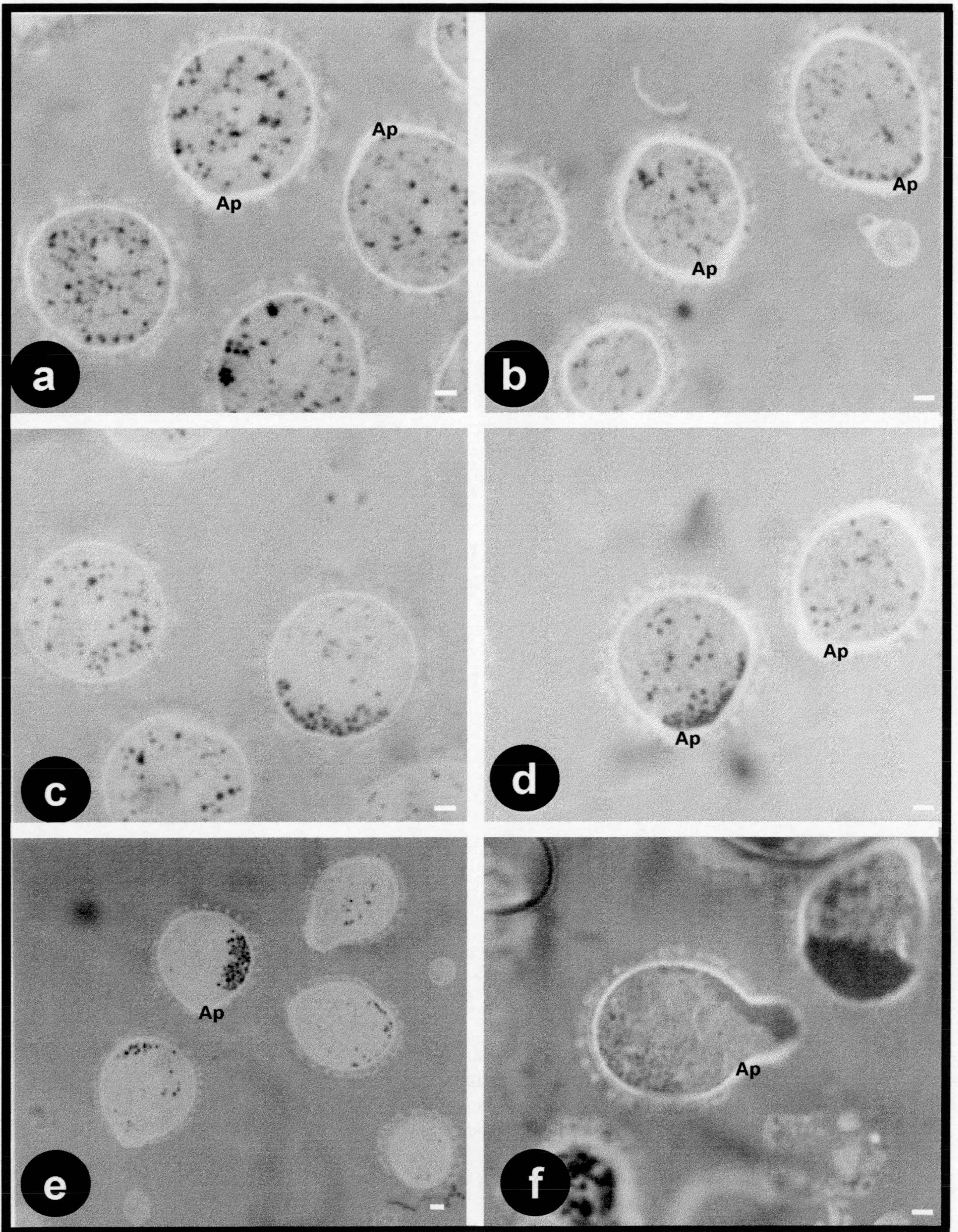


Figura 19

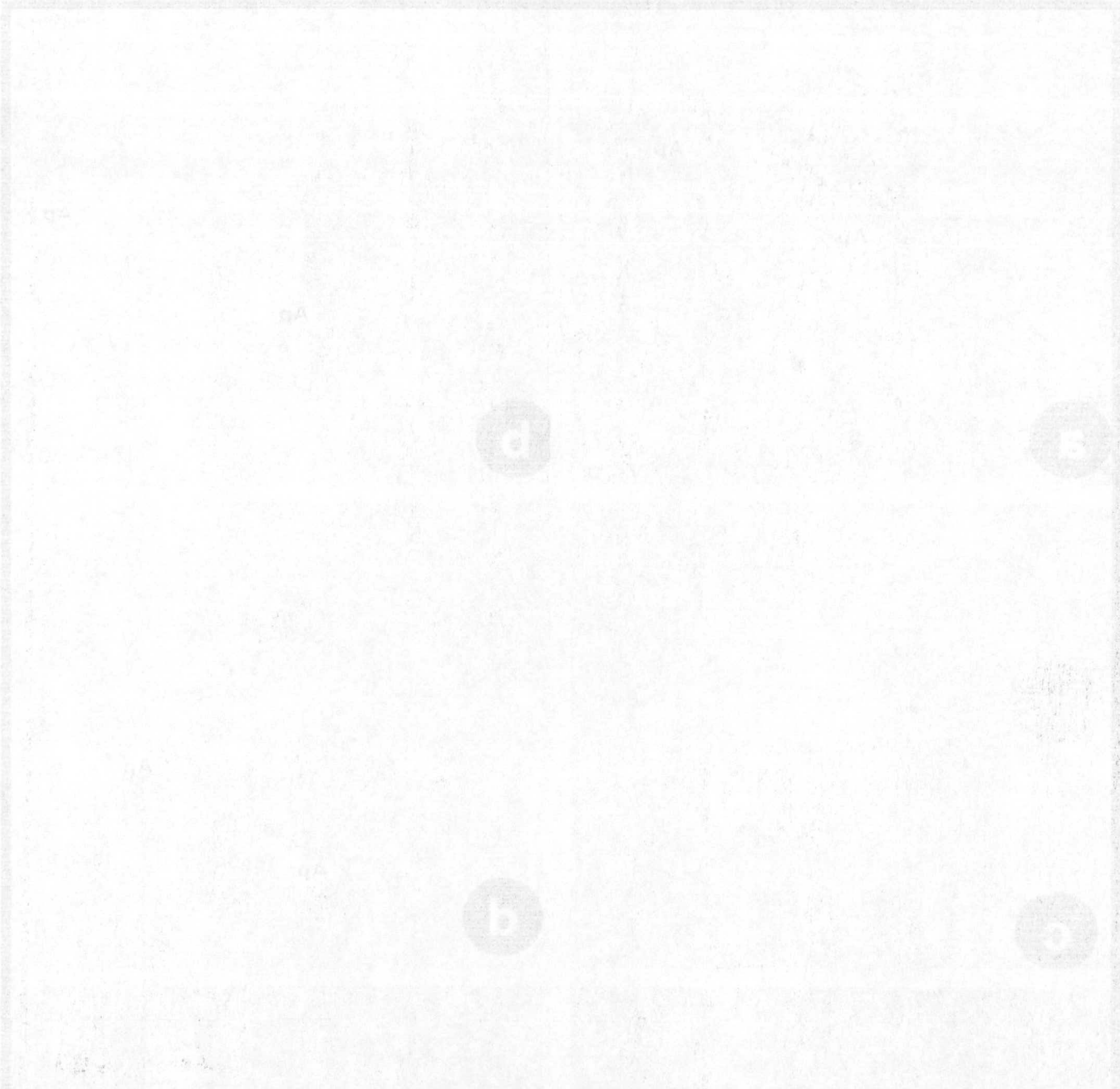


Figura 20. Polarización celular a nivel del grano. Microscopía electrónica.

L= Lípidos, V= vesículas, m= mitocondrias, NG= Núcleo generativo, Ap= Apertura.

- a. Vista general del grano de polen mostrando una marcada polarización: cuerpos lipídicos acumulados en la apertura germinativa y concentración de vesículas en el extremo opuesto. La célula generativa es central. (x 4000).
- b. Zona apertural donde se observa la acumulación y polarización de los cuerpos lipídicos (x 10400).
- c. Polo opuesto donde dominan orgánulos citoplasmicos, vesículas y mitocondrias (x 106400).

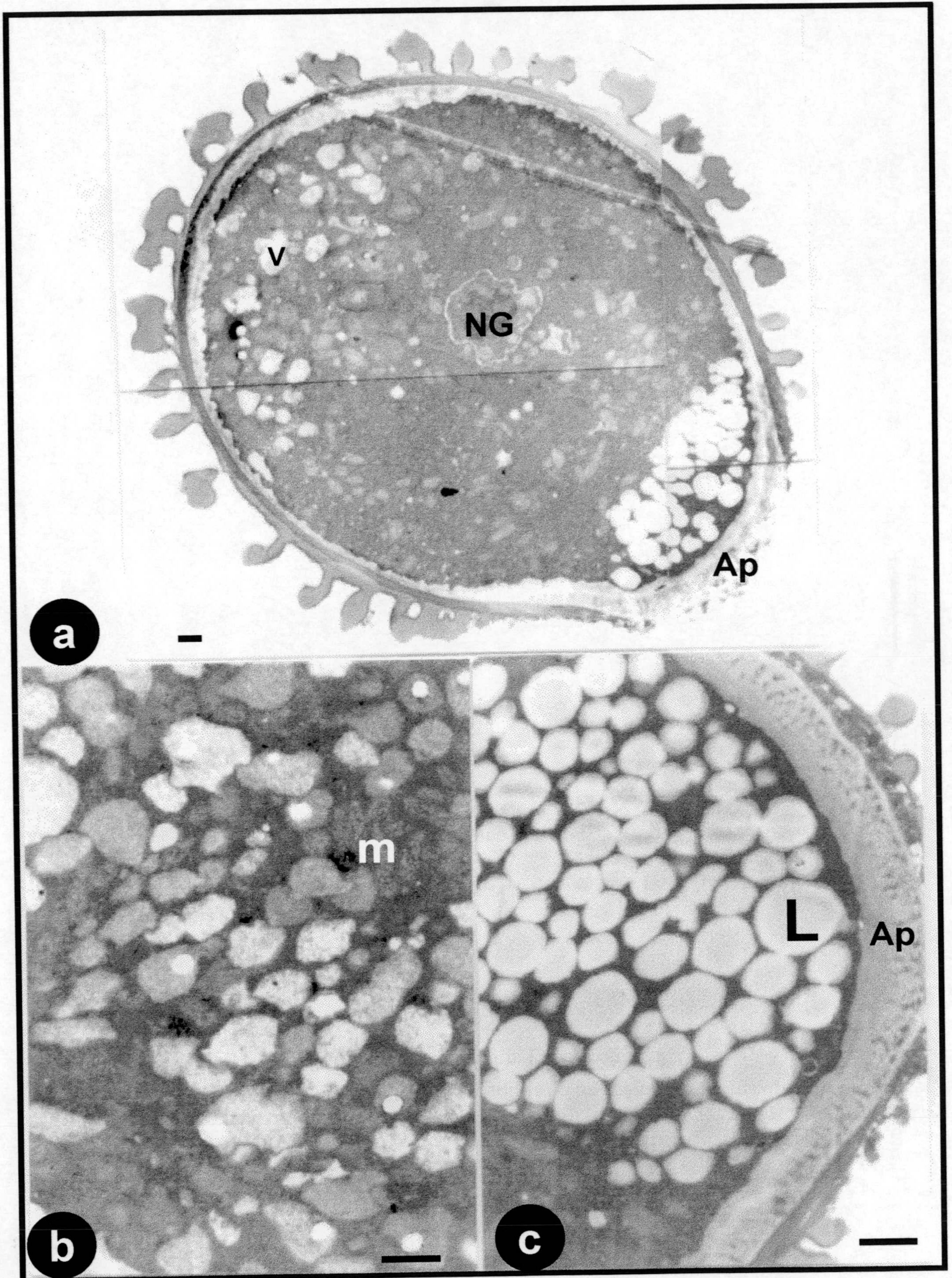


Figura 20

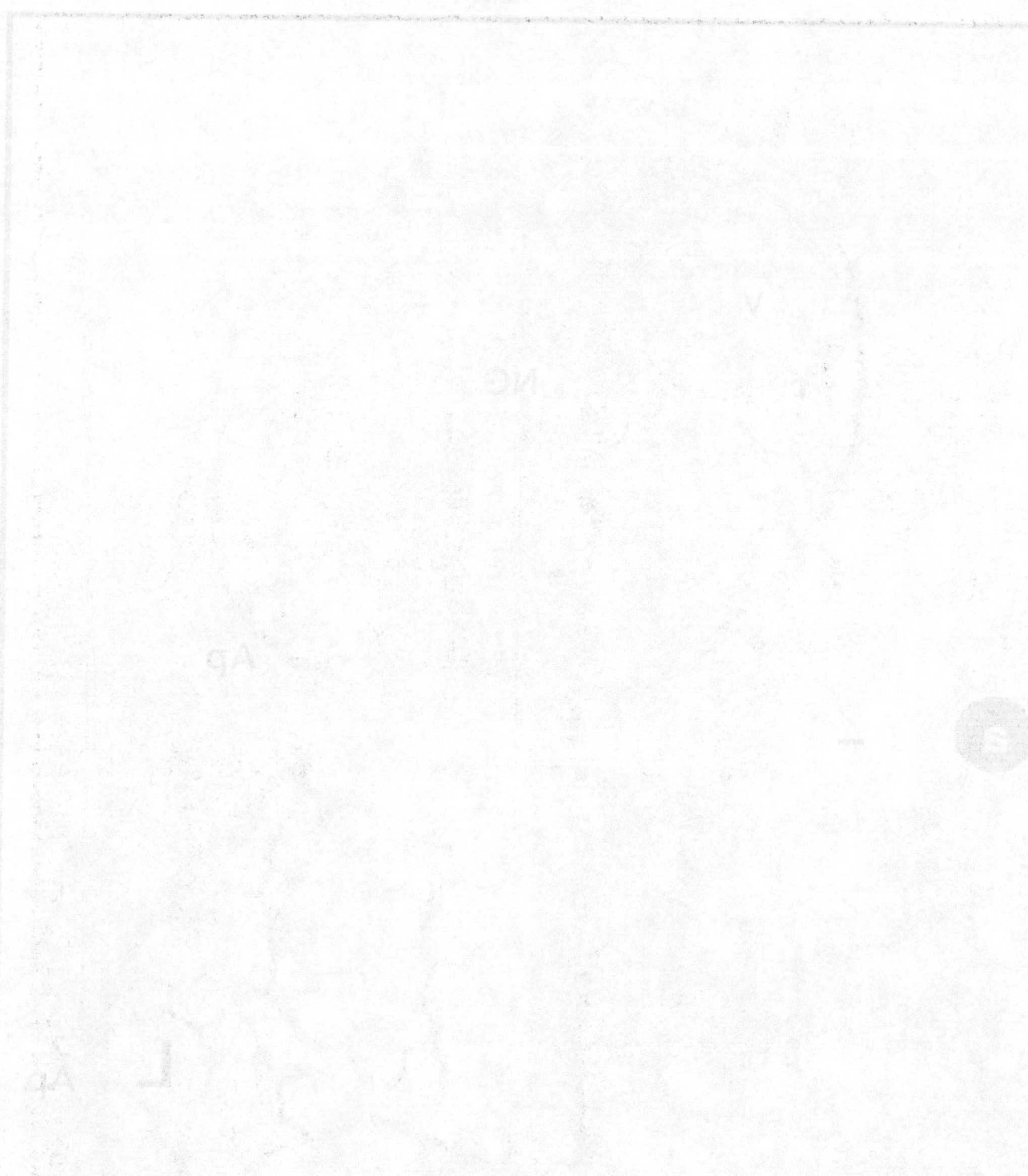


Figura 21. Vista general al microscopio electrónico de un grano de polen germinado. Polarización de cuerpos lipídicos en dirección del tubo polínico (x).

L= Cuerpos lipídicos, Ex= Exina, In= Intina, PC= Pared celular.

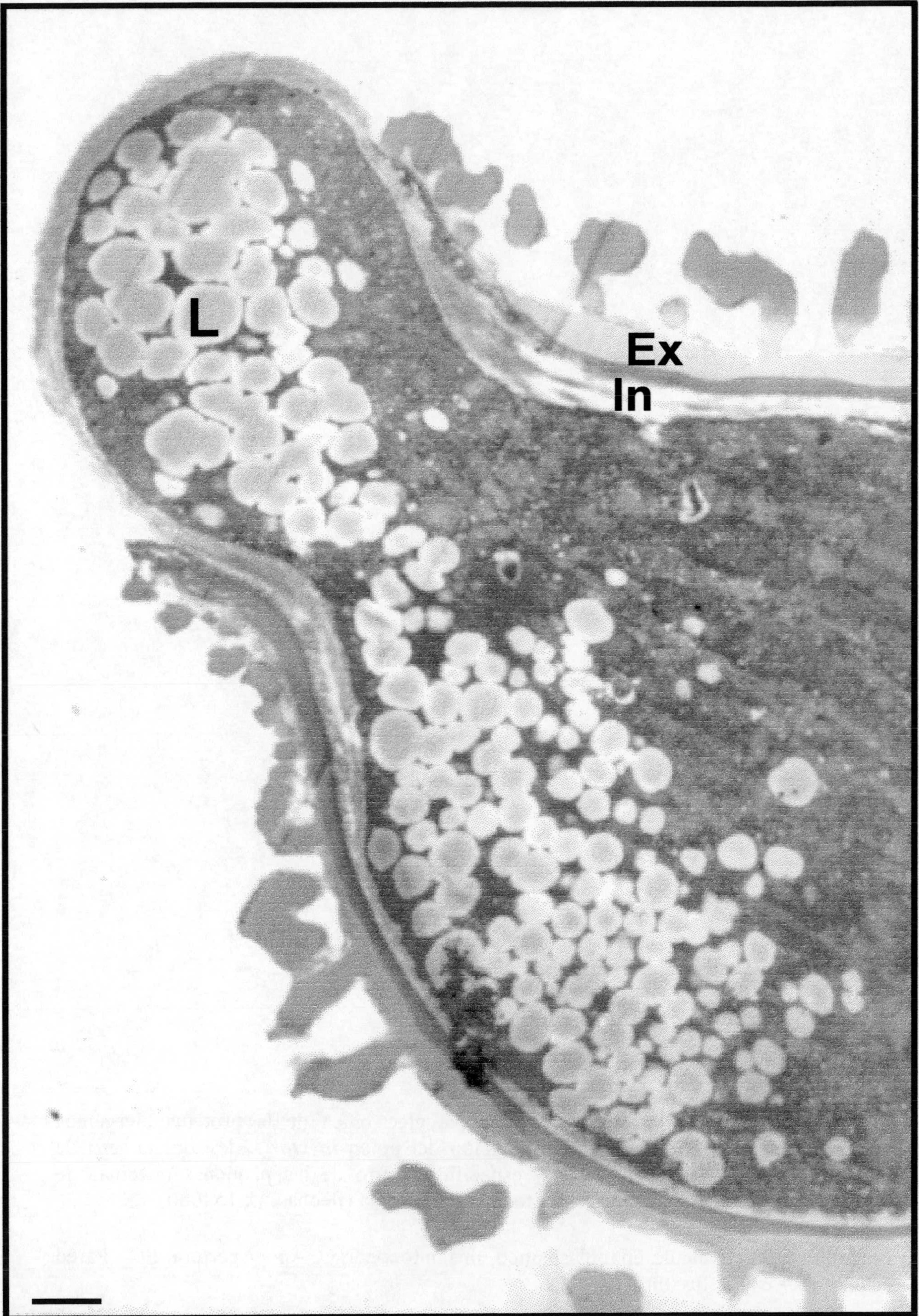


Figura 21

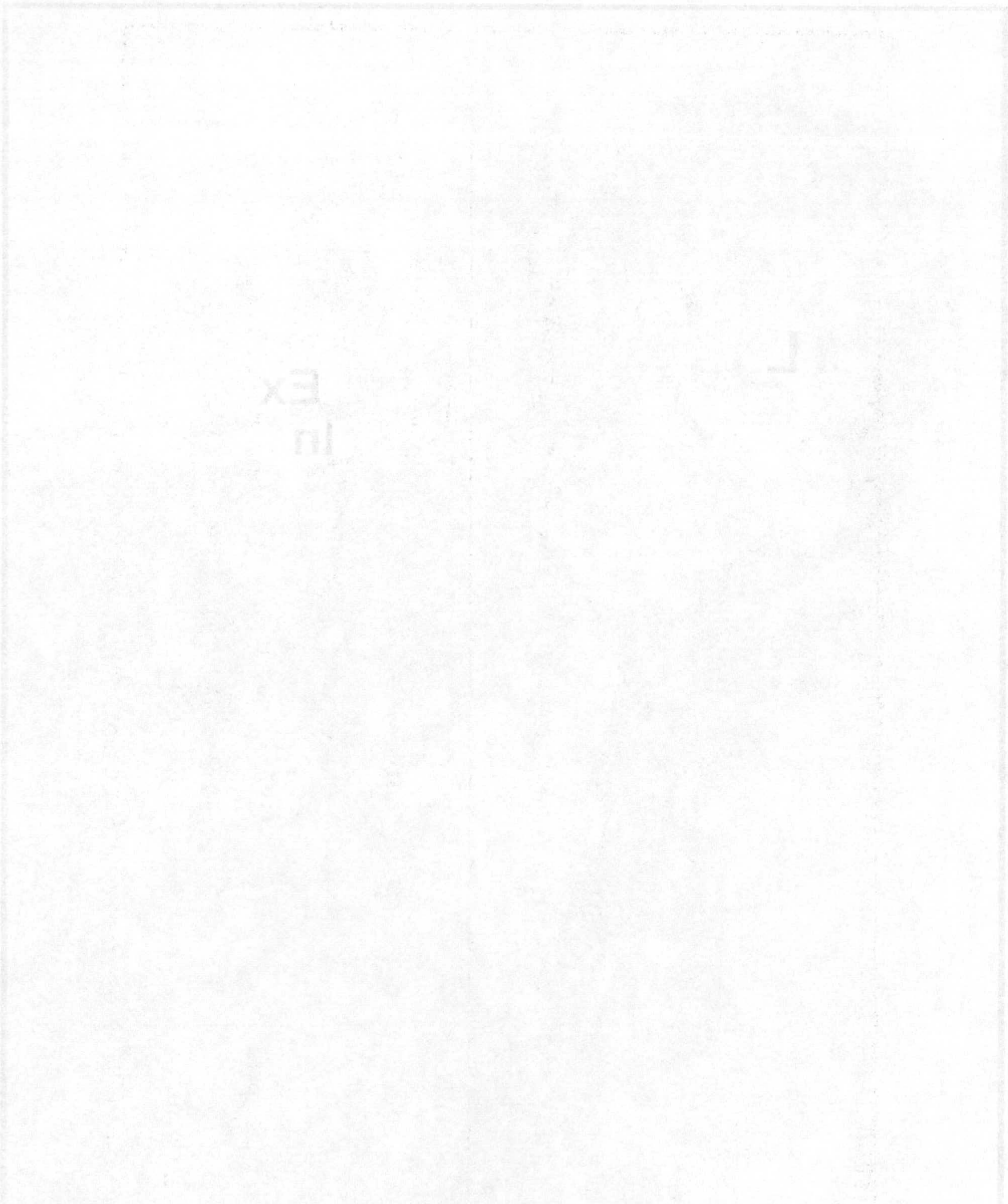


Figura 22. Inmuloalización a microscopia electrónica de la proteína alergénica mayoritaria (Ole e I) durante la germinación del polen *in vitro*. Elevado número de partículas de oro. Localización muy específica dentro de las pequeñas cisternas de retículo endoplasmático dispersas por todo el citoplasma (flechas) (x 154000).

L= Lípidos, RE= retículo endoplasmático, m= mitocondrias, Ap= Apertura, PC= Pared celular, Ex= exina, In= Intina.

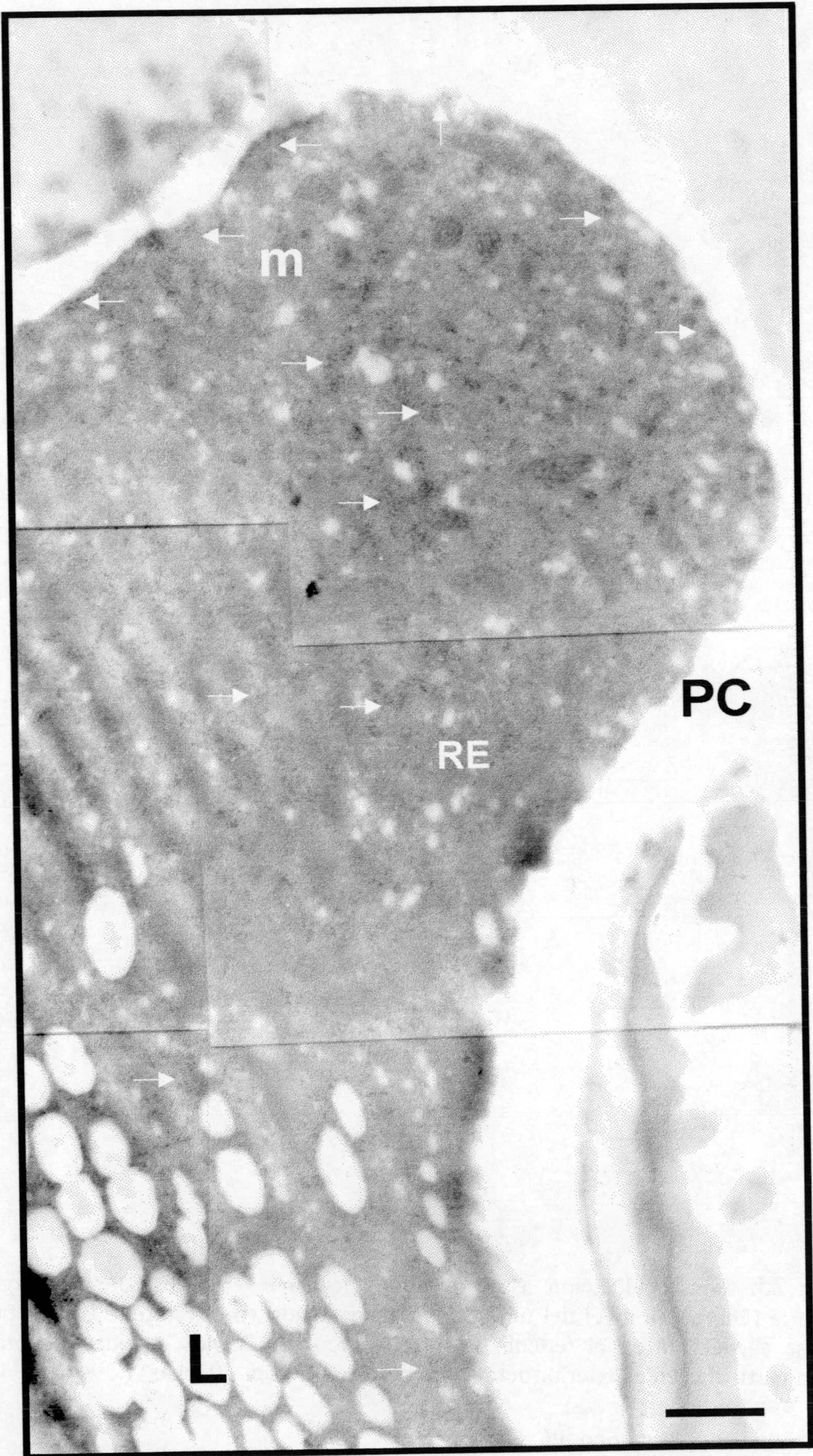


Figura 22

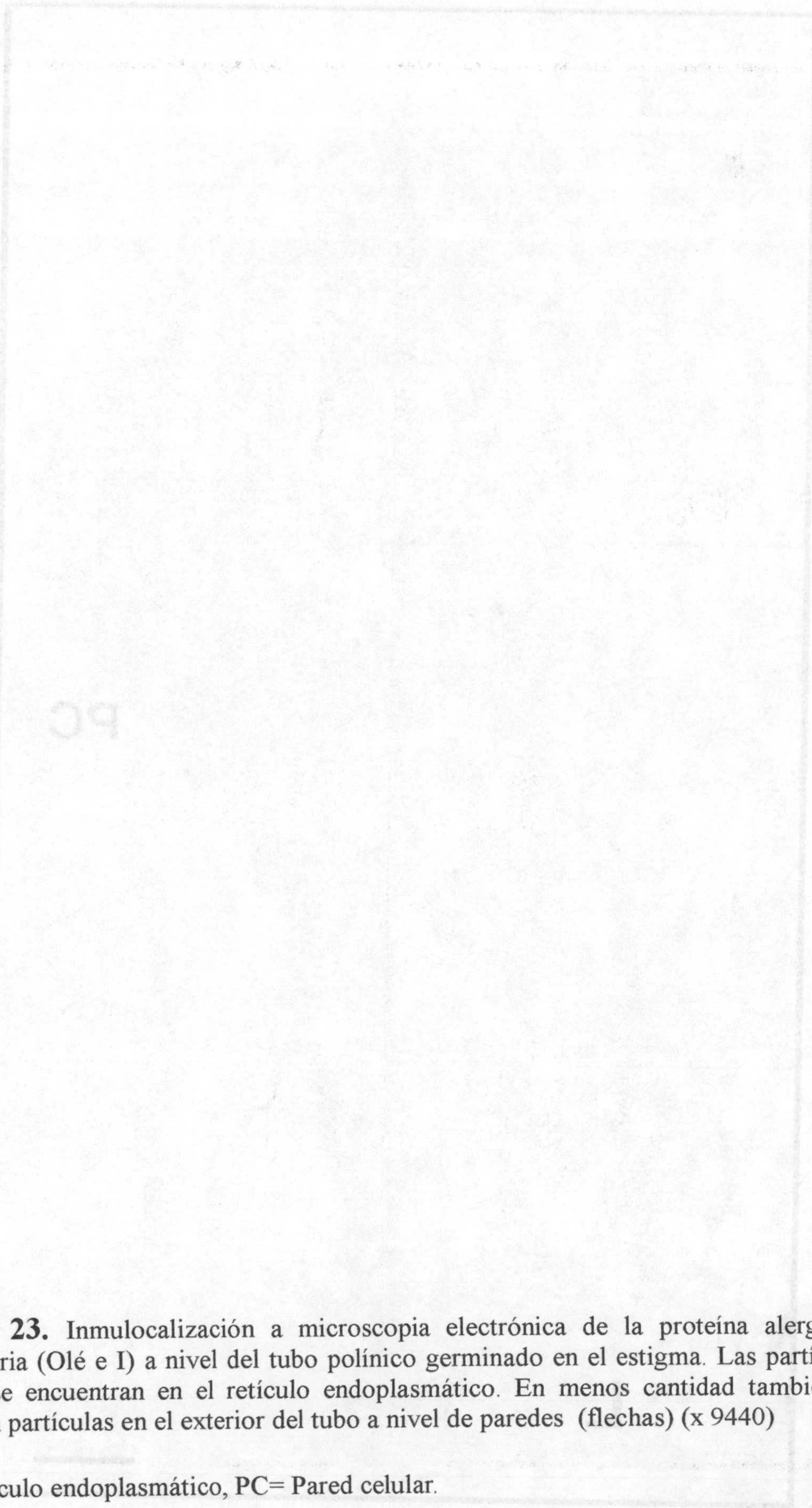


Figura 23. Inmuloalización a microscopia electrónica de la proteína alergénica mayoritaria (Ole e I) a nivel del tubo polínico germinado en el estigma. Las partículas de oro se encuentran en el retículo endoplasmático. En menos cantidad también se observan partículas en el exterior del tubo a nivel de paredes (flechas) (x 9440)

RE= retículo endoplasmático, PC= Pared celular.

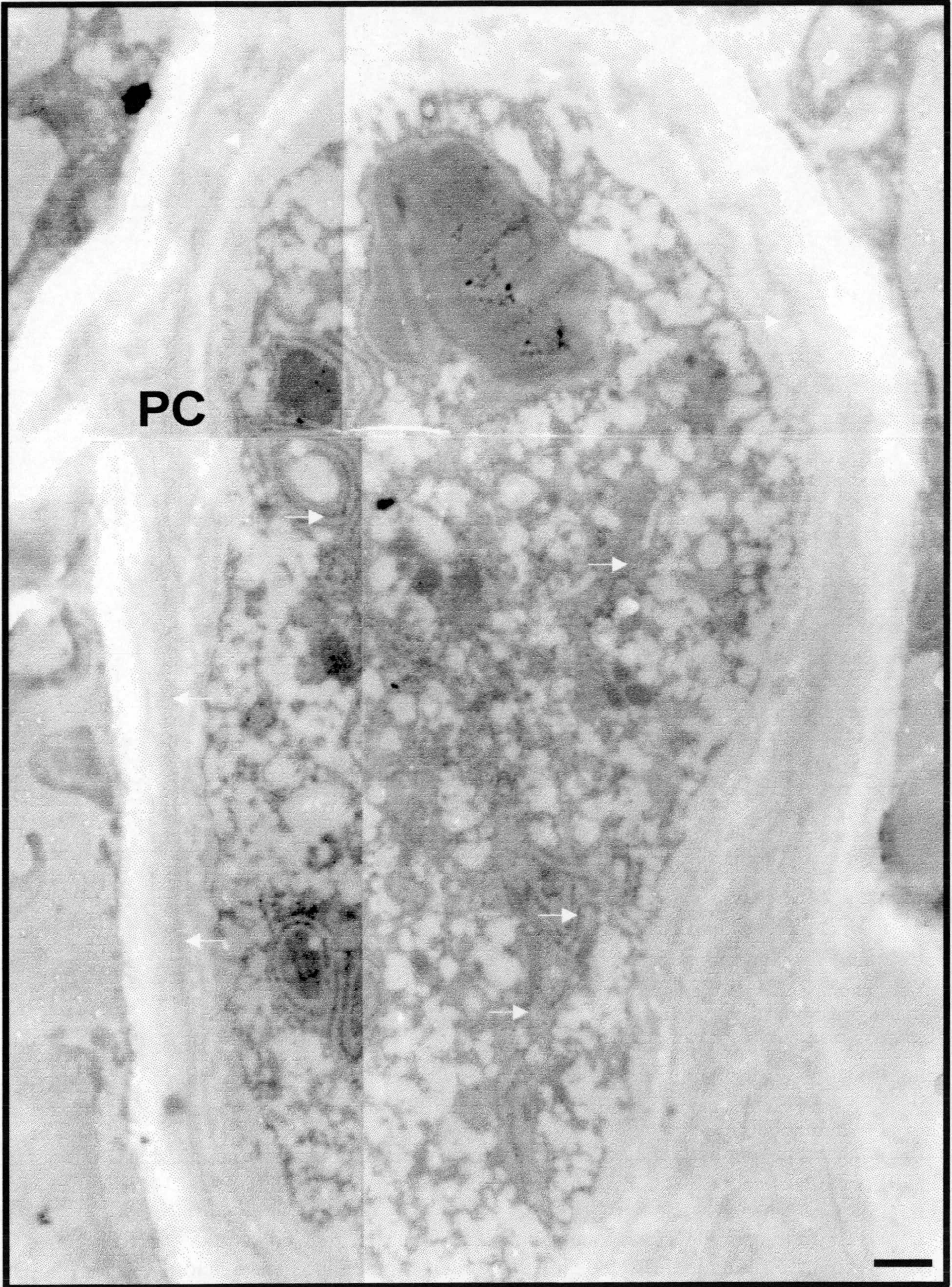


Figura 23

Figura 24. Material polínico usado para los extractos proteicos. Microscopía óptica

P=Polen, T=Tubo polínico

- a. Polen suelto (x 2816).
- b. Polen en cámara húmeda (x 2816).
- c. Polen incubado 5 min en el medio de germinación (x 2816).
- d. Polen incubado 1 h en el medio de germinación (x 2816).
- e. Polen incubado 2 h en el medio de germinación (x 2336).
- f. Polen no germinado de 4 h de incubación en el medio de germinación (x 2816).
- g. Polen germinado de 4 h de incubación en el medio de germinación (x 1408).
- h. Polen no germinado de 8 h de incubación en el medio de germinación (x 2816).
- i. Polen germinado de 8 h de incubación en el medio de germinación (x 1408).
- j. Polen no germinado de 16 h de incubación en el medio de germinación (x 2816).
- k. Polen germinado de 16 h de incubación en el medio de germinación (x 1408).

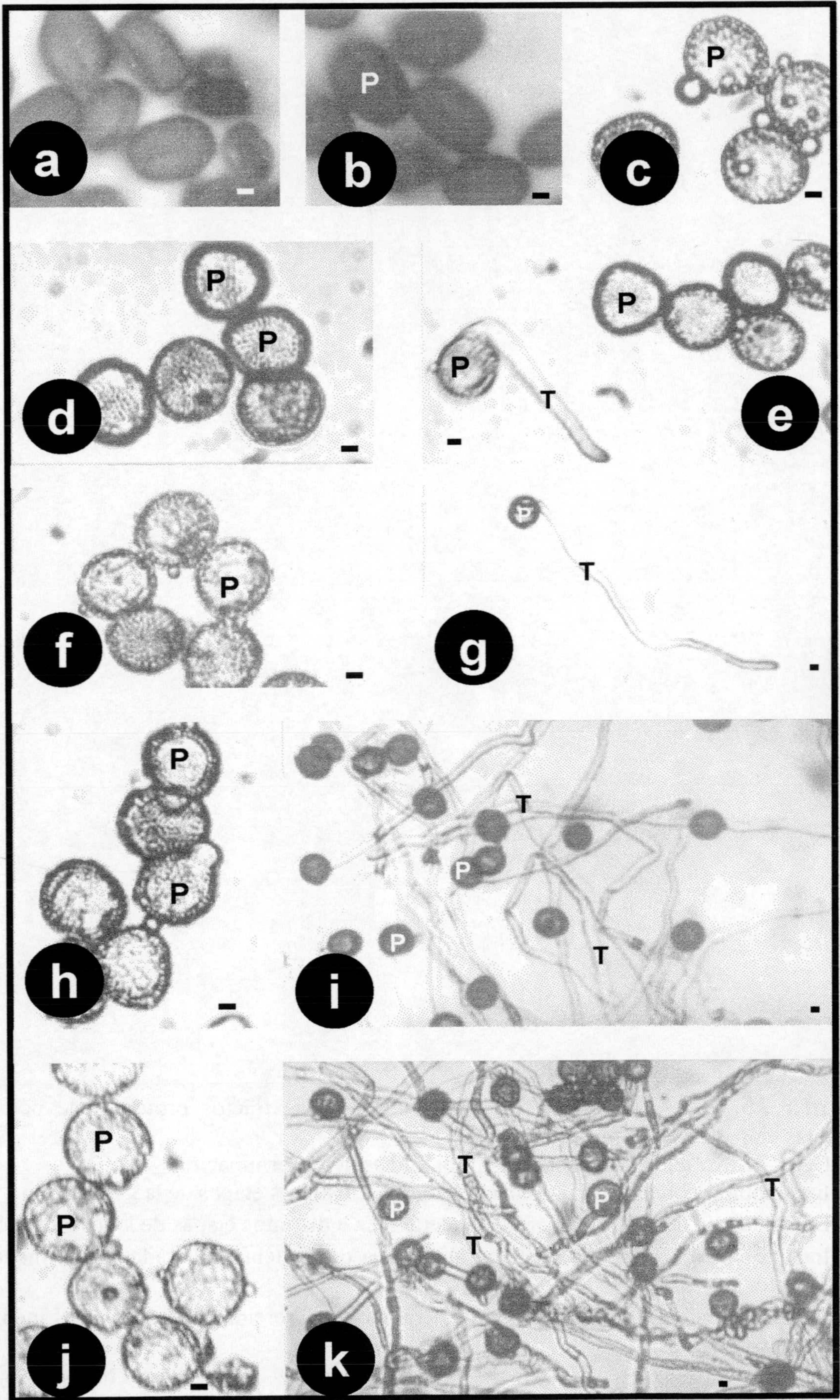


Figura 24

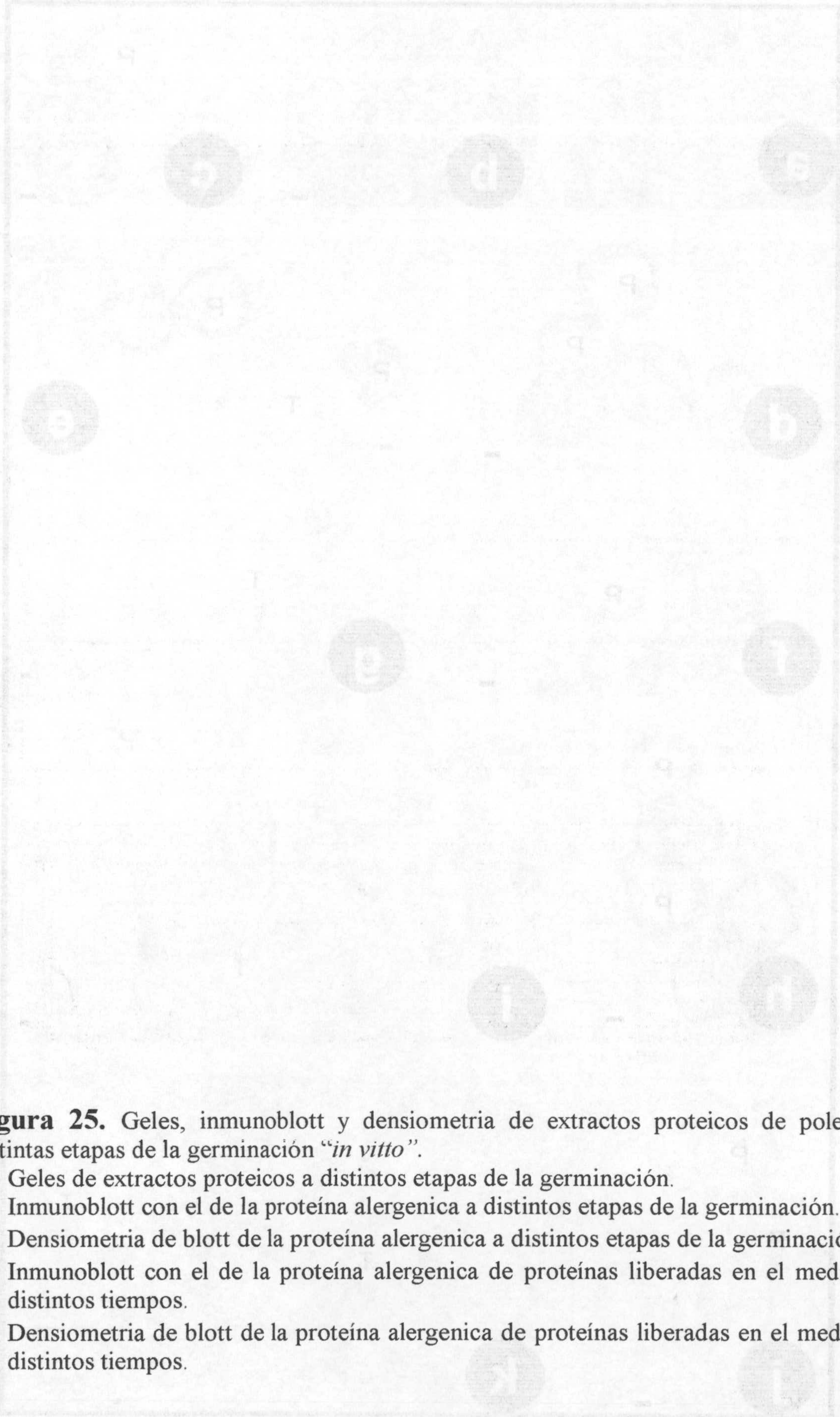


Figura 25. Geles, inmunoblott y densiometria de extractos proteicos de polen a distintas etapas de la germinación "*in vitro*".

- a.** Geles de extractos proteicos a distintas etapas de la germinación.
- b.** Inmunoblott con el de la proteína alergénica a distintas etapas de la germinación.
- c.** Densiometria de blott de la proteína alergénica a distintas etapas de la germinación
- d.** Inmunoblott con el de la proteína alergénica de proteínas liberadas en el medio a distintos tiempos.
- e.** Densiometria de blott de la proteína alergénica de proteínas liberadas en el medio a distintos tiempos.

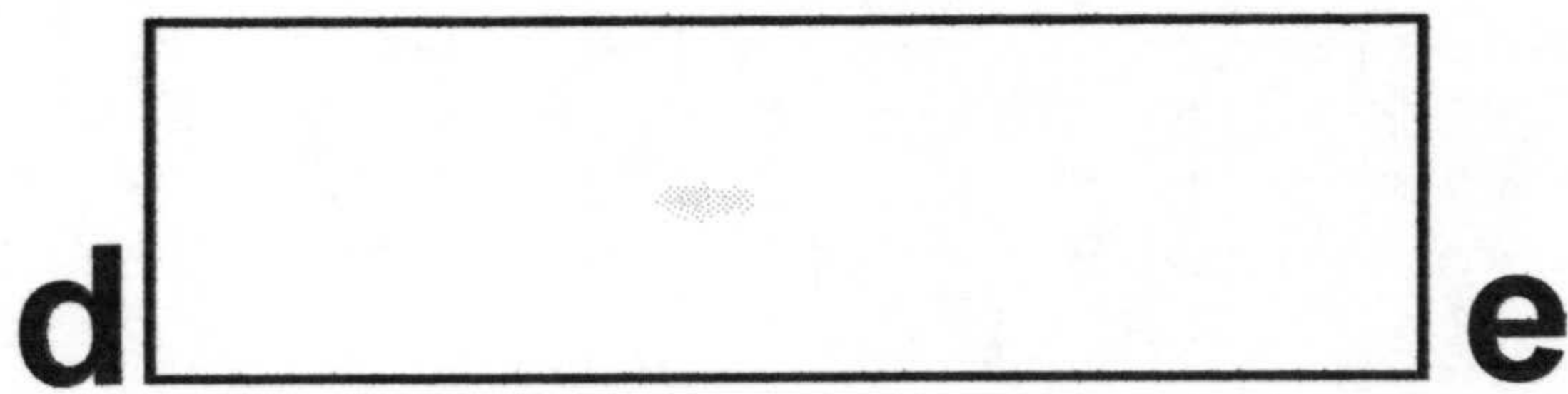
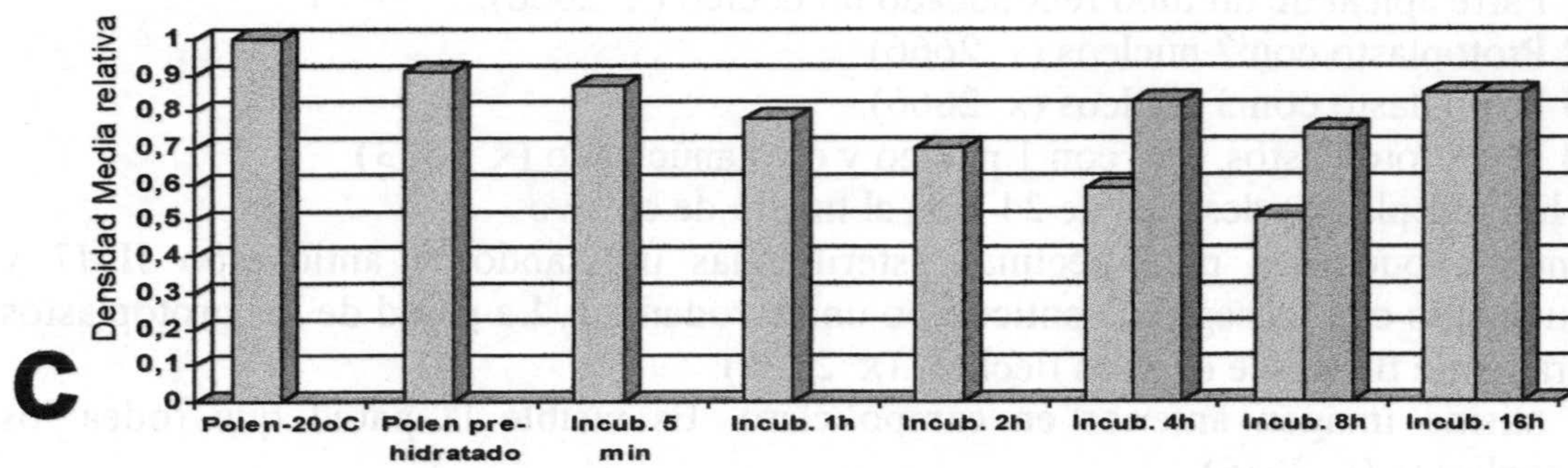
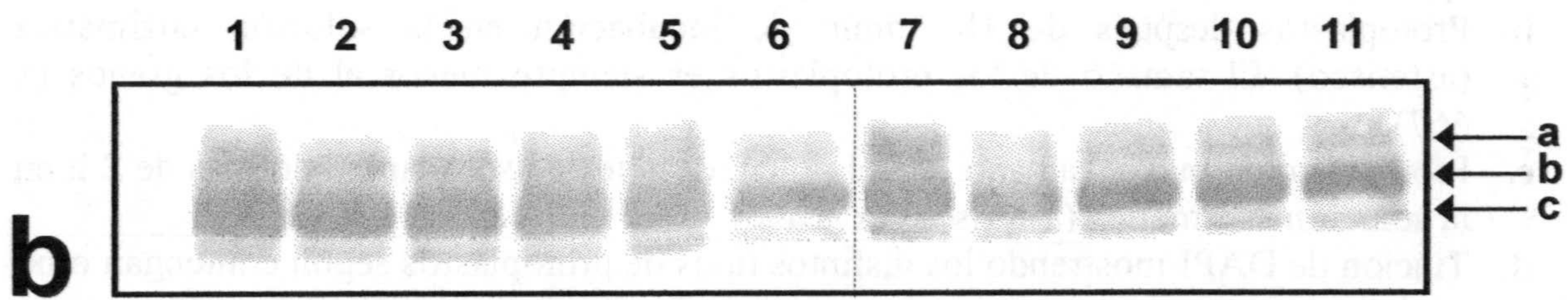
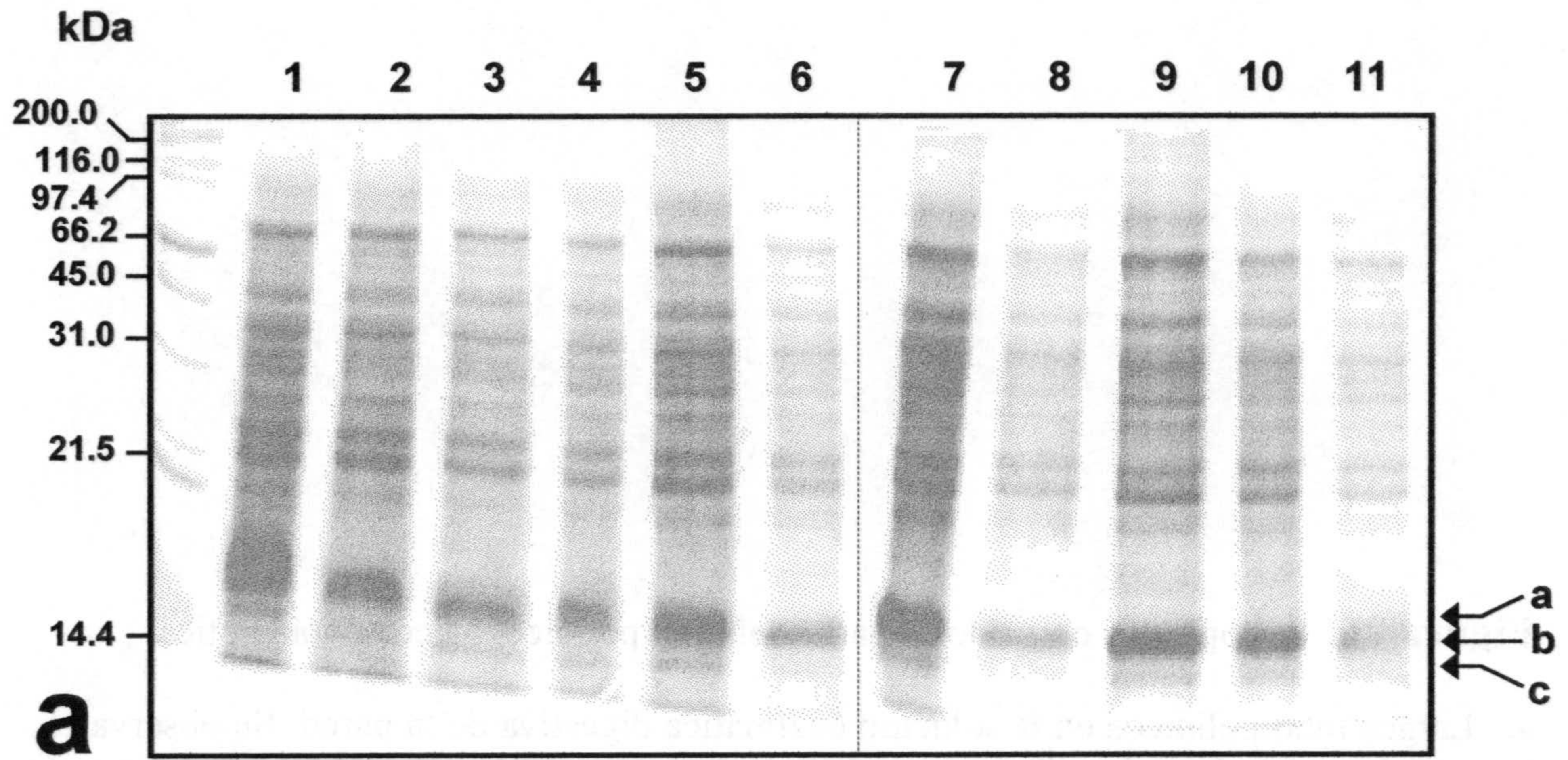


Figura 25

Figura 26. Protoplastos obtenidos a partir del tubo polínico. Microscopía óptica.

- a. Largos tubo polínicos en la solución enzimática digestiva de la pared. Se observa el citoplasma de los tubos fragmentando en varias zonas (flechas). Frecuentemente el ápice de los tubos se redondea (estrella) (x 1333).
- b. Protoplastos después de 1h 30min de incubación en la solución enzimática (asterisco). El tamaño de los protoplastos es siempre menor al de los granos (x 667).
- c. Protoplasto de mayor tamaño que el polen, después de ser mantenido más de 2 h en la solución enzimática (asterisco) (x 2666).
- d. Tinción de DAPI mostrando los distintos tipos de protoplastos según contengan o no núcleo.
 - d-1 Parte apical de un tubo redondeado un núcleo (x 2666).
 - d-2 Protoplasto con 2 núcleos (x 2666).
 - d-3 Protoplasto con 3 núcleos (x 2666).
 - d-4 Dos protoplastos, uno con 1 núcleo y otro anucleado (x 1333).
- e, f, g y h. Protoplastos después de 24 h en el medio de cultivo.
 - e. Inmunocitoquímica para pectinas esterificadas utilizando el anticuerpo JIM7 y visualizado con un segundo anticuerpo unido rodamina. La pared de los protoplastos claramente fluoresce (dobles flechas) (x 2666).
 - f. La misma imagen anterior en campo claro. Es visible la pared que rodea los protoplastos (x 2666).
 - g. Tinción de calcufluor. La pared de los protoplastos fluoresce en verde (dobles flechas) (x 1333).
 - h. La misma imagen anterior en campo claro. Los protoplastos rodeados de pared (x 1333).



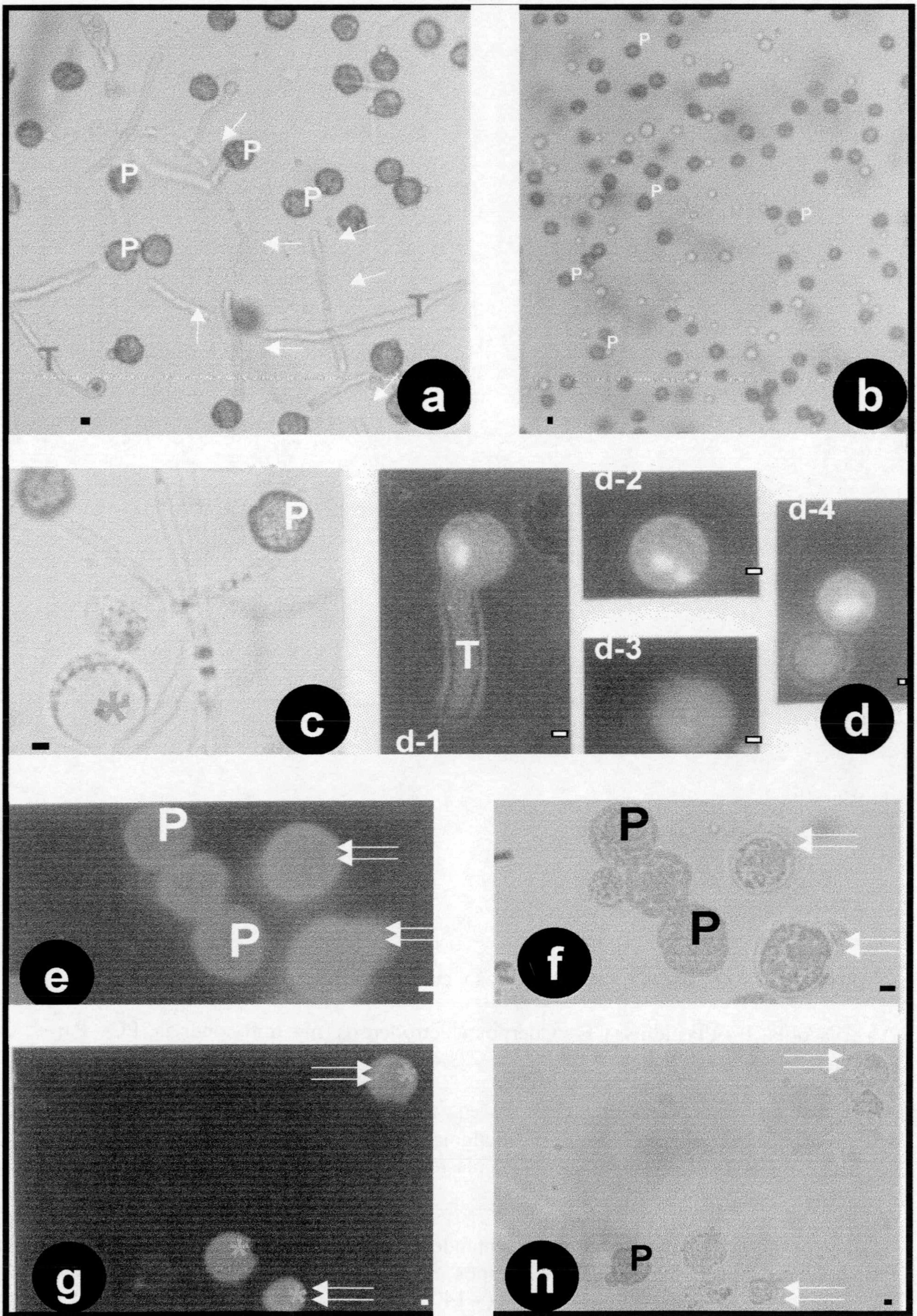


Figura 26

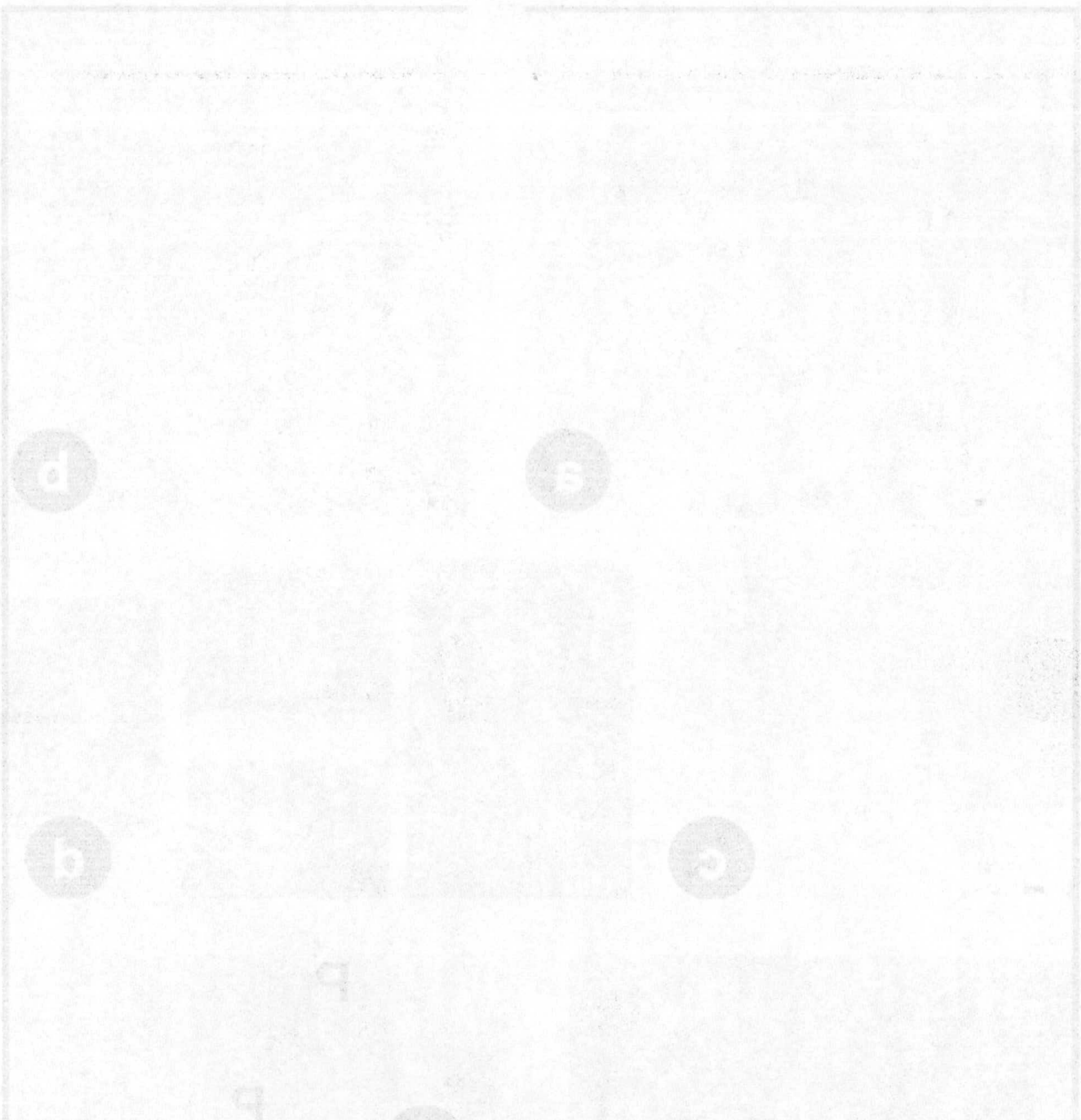


Figura 27. Protoplastos recién obtenidos y cultivados. Microscopía electrónica.

Va= Vacuola, P= Plastidios, CE= Cuerpos electrodensos, m= mitocondrias, PC= Pared celular.

- a. Protoplasto recién obtenido. El plasmalema (flechas) delimita el citoplasma que esta lleno de orgánulos, como vacuolas, plastos, mitocondrias, dictiosomas y cuerpos electrodensos, a. (x 10400).
- b. Detalle de otra zona (x 13000).
- c. Protoplasto cultivado 24 horas presentando una clara pared celular que le rodea. El citoplasma presenta vacuolas y cuerpos electrodensos. Se destaca la presencia de mitocondrias debajo del plasmalema (x 14000).

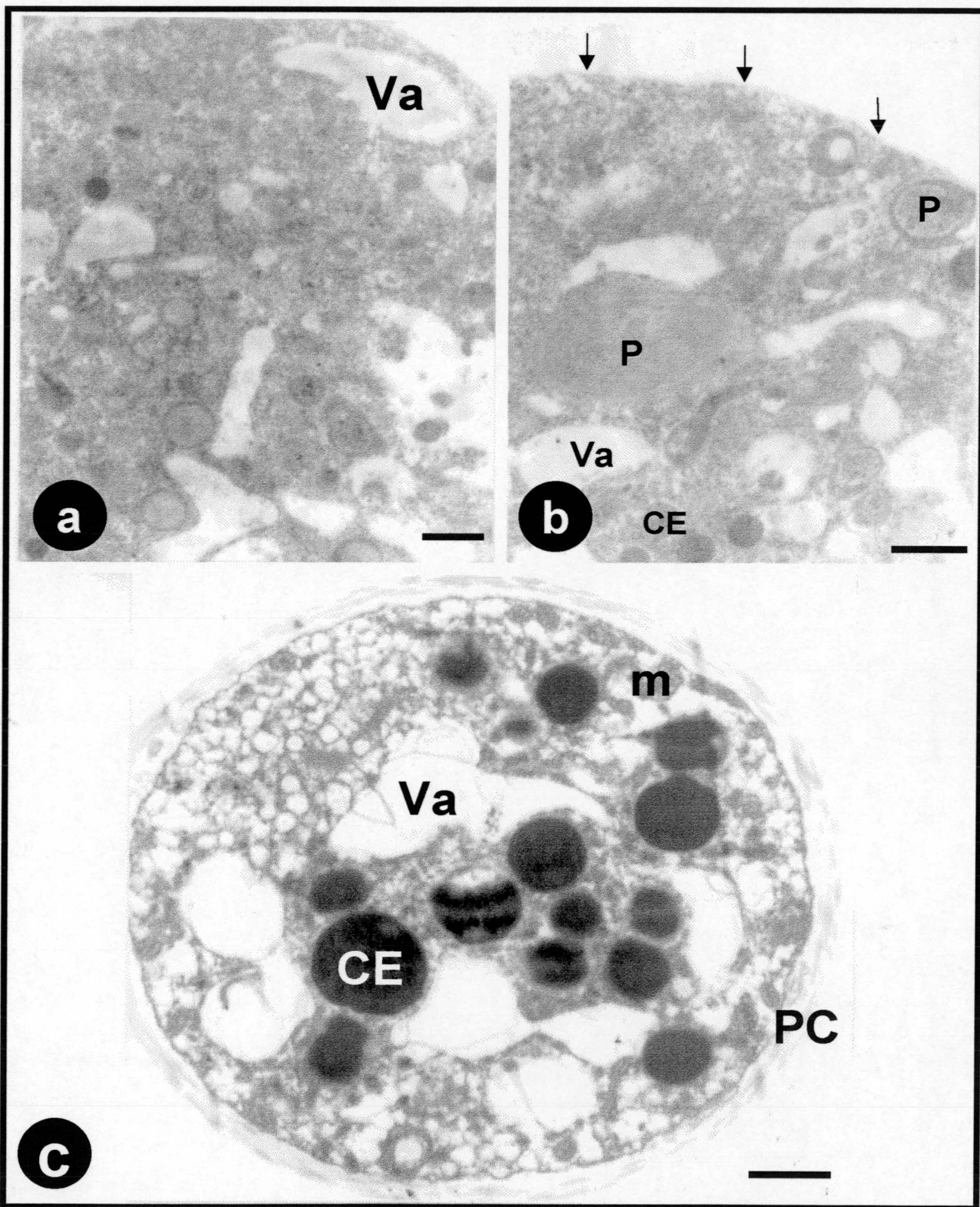


Figura 27

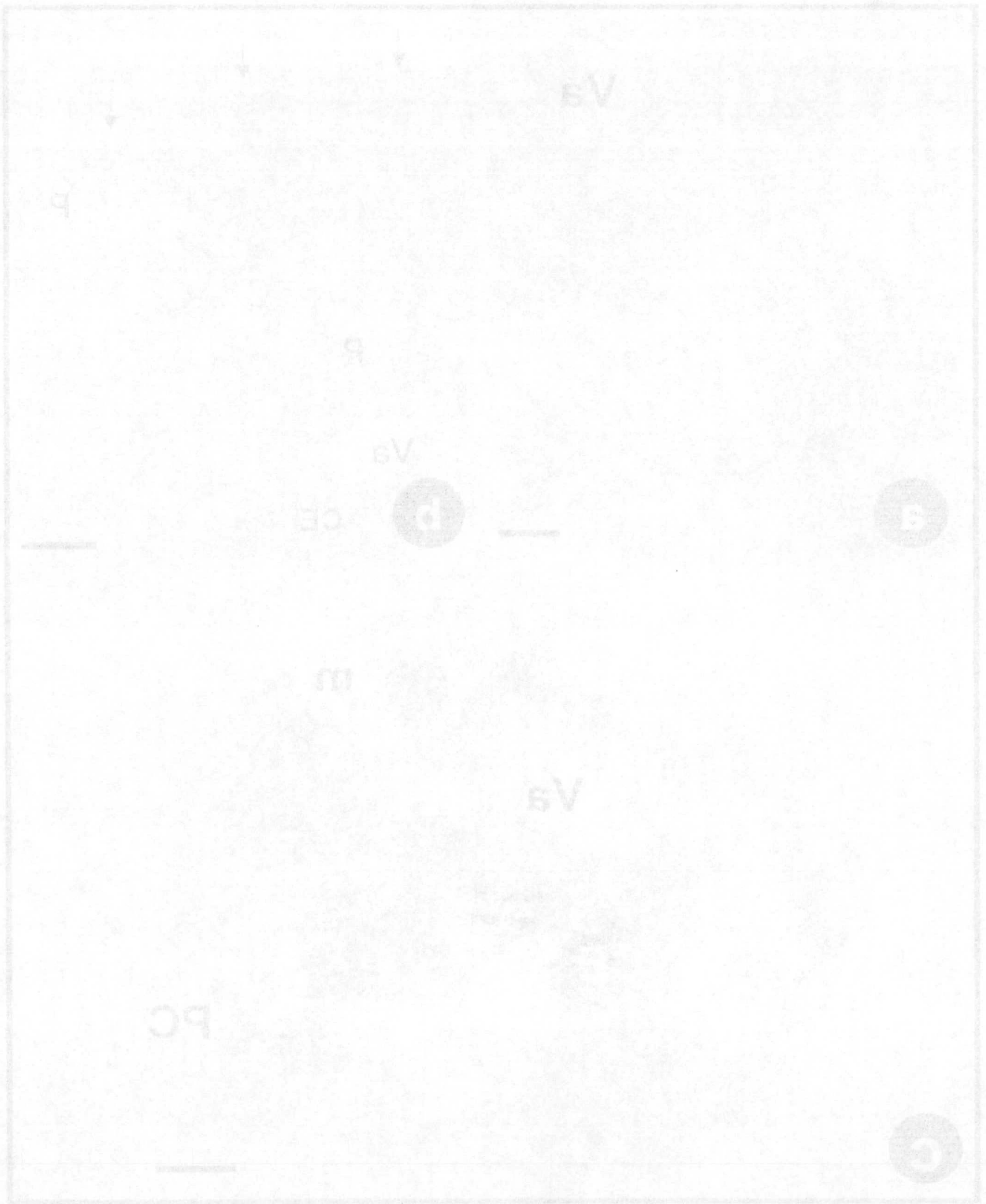
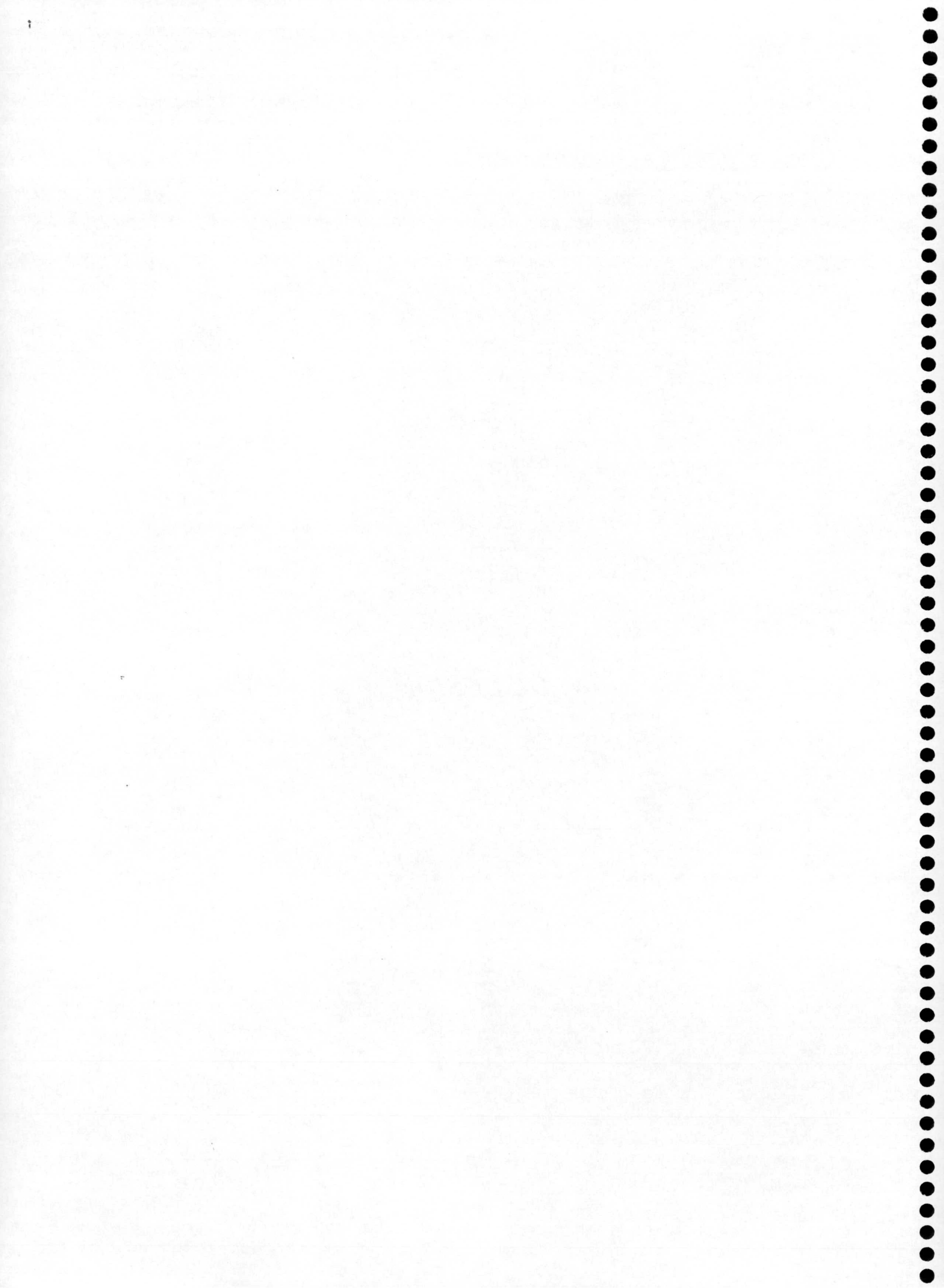


Figure 27

V. DISCUSIÓN



En el ciclo de vida de las plantas con flores, el tubo polínico sirve de puente estructural efímero entre el final de la fase gametofítica masculina y el inicio de la fase esporofítica. Son muchos los autores que se han ocupado de los diferentes aspectos de la germinación y crecimiento del tubo polínico, siendo muy abundante la literatura que existe acerca de esta última etapa del gametofito masculino. Sólo a modo de ejemplo citamos algunos reviews de los que se ocupan de la viabilidad, almacén y germinación del polen (Johri y Vasil, 1961; Linskens, 1964) de la fisiología del crecimiento del tubo (Heslop-Harrison, 1987; Steer y Steer, 1989; Derksen y col., 1995) y de la bioquímica y biología molecular de la germinación y crecimiento del tubo polínico (Mascarenhas, 1975; 1993).

La imagen obtenida de la germinación del polen del olivo en el estigma y el crecimiento del tubo polínico en el estilo, ha sido completada con el comportamiento del polen en las condiciones de germinación *in vitro* en el laboratorio. A continuación nos proponemos evaluar y contrastar los resultados que hemos obtenido en el polen del olivo con la información disponible de los estudios ultraestructurales, fisiológicos y moleculares realizados en otras especies.

1. Germinación.

Cuando el grano de polen cae en el estigma receptivo, el conjunto de RNA almacenado, las proteínas, sustancias de reserva y pequeñas moléculas bioactivas permiten la rápida germinación y crecimiento del tubo que penetra y crece dentro del tubo. Finalmente el tubo deposita eventualmente las dos células espermáticas en el saco embrionario donde ellas funden con la ovocélula y la célula central, formando el cigoto y el endospermo.

La germinación del polen y crecimiento del tubo no son procesos claramente separados sino que por el contrario están integrados y son interdependientes. Nuestra aproximación a la germinación in vivo del polen en el estigma, sólo nos ha permitido esbozar un poco al azar los diferentes aspectos objeto de este estudio, siendo necesario recurrir al sistema experimental de la germinación in vitro, para profundizar más en estos estudios.

Si consideramos las alteraciones morfológicas externas que experimenta el grano en el medio de germinación, los cambios internos bioquímicos y la diferenciación celular que sufre el polen a lo largo de todo el proceso de germinación, podemos distinguir tres etapas en este proceso: hidratación, activación y salida y crecimiento del tubo polínico. La salida del tubo es la culminación de los procesos de hidratación y activación. La imagen obtenida de la germinación del polen del olivo en el estigma y el crecimiento del tubo polínico en el estilo, ha sido completada con el comportamiento del polen en las condiciones de germinación in vitro en el laboratorio. A continuación nos proponemos evaluar y contrastar los resultados que hemos obtenido en el polen del olivo con la información disponible de los estudios ultraestructurales, fisiológicos y moleculares realizados en otras especies.

1.1. Hidratación

La hidratación sobre el estigma es el primer cambio que se produce en los polenes compatibles una vez que estos se ponen en contacto con la superficie del estigma, como respuesta a la reacción de reconocimiento polen-estigma. La mejor prueba de que la hidratación ya es un proceso de reconocimiento es que en muchas plantas, los polenes de otras especies no se hidratan en la superficie del estigma, ya que no son reconocidos, es decir, se trata de polenes incompatibles. Previa a la hidratación se requiere la activación de una serie de proteínas presentes tanto en la pared del polen (Hiscock y col., 1995; Preuss y col., 1993), como en el estigma (Elleman y col., 1992; Loldman y col., 1994), y que tienen una función potencial en el reconocimiento polen-estigma.

Como resultado de los primeros estudios fisiológicos clásicos sobre la viabilidad y germinación del polen, se ha generalizado que el polen necesita alcanzar un cierto grado de deshidratación antes de su germinación, lo que es importante para la fisiología y metabolismo del polen ya que así se asegura que la germinación no ocurra prematuramente dentro de la antera.

En los diferentes tipos de polenes existen diferencias en cuanto a su contenido en agua antes de la germinación. La desecación es un factor mucho más crítico para los polenes bicelulares (Tanaka y Ito, 1981a) que para los tricelulares que pueden germinar sin desecación previa (Lin y Dickinson, 1984).

En el grano de polen la absorción de agua es regulada por sus paredes. Se han descrito adaptaciones de la pared para la osmoregulación durante la germinación en diferentes especies (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1985; Heslop-Harrison y col., 1986). También las aperturas juegan un importante papel en los cambios de volumen del polen causados por la desecación e hidratación. Dichos cambios han sido atribuidos a la actividad del *oncus* (que es una parte de la apertura). El desarrollo y comportamiento de las aperturas y el papel del *oncus* en la regulación de los cambios de volumen del grano causados por efecto de la hidratación han sido bien estudiados en el polen del olivo por nuestro grupo (Fernández y Rodríguez-García, 1995).

Puesto que la absorción de agua es un prerequisite para la germinación que en último término viene regulado por la membrana plasmática, los cambios que experimenta la arquitectura de las membranas durante los procesos de desecación – hidratación son decisivos para determinar su funcionalidad. Los daños irreversibles que sufra la membrana pueden hacer que la membrana sea inefectiva como barrera osmótica (Elleman y Dickinson, 1986). Para evaluar los efectos de la desecación – hidratación en el polen y conocer con cierta garantía las modificaciones que experimenta la estructura de las membranas, sería conveniente utilizar criotécnicas

El hecho de que cuando el polen se coloca en una atmósfera húmeda (prehidratación) se mejora su germinación, indica que la humedad conduce a la reorganización de la membrana como un sistema osmótico efectivo (Shivanna y col., 1983).

A microscopía electrónica, en la fase de hidratación no se producen cambios citológicos importantes respecto a la estructura observada en el grano de polen maduro (Cresti y col., 1977). Así, las observaciones realizadas revelan que la fase de hidratación se caracteriza por agrupaciones o apilamientos de cisternas de retículo endoplasmático rugoso, plastidios con agregados de ferritina, numerosos cuerpos lipídicos rodeados de cisternas de retículo endoplasmático rugoso, abundancia de ribosomas libres, ausencia de polisomas así como mitocondrias con pocas crestas y pequeñas vacuolas conteniendo cuerpos electro-densos (Cresti y col., 1975; 1983; 1985). La imagen que obtenemos en el polen de olivo desecado es muy similar a la anteriormente descrita.

1.2. Activación

El intervalo de tiempo entre la hidratación e iniciación del tubo polínico puede considerarse como el periodo de activación del polen y también se le conoce como *fase de reposo* (lag-phase). Su duración es variable, mientras que en algunas especies se limita a pocos minutos, para otras es de horas. La fase de reposo se ha relacionado también con la síntesis de proteínas, así granos de polen con largas fases de reposo sólo germinan después de la iniciación de la síntesis de proteínas. Se ha realizado una correlación entre el tipo de material de reserva del polen y la duración de esta fase. Granos de polen de *Impatiens balsamina*, cuya reserva es principalmente glucosa, inician la salida del tubo en 2 o 3 minutos, mientras que el polen de *Lilium*, que contiene sacarosa, necesita de 30 a 40 minutos (Iwanami y col., 1959). Hidratación y activación son interdependientes y pueden iniciarse simultáneamente.

Uno de los primeros signos del paso de estado quiescente del polen a polen activo viene marcado por el metabolismo respiratorio, lo cual se refleja en la buena organización estructural que presentan las mitocondrias en comparación con el polen desecado en el

que a veces resulta difícil reconocer a estos orgánulos como tales. Estos cambios morfológicos de las mitocondrias son más manifiestos en los polenes bicelulares, como es el caso del polen del olivo, que en los polenes tricolulares (Hoekstra y Buinsma, 1978; Hoekstra, 1979). El polen tricolular normalmente presenta una alta organización de mitocondrias ya durante su liberación de la antera, y presentan una fase de reposo corta. Estas diferencias encontradas en ambos tipos de polenes reflejan el diferente grado de hidratación y de metabolismo que hay entre polenes bicelular y tricolular.

Los cambios metabólicos que tienen lugar durante la activación se reflejan en la ultraestructura del polen activado. Entre la información obtenida a partir de diferentes especies durante la activación tenemos: un reordenamiento y dispersión de las cisternas de RE que se disgregan de su estado inicial presente en el polen quiescente, en donde se encuentran agrupaciones de cisternas de RE apiladas (Cresti y col., 1977), o bien rodeando a los cuerpos lipídicos (Noguchi, 1990). El polen del olivo también presenta estas características. Otros aspectos de la activación son formación de polisomas, aparición de dictiosomas y de gran actividad de vesículas secretoras (Cresti y col., 1980; Clare y Steer, 1983; Cresti y Keijzer, 1985; Malhó y Pais, 1992).

1.3. Salida y crecimiento del tubo polínico

En el polen del olivo se localizan tres aperturas ecuatoriales y equidistantes, ya determinadas en el estadio de tetradas, que sufren un desarrollo paralelo a las zonas no aperturales de la pared (Fernández y Rodríguez-García., 1988; 1989). En el polen maduro, la apertura se caracteriza por la ausencia de exina y por una intina abombada hacia el exterior u oncus de la intina (Rodríguez-García y Fernández., 1988; Fernández y Rodríguez-García., 1995). Este oncus contiene túbulos densos a los electrones en la zona apical alejada del plasmalema (Rodríguez-García y Fernández 1988, Fernández y Rodríguez-García 1989). En el polen hidratado las aperturas presentan tres protuberancias manifiestas. Por una de ellas es por donde sale el tubo polínico. Aparentemente las tres aperturas son potencialmente funcionales, ya que no se observan diferencias entre ellas. Aunque se desconoce que es lo que determina que el tubo

germine por una de ellas, posiblemente serán los estímulos procedentes del exterior (del medio de germinación o del pistilio) lo que ocasione gradientes de nutrientes que estimulan la salida por una determinada apertura.

El tubo polínico emerge generalmente como extensión de la intina que se vuelve menos rígida para que el tubo polínico pueda salir. Rápidamente el nuevo material de la pared tiene que integrarse de una forma ordenada para la continuidad del crecimiento del tubo polínico, y lo hace a través de la fusión de vesículas en el ápice.

Los granos de polen de gramíneas, contienen gran número de vesículas ricas en polisacáridos llamadas p-partículas (Heslop-Harrison, 1979, Heslop Harrison 1982) que contribuyen al crecimiento de la pared del tubo polínico. El contenido de las p-partículas parece ser de naturaleza pectica. Las estructuras del ápice del tubo polínico son semejantes en casi todas las especies (Sassen y col. 1964, Rosen y col. 1964, Rosen y Gawlik 1966, Dasnek y Rosen 1966). Los dictiosomas localizados en la zona subapical manifiestan una gran actividad secretora por la elevada cantidad de vesículas que se desplazan mayoritariamente a la zona apical. Después de la germinación, se establece rápidamente una clara división del contenido del tubo polínico en zonas.

2. Conservación del polen del olivo a bajas temperaturas

La viabilidad del polen es la capacidad que tiene el polen para germinar y llevar a buen término la fecundación.

Factores ambientales, particularmente la temperatura y humedad influyen claramente sobre la viabilidad ya que afectan a la velocidad de respiración. Una baja humedad disminuye la actividad respiratoria pero aumenta y prolonga la viabilidad. La viabilidad está estrechamente relacionada con el estado de integridad del plasmalema lo que a su vez está relacionado con la deshidratación. Cuando el nivel de humedad de la membrana baja del 20%, la membrana pierde su estructura lamelar y permeabilidad. Por tanto el

contenido de agua en el polen y las temperaturas son decisivas para almacenar con éxito el polen durante periodos largos de tiempo (Barnabás, 1994).

Las causas de la pérdida de la viabilidad en el polen son:

- * Deficiencia en los substratos de la respiración.
- * Pérdida de la reversibilidad de la permeabilidad de la membrana.
- * Inactivación de enzimas y hormonas de crecimiento.

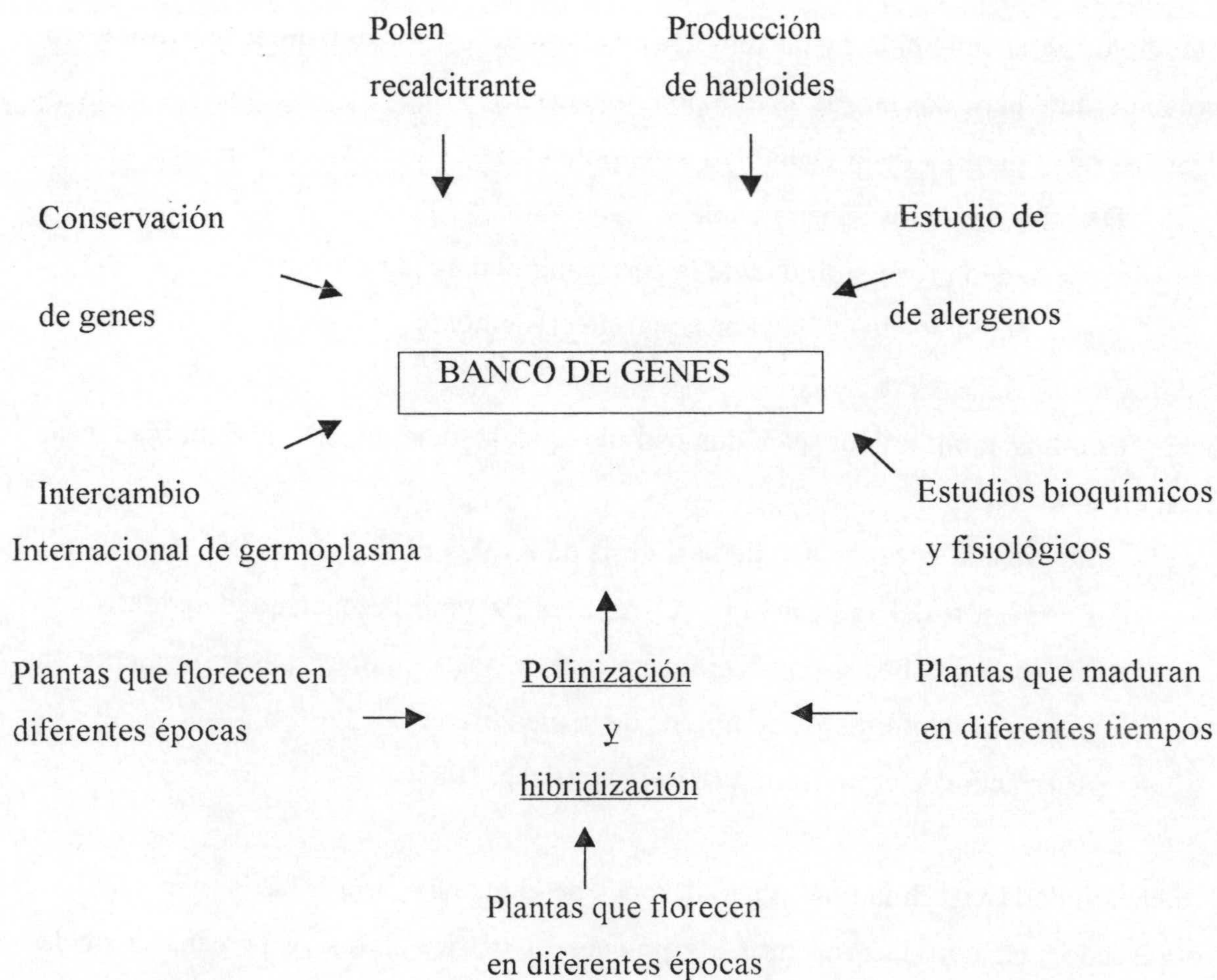
Muchos estudios bioquímicos han demostrado que la pérdida de la viabilidad está asociada con:

- Pérdida de la capacidad de la síntesis de RNA y proteínas.
- Formación del radical libre $-O_2$ que es de gran potencialidad oxidativa, y provoca muchos y considerables daños y destrucciones, particularmente en los grandes polímeros de lípidos de la membrana.
- Aberración de cromosomas (Bewley y Black, 1982).

La retención de la viabilidad del polen después de la antesis varía entre las especies. Se ha observado una correlación entre los pólenes bi o tricelulares, y la pérdida de la viabilidad.

El polen bicelular generalmente mantiene la viabilidad durante un periodo más largo que el polen tricelular (Brewbaker, 1959). En gramíneas, la viabilidad se pierde rápidamente, minutos después de la antesis.

La preservación de la viabilidad del polen artificialmente durante largos periodos de tiempo, tiene interés tanto desde el punto de vista teórico como práctico. La importancia del almacenaje del polen y de establecer un banco de polen ha sido descrito por Bajaj (1981), y se recoge en el siguiente esquema:



Los estudios sistemáticos sobre la viabilidad del polen comenzaron hacia finales del siglo pasado (Mangin, 1886; Rittinghaus, 1886) y principios de este (Goff, 1901; Pfundt, 1910), midiendo la longevidad de polenes de diferentes especies en condiciones naturales e intentando prolongar la viabilidad usando diferentes temperaturas y grados de humedad.

Granos de polen binucleados que en condiciones naturales ya tienen una larga longevidad (Hoekstra y Bruisna, 1975; Johri y Shivanna, 1977), han podido prolongar el tiempo de viabilidad bajando la temperatura de almacenamiento y el grado de humedad relativa. Los pólenes tricolulares, pierden su viabilidad muy rápidamente, teniendo una vida media muy corta. Tradicionalmente su conservación ha sido difícil. Sin embargo el

maíz cuyo polen es tricelular, se ha podido conservar durante años a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en nitrógeno líquido y desecado, perdiendo entre 65-75 % de su original contenido de agua. De esta forma se mantienen viables hasta un 50 % de los granos. Se requiere una alta pérdida de agua en el polen para estabilizar la estructura de las membranas a temperaturas de congelación (Barnabás y Rajki, 1976; Barnabás, 1984).

Los mejores resultados para conservar el polen del olivo durante todo el año se obtuvieron a bajas temperaturas de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3. Optimización de la germinación *in vitro*

Aunque la germinación *in vitro* no reproduce las mismas condiciones de la germinación *in vivo*, sin embargo con un medio apropiado se puede conseguir un rendimiento suficiente para estudiar los procesos implicados en el inicio y desarrollo del tubo polínico, durante las primeras 24 horas de germinación. Después de este tiempo, al menos en el caso del olivo, el tubo detiene el crecimiento y comienza su senescencia. Incluso cuando se consigue una alta optimización del medio, los tubos sólo alcanzan un 30-40% de la longitud del tubo cuando germina *in vivo* y frecuentemente presentan anomalías estructurales (Read y col., 1993). En el caso del olivo, al tratarse de un polen bicelular, la germinación *in vitro* representa una alternativa para estudiar la germinación en cualquier época del año a partir de polen almacenado a bajas temperaturas. De esta manera se obvian las dificultades inherentes a la germinación *in vivo*, como son el reducido tiempo de la polinización o la dificultad de estudiar secuencialmente las etapas de la germinación dentro de un sistema celular de elevada complejidad como es el pistilo.

El polen deshidratado germina en un medio ajustado a un pH y molaridad favorable y en las condiciones apropiadas de temperatura y humedad. Un medio ideal de germinación de polen incluye agua en la que se ha disuelto un carbohidrato y cantidades

micromoleculares de boro, calcio o ambos. El carbohidrato más usado es la sacarosa y raramente otros carbohidratos han sido efectivos. Igual ha ocurrido para el polen del olivo en que el azúcar de elección ha sido la sacarosa al 10 %. Los ensayos realizados con manitol a diferentes concentraciones fueron negativos, obteniéndose sólo un 10 % de germinación. La función primaria del azúcar es servir como fuente energética de carbon para que puedan iniciarse los procesos metabólicos que desencadenan la germinación y el crecimiento del tubo polínico. Una función secundaria sería como regulador osmótico para prevenir que el polen se colapse o estalle. El PEG también regula la presión osmótica y previene que los tubos estallen (Read y col., 1993). La presencia de PEG en el medio utilizado para el olivo no influye en cuanto al porcentaje de germinación, pero si evita que los tubos estallen y se rompan cuando la concentración está entre 7.5 y 10%. El PEG metabólicamente es relativamente inerte y no puede entrar en las células (Subbaiah, 1984), mientras que la sacarosa y/o monosacáridos entran en el polen y aumentan la ya elevada concentración interna (Kawaguchi y col., 1996).

Entre los papeles atribuidos al boro está el de facilitar la toma del azúcar del medio. El azúcar a su vez contribuye a la biosíntesis de precursores de la pared celular. El Ca^{2+} es otro de los requerimientos para la germinación del tubo polínico que ha sido ampliamente demostrado (Steer y Steer, 1989). Estudios recientes revelan que un flujo extracelular de Ca^{2+} está directamente implicado en el crecimiento apical del tubo (Feijó y col., 1995; Malhó y col., 1995; Malhó y Trewavas, 1996; Pierson y col., 1996).

Una gran variedad de sustancias han sido añadidas empíricamente al medio de cultivo para estimular la germinación y crecimiento del tubo polínico. Podemos mencionar varios tipos de azúcares, aminoácidos, nucleótidos (Tupy, 1966), hormonas vegetales (Rajam, 1989), flavonoides (Ylstra y col., 1992), y otros compuestos químicos. En el caso del polen del olivo se probó entre otros con fragmentos de estigma ya que también mejoran notablemente la germinación en otras especies. Efectivamente se obtuvo un incremento en la germinación, sin embargo no los utilizamos habitualmente, puesto que sólo disponíamos de estigmas en la época de la floración.

Nuestros ensayos han mostrado que con el polen del olivo el mejor rendimiento de la germinación se obtiene con el medio de Brewarbaker y Kwack (1963) con una concentración de sacarosa del 10%, pH 5.5 - 6.5 y a 25 °C, pudiendose utilizar polen conservado a - 80 °C.

4. Dinámica de la germinación

El tamaño pequeño del grano de polen, junto con la presencia de una gruesa pared son grandes limitaciones para obtener información mediante estudios con material vivo al microscopio óptico acerca de la convulsión citoplásmica que experimenta el grano en relación con la salida del tubo. Existen indicaciones de que minutos después de la hidratación, el citoplasma presenta unas corrientes rotacionales. El crecimiento del tubo ha sido asociado con el crecimiento apical rápido, unidireccional de otro tipo de células como son los pelos radicales o las hifas de los hongos. En términos prácticos, el crecimiento apical asegura que a pesar de la longitud considerable que el tubo llega a alcanzar, el citoplasma involucrado en esta actividad se concentra en una reducida porción del tubo polínico, mayoritariamente en su ápice.

En el tubo polínico se puede distinguir una parte distal del grano, en la que el citoplasma fluye continuamente, y una parte proximal, aparentemente vacía, la cual es interrumpida a intervalos por "plugs" de calosa. Obviamente el interés de la mayoría de los estudios se ha centrado en el crecimiento de la región distal del ápice.

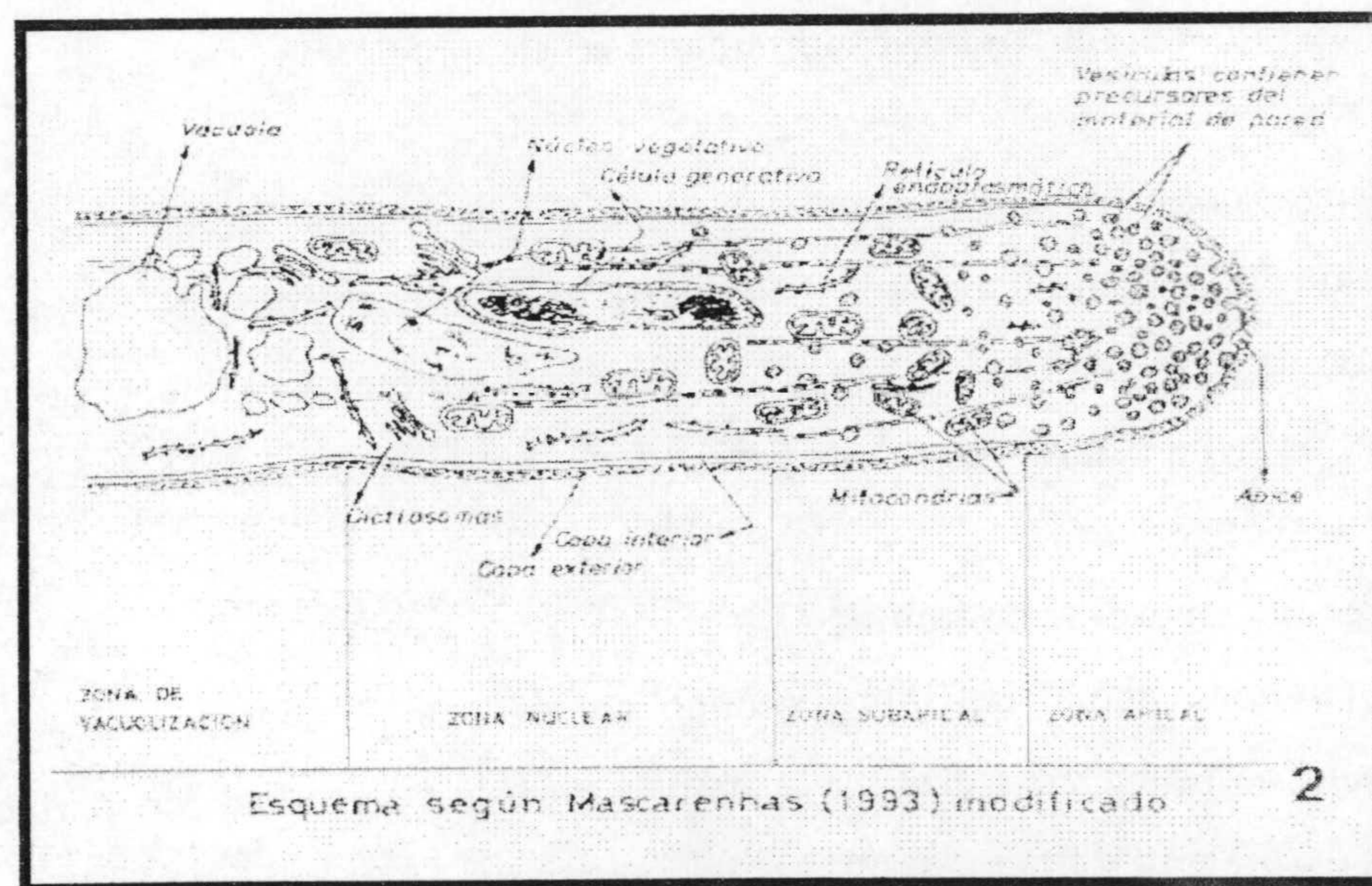
4.1. Organización del tubo polínico

El conocimiento actual del tubo polínico comenzó a principios de los años 60, y a continuado hasta nuestros días mejorando, a medida que se han ido perfeccionando las técnicas de fijación y tinción para microscopía óptica y electrónica. La imagen que hoy día tenemos comenzó a diseñarse con los estudios de Rosen y col. (1964), que fueron capaces de distinguir en el del tubo polínico de *Lilium longiflorum* dos regiones: a) una

subapical, en la que no hay crecimiento, y en la que se acumulaban mitocondrias, sistema de Golgi, RE, y algunos plastos y cuerpos lipídicos, y a la que se le atribuía una actividad biosintética asociada con el crecimiento y b) una región apical de crecimiento, que sólo presentaba una abundancia de vesículas, sin ninguna otra organela citoplásmica.

Estudios posteriores han confirmado esta estructura general del tubo polínico para otras especies, describiéndola como una serie de organelas distribuidas de manera no uniforme, y concentradas en una desproporcionada pequeña cantidad del citoplasma (Sassen, 1964; Cresti y Van Went, 1976; Cresti y col., 1977; 1985; Reiss y Herth, 1979a).

Los modelos propuestos para representar la organización celular del tubo polínico (Cresti y col., 1977; Cresti y col., 1979; Uwate y Lin, 1980), quedan reflejados en el siguiente esquema de Mascarenhas (1993), modificado:



Comenzando desde la región distal del ápice a la región proximal, se pueden distinguir las siguientes zonas: a) zona apical o de crecimiento, enriquecida por vesículas; b) zona

subapical poblada por organelas, que a su vez se puede subdividir en una zona mayoritariamente de dictiosomas, y otra mitocondrial, RE, algunos plastos y cuerpos lipídicos; c) zona nuclear, así llamada debido a la presencia del núcleo vegetativo y célula generativa; y d) zona vacuolar, ocupada por una gran vacuola y separada proximalmente por un plug de calosa. La polarización que presenta el tubo polínico del olivo está de acuerdo con el modelo aquí presentado y que se considera está generalizado para todas las especies hasta ahora estudiadas.

Basándose en movimientos observados en tubos polínicos *in vivo* en *Epilobium angustifolium*, se ha sugerido que estas zonas no son un bloqueo para el avance progresivo de determinadas organelas a medida que el ápice se extiende. Más bien son la expresión visible de los procesos de selección de las organelas hacia el ápice del tubo, mediante los microfilamentos de actina del citoesqueleto (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1990).

4.2. Comportamiento del núcleo vegetativo y núcleo generativo

Una de las características de la germinación del polen es que desde el inicio de la salida del tubo polínico comienza a pasar citoplasma de la célula vegetativa hacia el tubo que emerge en un rápido flujo, siguiéndole el núcleo vegetativo y la célula generativa con un movimiento más lento. Existe una controversia sobre cuál de los dos núcleos, el núcleo vegetativo o el núcleo generativo, entra primero en el tubo. Se han citado ejemplos en los que a) el núcleo vegetativo precede a la célula generativa, b) en los que la célula generativa entra primero y c) en los que la célula generativa adelanta al núcleo vegetativo una vez que ambos están en el tubo polínico (Venema y Koopmans, 1962). Según nuestros resultados, esto último es lo que ocurre en el polen del olivo. Independientemente del orden de migración de ambos núcleos, siempre se encuentran estrechamente unidos, y tienden a desplazarse hacia el ápice del tubo, constituyendo lo que se conoce como *unidad germinal*: el conjunto del núcleo vegetativo y la célula generativa (Dumas y col., 1984; 1985; Russel, 1992).

El desplazamiento de los núcleos a lo largo del tubo durante su crecimiento es otra cuestión que despierta el interés de los investigadores. Inicialmente se atribuyó una relación entre las corrientes citoplásmicas y el del desplazamiento del núcleo vegetativo (Venema y Koopmans, 1962). Posteriormente con el descubrimiento de microfilamentos de actina en el tubo polínico surgió la hipótesis de que la fuerza que hace desplazar al núcleo vegetativo procede de la interacción entre la membrana externa de la cubierta nuclear y la actina del citoesqueleto (Heslop-Harrison y Haslop-Harrison, 1988a). Las observaciones realizadas en grano de polen de *Pyrus communis* (Tiwari y Polito, 1988a), *Narcissus pseudonarcissus* y *Galanthus nivalis* (Heslop-Harrison y Haslop-Harrison, 1989c) indican que los microfilamentos están probablemente implicados en la migración de los núcleos. Aunque los microtúbulos también están asociados con el núcleo vegetativo dentro del tubo polínico (Heslop-Harrison y col., 1988; Tiwari y Polito, 1988b), el hecho de que no se bloquee el movimiento nuclear cuando los microtúbulos son eliminados por inhibidores (Heslop-Harrison y col., 1988), hace que los microtúbulos se excluyan como posibles agentes involucrados en la migración del núcleo vegetativo. Las mismas conclusiones que se hacen para el núcleo vegetativo, se pueden hacer extensivas para la célula generativa, aunque la información con que contamos en este último caso es mucho más limitada. En base a la persistente asociación de los microtúbulos con la célula generativa y células espermáticas (Cresti y col., 1986; Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1986c; Lancelle y col., 1987; Zhou y col., 1990), se ha sugerido para los microtúbulos la posible función de mantener la forma de la célula generativa dentro del tubo (Heslop-Harrison y col., 1988).

El núcleo vegetativo parece involucrado en la síntesis del mRNA necesaria en las primeras etapas de la germinación y desarrollo del tubo polínico. La producción de mRNA en el núcleo vegetativo decrece después de la germinación (Stanley and Linskens 1974; Mascarenhas 1975; Shivanna and Johri 1985).

4.3. Paredes celulares del tubo polínico

La estructura de la pared del tubo polínico es un objeto de estudio fascinante. La lista de especies en las que se ha estudiado es limitado y se concentran en un reducido número de familias (Liliaceas, Solanaceas y Poaceas).

La estructura definitiva de la pared ya madura se localiza en la región proximal del tubo y desde aquí va cambiando hacia la región terminal del ápice o zona de crecimiento. Existen datos de que la pared del tubo en la zona proximal (zona donde no hay crecimiento) está constituida de una capa péctica externa, una capa celulósica media y una cubierta interna calósica que no esta presente en el ápice (Engels, 1974b; Reynolds y Dashek, 1976; Anderson y col., 1987; Heslop-Harrison, 1987). En *Nicotiana tabacum* sin embargo, se han descrito sólo dos capas, una externa, que se continua en la región del ápice y se le llama pared primaria y otra interna, que sólo está presente en la región proximal y que es la última en formarse y corresponde a la pared secundaria (Kroh y Knuiman, 1982). En el olivo, la estructura de la pared del tubo polínico está constituida por tres capas análogas a las mencionadas en el primer modelo aquí descrito y que parece ser el más común entre las especies estudiadas.

Estudios inmunocitoquímicos recientes han confirmado la distribución de los componentes de la pared que ya habían sido identificados anteriormente mediante digestiones enzimáticas (Roggen y Stanley, 1969; 1971). La localización inmunocitoquímica del ácido poligalacturónico (pectina no esterificada) y de pectinas metil-esterificadas, mediante anticuerpos monoclonales JIM5 y JIM7, en la pared de tubos polínicos de más de 20 angiospermas, entre las que incluimos nuestros resultados en el olivo, han supuesto una importante contribución al significado fisiológico y funcional de la esterificación de las proteínas a lo largo del tubo polínico. Las diferencias de marcado entre JIM7 (reconoce epítopos de pectinas esterificadas) y JIM5 (reconoce epítopos de pectinas no esterificadas) indican que la capa pectínica en el ápice del tubo es más rica en la forma esterificada del carbohidrato que en la forma proximal (Li y col., 1994; Geitmann y col., 1995). Estos resultados muestran que en la

distribución de pectinas se sigue un complejo programa de desarrollo. La presencia de pectinas esterificadas en el ápice, confiere una mayor flexibilidad a esta región que es la zona de crecimiento. Cuando las pectinas se desesterifican, se unen entre si mediante Ca^{2+} y adquieren una mayor rigidez. Esto es lo que pasa en la pared de la región proximal del tubo. Un posible papel de las pectinas desesterificadas puede ser el facilitar el paso del tubo a través del estilo ya que producen rigidez. Esta función puede llevarse a cabo por un programa de adhesión entre las paredes del tubo y las células del tejido transmisor, mediante una interacción específica en la que están implicadas pectinas y moléculas secretadas, tales como arabinogalactanos (Jauh y Lord, 1996).

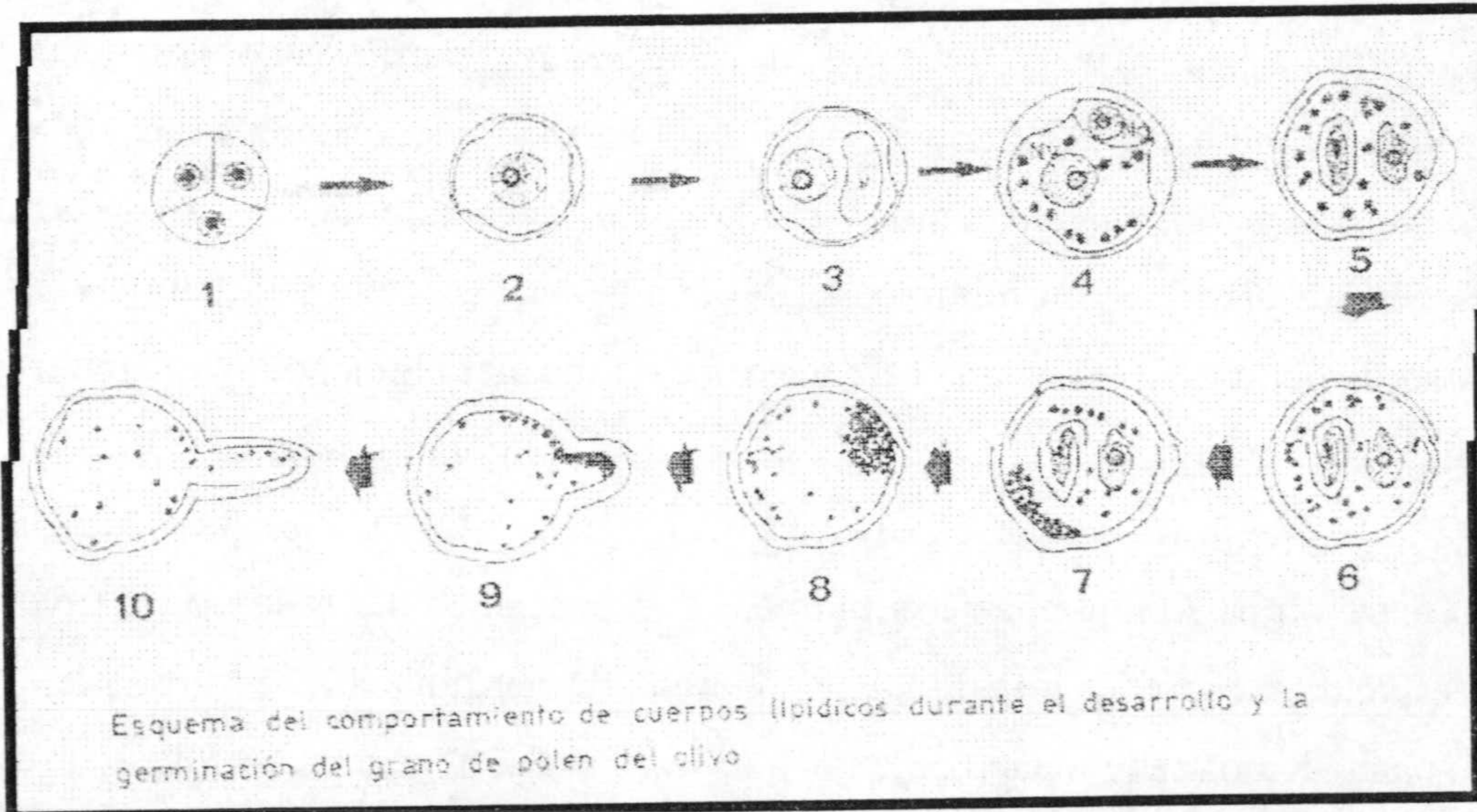
La información disponible hasta ahora indica que la pared del tubo polínico es altamente específica en su composición y en la proporción de azúcares y proteínas lo que le confieren unas particularidades funcionales propias a esta pared.

4.4. Comportamiento de lípidos de reserva

La presencia de cuerpos lipídicos durante la maduración del polen es una característica del polen del olivo, en donde hay una coexistencia entre lípidos y almidón como sustancias de reserva. Antes de la antesis el contenido de almidón llega a desaparecer, incrementándose el número de cuerpos lipídicos (Fernández y Rodríguez-García 1994, Rodríguez-García y Fernández; 1990).

La existencia de cuerpos lipídicos durante el desarrollo del polen también ha sido observada en diversas especies (Fisher y col. 1968, Jensen y col, 1968, Brighna y col. 1981, Wetzell y Jensen 1992), así como dentro del tubo polínico. Sin embargo según nuestro conocimiento no hay estudios sistemáticos sobre el comportamiento de los lípidos de reserva durante la gametogénesis. Nuestros resultados en el polen del olivo revelan un importante papel de los cuerpos lipídicos como sustancias de reserva y, sugieren que los lípidos están directamente implicados en la actividad metabólica del polen durante la germinación.

Estudios previos del grupo junto con los resultados de esta memoria han contribuido al actual estado del conocimiento sobre el comportamiento de los cuerpos lipídicos durante el desarrollo y germinación del polen en el olivo y que se refleja en el siguiente esquema.



La imagen anterior nos muestra una marcada polaridad de los cuerpos lipídicos ya en las etapas tempranas de la germinación, siendo posible utilizar esta característica como marcador celular de los granos que van a germinar.

4.5. Comportamiento del alergeno mayoritario del olivo, Ole e 1

Entre las proteínas acumuladas en el polen, los alergenosen merecen una especial atención por sus implicaciones en la salud pública como responsables de los catarros primaverales y otras molestias causadas como reacción del organismo a estas proteínas. El polen del olivo es rico en alergenosen y nos interesa conocer la función biológica de estas proteínas en el complejo proceso reproductor de las plantas. En esta memoria hemos continuado el estudio ya iniciado por el grupo en años anteriores, del alergeno mayoritario Ole e 1.

Los experimentos de inmunoblot y de inmunolocalización de Ole e 1 llevados a cabo confirman que el alérgeno mayoritario del olivo Ole e 1 está presente en cantidades elevadas tanto en el grano de polen como en el tubo polínico durante la germinación in vitro. Dicho alérgeno se localiza en sus tres variantes (no glucosilada, mono y diglucosilada), tal como ha sido descrito en el grano de polen maduro (Lauzurica y col., 1988a,b; Villalba y col., 1990; Batanero y col., 1994) y en los estadios finales de su desarrollo (Alché y col., 1999). En ningún caso se apreciaron variaciones en la proporción relativa de estas tres variantes. De ellas, la monoglucosilada es la variante más abundante comparativamente, y por tanto la única detectable en los casos en que los niveles de esta proteína son mínimos como ocurre en los medios de cultivo. Este elevado grado de polimorfismo es una característica de los alérgenos polínicos como ya ha sido indicado en gran número de especies entre las que figuran gramíneas (Johnson y Marsh, 1965), *Ambrosia* (Bond y col., 1991; Griffith y col., 1991) y abedul (Swoboda y col., 1995) entre otras. Aunque hasta el momento no poseemos datos sobre los niveles de los correspondientes transcritos de Ole e 1 durante la germinación in vitro, Alché y col. (1999) han demostrado recientemente que la expresión génica de Ole e 1 está regulada probablemente a nivel transcripcional, por lo que puede asumirse que dichos niveles deben ser paralelos a los niveles de proteína detectados en este trabajo. Los transcritos de Ole e 1, detectados mediante RT-PCR comenzaron a aparecer en el estadio de tetradas tardías, acumulándose ya de forma masiva en el polen maduro. Mediante técnicas de hibridación in situ tanto a MO como a MET, dichos transcritos fueron observados por estos autores tanto en el tejido esporofítico (tapetum) como en las microsporas.

La localización ultraestructural de los alérgenos del polen conectan los resultados bioquímicos con las características morfológicas de la célula. El interés de la localización de los alérgenos es además de indicarnos el lugar donde se almacenan ayudarnos a conocer el lugar donde se realiza la síntesis de esas moléculas dentro del grano de polen y además nos pueden dar indicios sobre su posible función. Proteínas alérgicas han sido localizadas en el polen de diversas especies como centeno (Smart y

Knox, 1980; Staff y col., 1990), abedul (Grote, 1991), *Phleum pratense* (Grote y col., 1994). Sin embargo en ninguna de estas especies se ha indicado que las proteínas alergénicas estuvieran localizadas en el RE. En el caso del polen del olivo, diversos estudios han demostrado que el RER es el lugar tanto de síntesis como de almacenamiento de esta proteína (Rodríguez-García y col., 1995; b; Alché y col., 1999), siguiendo el patrón ampliamente difundido de síntesis de la proteína en los ribosomas adosados al RE, y co-traslación al lumen de este sistema de membranas (Oparka y Harris, 1982; Krishnan y col., 1986).

Las funciones de Ole e 1 en el grano de polen son hasta la fecha claramente especulativas. Dichas funciones han sido deducidas a partir de los experimentos de represión con transcritos complementarios llevados a cabo por Muschietti y col. (1994) con el producto del gen *LAT52* de tomate, con el que la secuencia de Ole e 1 comparte una homología relativamente alta. Estos autores describieron que la expresión reducida de este producto génico se correspondía con un funcionamiento anormal del grano de polen, que presentaba deficiencias tanto en su hidratación como en su germinación. La secuencia aminoacídica de Ole e 1 muestra una similitud relevante con los polipéptidos codificados por los genes *LAT52* de polen de tomate (36% de identidad), y *Zmc13* de polen de maíz (38% de identidad). Ambos productos génicos juegan aparentemente un importante papel en los fenómenos celulares tardíos que tienen lugar en el desarrollo del polen, como son la maduración, la hidratación, la germinación y/o el crecimiento del tubo polínico (Hanson y col., 1989; Muschietti y col., 1994). Alché y col., (1999) han sugerido que el elevado contenido en Ole e 1 del grano de polen del olivo (hasta un 20% del peso total de proteína del grano), puede correlacionarse con una posible función de esta proteína causando el gradiente osmótico necesario para la germinación. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que Ole e 1 continua expresándose en niveles elevados durante todo el proceso de germinación in vitro, contribuyendo por tanto al mantenimiento de dicho gradiente osmótico, y por tanto al crecimiento del tubo polínico. El ligero descenso que experimentan los niveles del alérgeno a lo largo de la hidratación y germinación cuando se comparan con los niveles presentes en el polen

maduro sugiere que esta proteína bien puede ser metabolizada y/o bien puede salir al exterior. Prueba a favor de esta última posibilidad es su presencia en la matriz extracelular del tubo dentro del estigma, como lo demuestran nuestros resultados de inmunolocalización. El hecho de que la proteína se mantiene en niveles significativamente más elevados en los granos de polen incapaces de germinar que en las muestras equivalentes correspondientes a polen germinado indican que esta proteína está implicada directamente en la germinación y crecimiento del tubo.

La presencia de Ole e 1 en el medio de cultivo in vitro esta en consonancia con el carácter hidrofílico de la proteína (Batanero y col., 1994), así como de su facilidad para difundir en medios acuosos. Esta propiedad puede considerarse uno de los desencadenantes de los fenómenos de alergia, una vez que los granos de polen se ponen en contacto con las mucosas (nasal, ocular, bronquial...) de los pacientes.

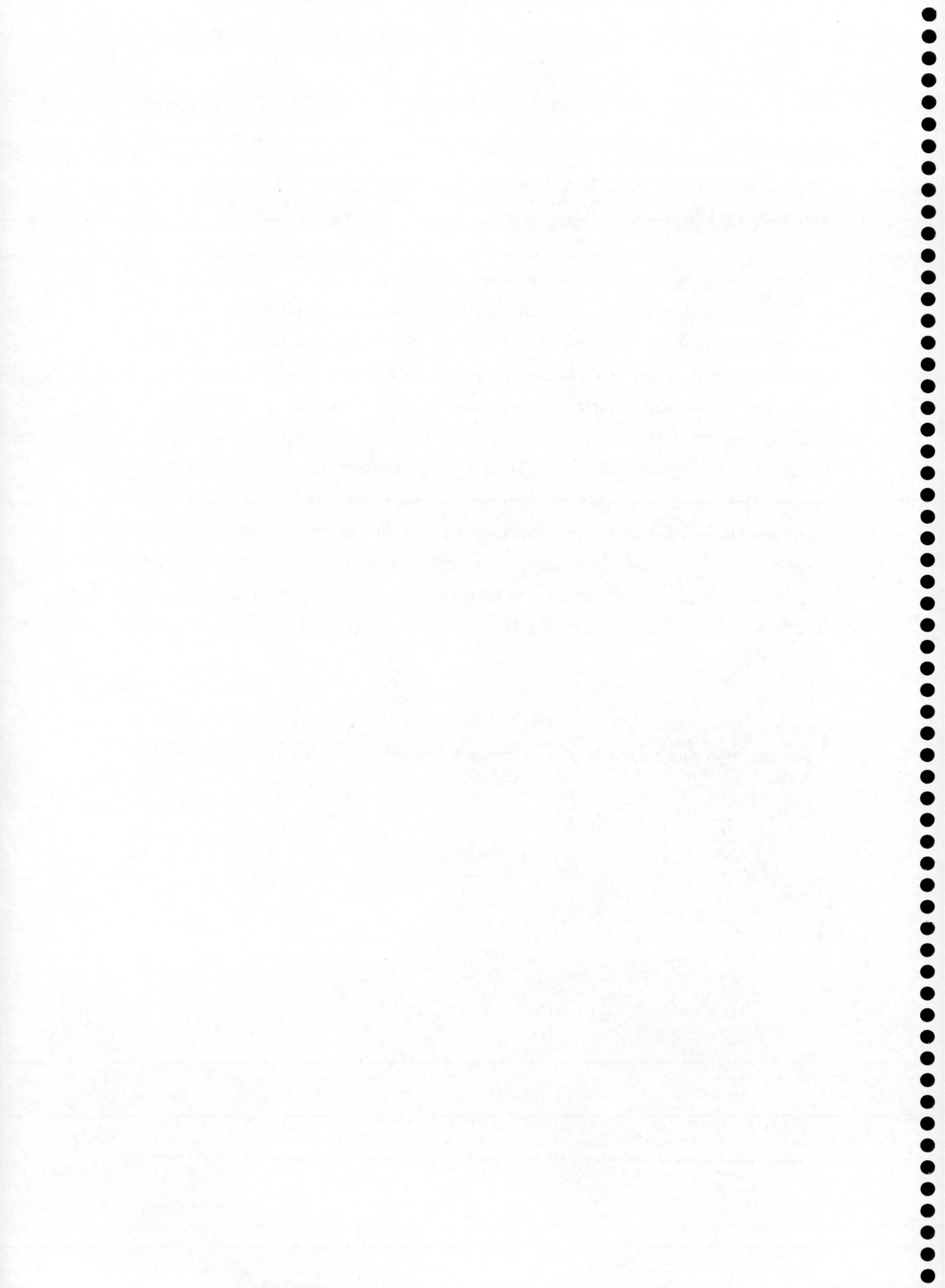
5. Protoplastos a partir del tubo polínico

Hoy día los protoplastos representan una herramienta de trabajo muy útil para el biotecnólogo vegetal. La pared celular de las células vegetales dificulta la utilización de las modernas técnicas que requieren manipulación externa del plasmalema, como son electroporación, fusión de núcleos, y otras que en la actualidad están siendo aplicadas en biotecnología. La utilización de estas técnicas en las células vegetales se optimiza cuando se les elimina su pared, es decir, se obtienen protoplastos. En los últimos años estamos asistiendo a un rápido progreso en el desarrollo del aislamiento, transformación y posterior cultivo de protoplastos, que sin duda podrán tener una aplicación directa en la selección genética y mejora vegetal (Went y Kwee, 1990; Majewska-Sawka y col., 1994; Jazdzewska y col., 1995). La utilización de células haploides para obtener protoplastos presenta una serie de ventajas ya que sólo poseen un set de alelos en cada locus, lo que facilita enormemente la inducción y detección de mutaciones. Por eso los protoplastos haploides obtenidos de polen (Kroh y Knuiman, 1988; Rutten y Derksen,

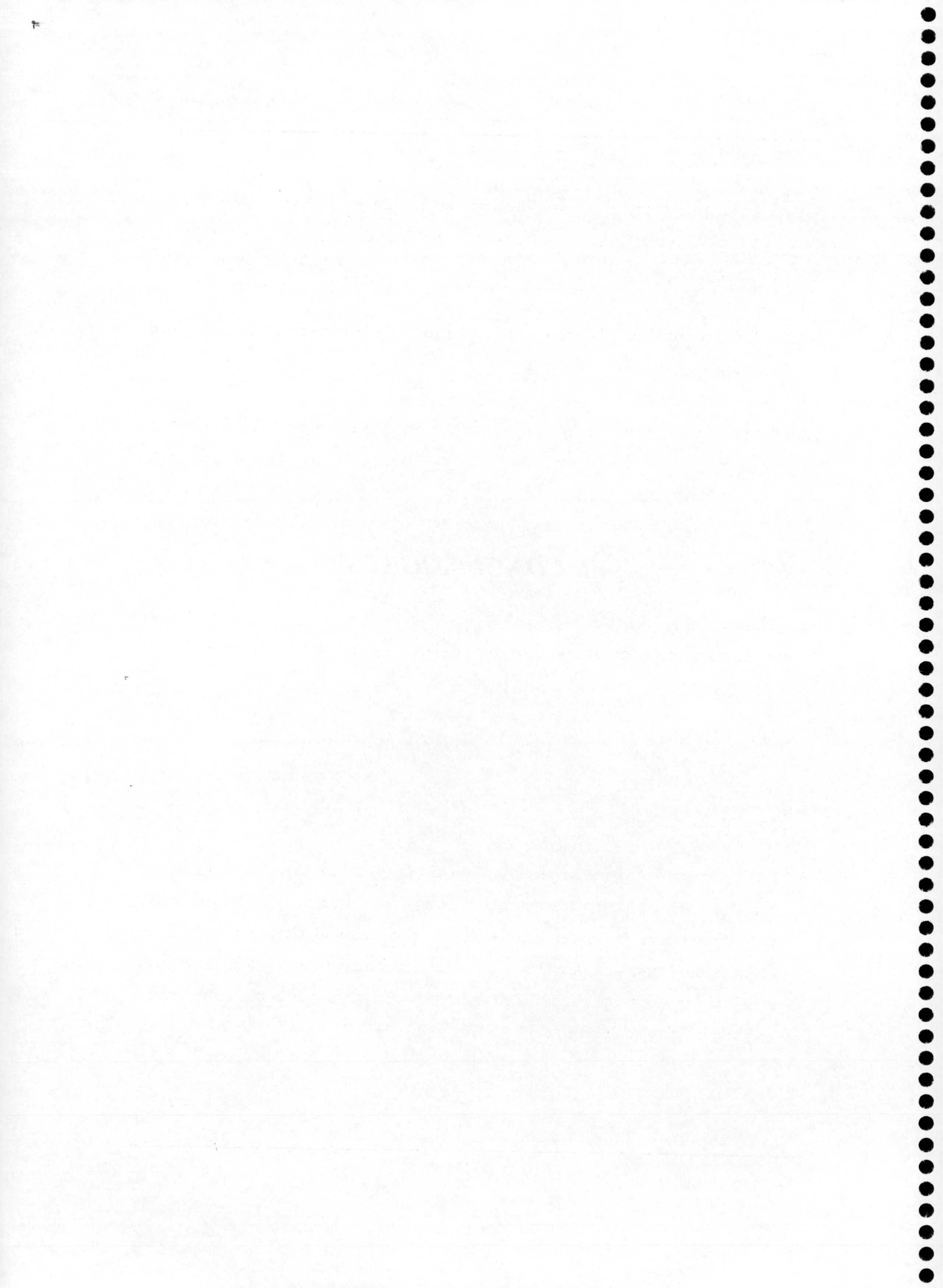
1990) o de megasporocitos (Went y Kwee, 1990; Mouritzen y Holm, 1995) tienen una importancia experimental añadida.

La resistencia de la exina del polen para ser eliminada ha hecho que algunos autores prefieran el tubo polínico como material de partida para la obtención de estos protoplastos haploides. Otra ventaja que presenta el tubo polínico es que se pueden obtener protoplastos con y sin núcleo ya que de cada tubo se pueden formar uno o varios protoplastos (subprotoplastos) y es interesante para estudiar el comportamiento y grado de viabilidad de los protoplastos sin núcleo y determinar el papel del núcleo y de la célula generativa en procesos celulares como regeneración y crecimiento. Los protoplastos regeneran rápidamente su pared cuando se les introduce en condiciones adecuadas, pero se desconocen los mecanismos internos por los que una célula aislada y desprovista artificialmente de su pared es capaz de regenerarla y se conoce muy poco acerca de los orgánulos involucrados en la regeneración de dicha pared (Pojnar y col., 1967; Willison y Cocking, 1972; Fowke y col., 1973; Mori y col., 1983; Pesacreta y Lucas, 1984).

Nuestros buenos resultados en la obtención de protoplastos a partir del tubo polínico es un primer paso para su aplicación en estudios sobre formación y desarrollo de paredes.



VI. CONCLUSIONES



La memoria que se presenta constituye una aportación original al conocimiento del polen del olivo durante la germinación y que ha dado lugar a las siguientes conclusiones:

1. La forma y tamaño del grano una vez liberado de la antera, refleja el grado de hidratación del mismo.
2. El polen del olivo es posible hacerlo germinar *in vitro* en un medio líquido con una composición análoga al utilizado por Brewbaker y Kwack (1963) para otras especies. El porcentaje de germinación alcanzado después de un año de almacenaje a -80°C es de un 40%, cantidad suficiente para desarrollar los estudios propuestos.
3. El polen suelto recién liberado de la antera presenta un mayor porcentaje de germinación (62%) que el polen almacenado a bajas temperaturas (40%). La temperatura más idónea para conservar el polen es de -80°C y de -170°C (nitrógeno líquido).
4. La incorporación de un 10% de PGE al medio no influye no en el nivel de germinación, pero si evita que los tubos se rompen como consecuencia de un choque osmótico .
5. La tinción con DAPI nos ha permitido conocer que la salida de los nucleos del grano hacia el tubo no ocurre de manera arbitraria, sino que primero sale el nucleo vegetativo y una vez en el tubo el nucleo generativo lo alcanza y lo adelanta. Después de 7 horas de germinación, el nucleo generativo que va delante se puede dividir y dar lugar a los dos nucleos gaméticos, mientras que el nucleo vegetativo presenta indicios de degeneración.

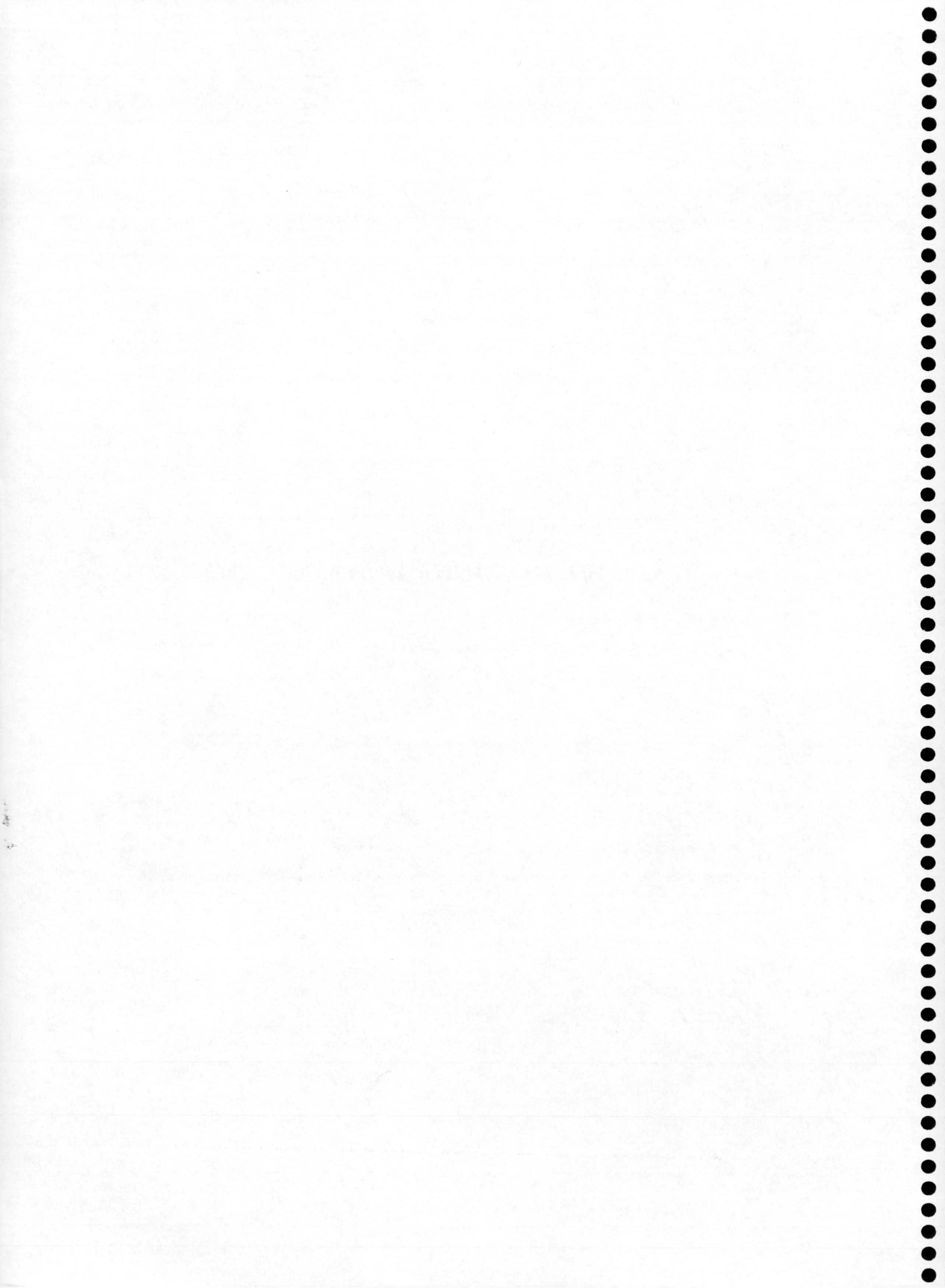
UNIVERSIDAD DE GRANADA

28 JUN. 2000

COMISION DE DOCTORADO

6. Nuestros resultados confirman la polaridad previamente descrita para el tubo polínico de otras especies estudiadas. Después de 3 horas en el medio de germinación, el tubo polínico en el olivo presenta una polarización de los orgánulos celulares, según la cual estos se distribuyen en cuatro zonas previamente descritas para otras especies: zona apical, subapical, nuclear y vacuolar. Pero además, hay evidencias para afirmar que esta polarización comienza ya antes de que se inicie la salida del tubo polínico, lo cual no había sido observado anteriormente.
7. Según los resultados de inmunolocalización, la pared apical del tubo polínico está constituida por una delgada capa de pectinas esterificadas, mientras que a lo largo del tubo la pared está constituida por pectinas desesterificadas, calosa y otro material no identificado, pero que por analogía con otras especies se postula que es de naturaleza celulósica.
8. En el olivo, los lípidos de reserva tienen un papel evidente en la germinación y crecimiento del tubo polínico ya que su abundancia y marcada polarización en el grano durante la fase de activación, decrece paulatinamente a medida que crece el tubo polínico. Además, la temprana polarización que presentan los cuerpos lipídicos también nos sirve como marcador de granos activados que van a germinar y que los distinguen de los granos estériles.
9. La presencia del alérgeno mayoritario, Ole e 1, tanto en las cisternas de RE dentro del tubo, como en la matriz extracelular del tubo y tejido transmisor del estilo son pruebas a favor de que esta proteína está directamente implicada en el crecimiento del tubo polínico en el estigma hacia la ovocélula.
10. El tubo polínico es un material apropiado para obtener protoplastos con cierta facilidad y proporciona un buen sistema para estudios básicos como puede ser la formación y regeneración de paredes.

VII. BIBLIOGRAFÍA



- ALCHE, J.D., CASTRO, A.J., & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. (1999). Localization of transcripts corresponding to the major allergen from olive pollen (*Ole e1*) by electron microscopic non-radioactive in situ RT-PCR. Enviado para su publicación a Micron.
- ALCHE, J.D., FERNÁNDEZ, M. C., & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. (1993). Cytochemical features common to nucleoli and cytoplasmic nucleoloids of *Olea europaea* meiocytes: detección of rRNA by in situ hybridation. *J.Cell Sci.* 107:621-6.
- ALTAMURA, M. M., PASCUA, G., & MAZZOLANI. (1982a). Development of the female gametophyte in *Olea europaea* L. *Annalo di Botanica.* XL: 111-117.
- ALTAMURA, M. M., PASCUA, G., & MAZZOLANI. (1982b). Embryogenesis in *Olea europaea* L. *Annalo di Botanica.* XL: 141-152.
- ANDERSON, M. A., HARRIS, P. J., BONING,I., & CLARKE, A. E. (1987). Immunogold localization of α -L-arabinofuranosyl residues in pollen tubes of *Nicotiana alata* Link et Otto. *Planta.* 171: 438-442.
- BAJAJ, Y. P. S. (1985). Cryopreservation of plant cell cultures and its prospects in agricultural and forest biotechnology. *Int Worksh Int Centre Genet Eng Biotechnol New Delhi.* 109-131.
- BAJAJ, Y. P. S. (1987). Cryoprese rvation of pollen and pollen embryos, and the estabilishment of pollen banks. *Int Rev Cytol* 107:397-420.
- BARNABÁS, B. (1994). Preservation of Maize Pollen. *Biotchnologie in Agriculture and Forestry.* 25. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- BARNABÁS, B., & RAJKI, E (1976). Storage of maize (*Zea mays* L.) pollen in liquid nitrogen at -196° C. *Euphytica.* 25:747-752.
- BATANERO, E., VILLALBA, M., & RODRÍGUEZ, R. (1994). Glycosylation site of the major allergen from olive tree. Allergenic implications of the carbohydrate moiety. *Mol. Immunol.*;31: 31-37.
- BATANERO, E., VILLALBA, M., LEDESMA, A., PUENTE, X. S., & RODRÍGUEZ, R. (1996). *Ole e 3*, an olive-tree allergen, belongs to a widespread family of pollen

- proteins. *Eur J Biochem.*;241:772-778.
- BEWLEY, J. D., & BLACK, M. (1982). Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Vol. 2. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
 - BOND, J. F., GARMAN, R. D., KEATING, K. M., BRINER, T. J., RAFNAR, T., KAPPLER, D. G. & ROGERS, B. L. (1991). Multiple *Amb a I* allergens demonstrate specific reactivity with IgE and T cells from ragweed-allergic patients. *J. Immunol.* 146:3380-3385.
 - BOUSQUET, J., GUERIN, B., HEWITT, B., LIM, S., & MICHEL, F. B. (1985) Allergy in the Mediterranean area III: Cross-reactivity among *Oleaceae* pollens. *Clin Allergy.* 15:439-448.
 - BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
 - BRADLEY, M. V., & GRIGGS, W. H. (1963). Morphological evidence of incompatibility in *Olea europaea* L. *Phytimorphology.* 13 (2): 141-156.
 - BREWBAKER, J. L. (1959). Pollen cytology and self-incompability systems in plants. *J Hered.* 48: 271-277.
 - BREWBAKER, J. L., & KWACK, B. H. (1963). The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am. J. Bot.* 50: 859-865.
 - BRIGHIGNA, L., FIORDI, A. C., & PALANDRI, M. R. (1981). Ultrastructural investigations on the two-nucleate pollen grain of *Tillandsia caput-medusae* Morr. (Bromeliaceae). *Am. J. Bot.* 68:1033-1041.
 - BROOKS, J., & SHAW, G. (1978). Sporopollenin: a review of its chemistry, paleochemistry and geochemistry. *Grana* 17:91-97.
 - CLARKE, E., & STEER, M. W. (1983). Cytoplasmic structure of germinated and ungerminated pollen grains of *Tradescantia virginiana*. *Cariologia.* 36:299-305.
 - COOPER, R. L., OSBORN, J. M., & PHILBRICK, C.T. (1987). Comparative Pollen Morphology and Ultrastructure of Callitrichaceae. *American Journal of Botany.* 2: 161-

175.

- CRESTI, M. & VANT-WENT, J. L. (1976). Callose deposition and plug formation in *Petunia* pollen tube *in situ*. *Planta*. 133:35-40.
- CRESTI, M. CIAMOLINI, F., PACINI, E., SARFATTI, G., VAN WENT, J.L. & WILLEMSE, M.T.M. (1979) Ultrastructural differences between compatible and incompatible pollen tube in the stilar transmitting tissue of *Petunia hybrida*. *J. Sumicros. Cytol.* 11: 209-219.
- CRESTI, M., & KEIJZER, C. J. (1985). The structure of the endoplasmic reticulum in pollen grains and pollen tubes, after osmium tetroxide-potassium ferricyanide staining. *J. Submicros. Cytol.* 17:615:620.
- CRESTI, M., & TIEZZI, A. (1990). Germination and pollen-tube Formation. *In microspores: Evolution and Ontogeny*, ed. S Blackmore, RB Knox. 239. *New York: Academic*.
- CRESTI, M., CIAMPOLINI, F., & KAPIL, R. N. (1983). Ultrastructure of S₃ S₄ genotype pollen grains of *Oenothera organensis*. *Acta Bot. Neerl.* 32:177-183.
- CRESTI, M., CIAMPOLINI, F., & SARFATTI, G. (1980). Ultrastructural investigations on *Lycopersinum peruvianum* pollen activation and pollen tube organization after self and cross-pollination. *Planta*. 150:211-217.
- CRESTI, M., CIAMPOLINI, F., & TIEZZI, A. (1986). Ultrastructural studies on *Nicotiana tabacum* pollen tube in different culture medium (preliminary results). *Acta Bot. Neerl.* 35:285-292.
- CRESTI, M., CIAMPOLINI, F., MULCAHY, D. L. M., & MULCHAY, G. (1985). Ultrastructure of *Nicotiana alata* pollen, its germination and early tube formation. *Am. J. Bot.* 72: 719-727.
- CRESTI, M., PACINI, E., CIAMPOLINI, F., & SARFATTI, G. (1977). Germination and early tube development *in vitro* of *Lycopersinum peruvianum* pollen. *ultrastructural features*. 136:305-312.
- CRESTI, M., PACINI, E., SARFATTI, G., & SIMONCIOTI, C. (1975). Ultrastructural

- features and storage function of *Lycopersicum peruvianum* pollen. In: MULCAHY, D. L. (ed) Gamete competition in plants and animals. *North-Holland Publ, Amsterdam, The Netherlands*. 19-28
- CROWE, J. H & HOEKSTRA. F. A. (1989). Membrane phase transitions are responsible for imbibitional damage in dry pollen. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 86:520-523.
 - CUEVAS, G. J., (1992). Incompatibilidad Polen-Pistilo, Procesos Gameticos y Fructificación en Cultivares de Olivo (*OLEA EUROPAEA* L.). Tesis Doctoral de la Univessidad de Cordoba.
 - CUEVAS, J., RAPOPORT, H. F., & RALLO, L. (1995). Relationships among reproductive proceses and fruited abscission in "Arbequina" olive. *Advance in Horticultural Science*. 2: 92-96.
 - CURRIER, H. B., & STRUGGER, S. (1956). Aniline blue and fluorescence microscopy of Callose in Bulb Scales of *Allium cepa* L. *Protoplasma*. 45: 552-559.
 - CHEUNG, A. Y., WANG, H., & WU, H.-M. (1995). A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* 82:383-393.
 - DASHEK, W. V., & ROSEN, W. G. (1966). Electron microscopical localization of chemical components in the growth zone of lily pollen tubes. *Protoplasma*. 61:192-204.
 - DERKSEN, J. (1996). Pollen tubes: a model system for plant cell growth. *Bot. Acta*. 109: 341-345.
 - DERKSEN, J., PIERSON, E.S., & TRAAS, J.A. (1985). Microtubules in vegetative and generative cells of pollen tubes. *Eur. J. Cell Biol.* 38:142-148.
 - DERKSEN, J., RUTTEN, T., VAN AMSTEL, T., de WIN, A., DORIS, F., & STEER, M. (1995). Regulation of pollen tube growth. *Acta Bot. Neerl.* 44:93-102.
 - DICKSON, M.H., & 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.
 - DOUGTHY. J., HEDDERSON F., McCUBBIN. A., & DICKINSON. H. (1993). Interaction between a coat-borne peptide of brassica pollen grain and stigma S (self-incompatibility)-locus-specific glycoliproteins. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 90:467-471.

- DUMAS, C., KNOX, R. B., & GAUDE, T. (1985). The spatial association of the sperm cells and vegetative nucleus in the pollen grain of *Brassica*. *Protoplasma*. 124:168-174.
- DUMAS, C., KNOX, R. B., McCONCHIE, C. A., & RUSSELL, S. D. (1984). Emerging physiological concepts in fertilization. *What's New in Plant physiol.* 15:17-20.
- ELLEMAN, C. J. & DICKINSON, H.G. (1986). Pollen-stigma interaction in *Brassica*. IV. Structural reorganization in the pollen grains during hydration. *J. Cell Sci.* 80:141-157.
- ELLEMAN, C. J., FRANCLIN-TONG, V., & DICKINSON, H. G. (1992). Pollinization in species with dry stigmas: the nature of the early stigmatic reponse and pathway taken by pollen tubes. *New Phytol.* 121: 413-424.
- ENGELS, F. M. (1974). Function of Golgi vesicles in relation to cell wall synthesis in germinating *Petunia* pollen. III. The ultrastructure of the tube wall. *Acta Bot. Neerl.* 23: 201-207.
- FEIJÓ, J. A., MALHÓ, R., & OBERMEYER, G. (1995). Ion dynamics and its possible role during *in vitro* pollen germination and tube growth. *Protoplasma*. 187: 155-167.
- FERNÁNDEZ, M. C. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. (1994). Ultrastructural and morphometric studies of cytoplasmic changes during *Olea europaea* pollen grain maturation. In: *Trabajos de Palinología Básica y Aplicada (Univ. De Valencia, ed. I. Mateu)*. pp. 67-75.
- FERNÁNDEZ, M. C. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. (1995). Pollen grain apertures in *Olea europaea* L. (*Oleaceae*). *Review of Paleobotany and Palynogy.* 85:99-109.
- FERNÁNDEZ, M. C., & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. (1989). Developmental changes in the aperture during pollen grain ontogeny in *Olea europaea* L. *New Phytologie*. Vol 11:717-723.
- FERNÁNDEZ, M. C., & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. (1988). Pollen wall development in *Olea europaea* L. *New Phytologie.* 108:91-99.
- FERNÁNDEZ, M. C., & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I., (1990). Passage of lanthanum

through the pollen wall of *Olea europaea* during pollen development. *Plant Cell Reports*. Vol 8: 667-761.

- FERNÁNDEZ, M. C., ROMERO, A. T., & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I (1992). Form and function of the aperture configuration in *Lycopersinum esculentum* (Solanaceae). *Review of Paleobotany and Palynology*. 72:41-48.
- FERNÁNDEZ, M.C., OLMEDILLA, A., ALCHE, J. D., PALOMINO. P., LAHOZ, C. & RODRÍGUEZ- GARCÍA, M. I. (1996). Immunogold probes for light and electron microscopic localization of Ole e I in several *Oleaceae* pollens. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 44: 151-158.
- FISHER, D. B., JENSEN, W. A., & ASHTON, M. E. (1968). Histochemical studies of pollen: storage pockets in the endoplasmic reticulum (ER). *Histichemie*. 13:169-182.
- FLORIDO, J. F, GONZALEZ-DELGADO, P., SAENZ DE SAN PEDRO, B., QUIRALTE, J., ARIAS DE SAAVEDRA, J. M, PERALTA, V., & RUIZ VALENZUELA, L. (1999). High levels of *Olea europaea* pollen and relation with clinical findings. *Int. Arch. Allergy Immunol*. 119: 133-137.
- FOWKE, L. C., & COSTABEL, F. (1985). Plant protoplasts. C. R. C. Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA.
- FRANCLING-TONG, V. E., DROBAK, B. K., ALLAN, A. C., WATKINS, P. A. C., & TREWAVAS, A. J. (1996). Growth of polle tubes of *Papaver rhoeas* is regulated by slow-moving calcium wave propagated by inositol 1,4,5-triphosphate. *Plant Cell*. 8: 1305-1321.
- GEITMANN, A., HUDÁK, J., VENNIGERHOLZ, F. & WALLEs, B. (1995). Immunogold localization of pectin and callose in pollen grains and pollen tubes of *Brugmansia suaveolens* implications for the self-incompatibility reaction. *J. Plant Physiol*. 147: 225-235.
- GEITMANN, A., LI, Y. & CRESTI, M. (1995). Ultrastructural immunolocalization of periodic pectin depositions in the cell wall of *Nicotiana tabacum* pollen tubes. *Protolasma*. 187: 168-171.

- GILISSEN, L. J. W. (1977). The influence of relative humidity on the swelling of pollen grain. *in vitro*. *Planta*. 137:299-301.
- GRIFFITH ET, I.J., SMITH, P. M., POLLOCK, J., THEERAKULPISUT, P., AVJIOGLU, A., DAVIS, S., HOUGH, T., SINGH, M. B., SIMPSON, R.J., WARD, L. D., & KNOX. (1991). Cloning and sequencing of *Lol pI*, the major allergenic pollen of rye-grass pollen. *FEBS Lett.* 279:210-215.
- GROFF, E. S. (1901). A study of certain conditions affecting the setting of fruits. *Wis Agric Exp Stn Res Rep.* 18: 298:303.
- GROTE, M. (1991). Immunogold electron microscopy of soluble proteins: localization of Bet v I major allergen in ultra-thin sections of birch pollen after anhydrous fixation techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 39:1395-1401.
- GROTE, M., DOLECEK, C. H., VAN REE, R. & VALENTA, R. (1994). Immunogold electron microscopic localization of Timothy Grass (*Phleum pratense*) pollen major allergens Phl p I and Phl p V after anhydrous fixation in acrolien vapour. *J. Histochem. Cytochem.* 42:427-4331.
- HANSON, D. D., HAMILTON, D.A., TRAVIS, J.L., BASHE, D. M., & MASCARENHAS, J. P. (1989). Characterization of a pollen-specific cDNA clone from *Zea mays* and its expression. *Plant Cell* 1:173-179.
- HERRERO, M. P., & 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 pollen of rye (*Secale cereale* L.). *Ann. Bot.* 44: Suppl. 1:1-47.
- HESLOP-HARRISON, J. (1982). Pollen-stigma interaction and cross-incompatibility in the grasses. *Science.* 215: 1358-1364.
- HESLOP-HARRISON, J. (1987). Pollen germination and pollen tube growth. *Int. Rev. Cytol.* 107:1-78.
- HESLOP-HARRISON, J., & HASLOP-HARRISON, Y. (1988a). Organelle movement and fibrillar elements of the cytoskeleton in the angiosperm pollen tube. *Sex. Plant*

- Reprod.* 1: 16-24.
- HESLOP-HARRISON, J., & HASLOP-HARRISON, Y. (1988b). Some permeability properties of angiosperm pollen grains, pollen tubes and generative cells. *Sex. Plant Reprod.* 1: 65-73.
 - HESLOP-HARRISON, J., & HASLOP-HARRISON, Y. (1988c). Tubulin and male-gamete interconnections in the pollen tubes of the grass *Alopecurus pratensis*. *Ann. Bot.* 61:249-254.
 - HESLOP-HARRISON, J., & HASLOP-HARRISON, Y. (1988d). Sites of origin of the peripheral microtubule system of the vegetative cell of the angiosperm pollen tube. *Ann. Bot.* 62:455-461.
 - HESLOP-HARRISON, J., & HASLOP-HARRISON, Y. (1989). Conformation and movement of the vegetative nucleus of the angiosperm pollen tube: association with the actin cytoskeleton. *Cell Sci.* 93:299-308.
 - HESLOP-HARRISON, J., & HESLOP-HARRISON, Y. (1985). Germination of stress-tolerant *Eucalyptus* pollen. *J. Cell Sci.* 73:135-157.
 - HESLOP-HARRISON, J., & HESLOP-HARRISON, Y. (1990). Dynamics aspects of apical zonation in the angiosperm pollen tube. *Sex Plant Reprod.* 3:187-194.
 - HESLOP-HARRISON, J., & HESLOP-HARRISON, Y. (1992). Intracellular motility, the actin cytoskeleton and germinability in the pollen of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sex Plant Repr.* 5:247-255.
 - HESLOP-HARRISON, Y., REGER, B.J. & HESLOP-HARRISON, J. (1984). "The pollen-stigma interaction in the grasses. 6. The stigma(slik) of *Zea mays* L. as host to the pollens of *Sorghum bicolor* (L.) Moench and *Penenesetum amerecanum* (L.) Leeke. *Acta Bot Neerl.* 33: 205-227.
 - HESLOP-HARRISON, J., HESLOP-HARRISON, Y., CRESTI, M., TIEZZI, A., & CIAMPOLINI, F. (1986). Actin during pollen germination. *J. Cell Sci.* 86:1-8.
 - HESLOP-HARRISON, J., HESLOP-HARRISON, Y., CRESTI, M., TIEZZI, A., & MOSCATELLI, A. (1988). Cytoskeletal elements, cell shaping and movement in the

- angiosperm pollen tube. *J. Cell Sci.* 91:49-60.
- HESLOP-HARRISON, Y., HESLOP-HARRISON, J. S., & HESLOP-HARRISON, J. (1986). Germination of *Corylus avellana* L. (hazel) pollen: hydration and the function of the oncus. *Acta Bot. Neerl.* 35:265-284.
 - HEYWOOD, H. U. (1978). Flowering plants of the world. *Oxford University Press, London.* 335.
 - HISCOCK, S. J., DEWEY, F. M., COLEMAN, J. O. D., & DICKINSON, H. D. (1994). Identification and localization of an active cutinase in the pollen of *Brassica napus* L. *Planta.* 193:377-384.
 - HISCOCK, S.J., DOUGHTY, J., DICKINSON, H. G. (1995). Synthesis and phosphorylation of pollen grain proteins during pollen-stigma interaction in self-compatible *Brassica napus* L. and self-incompatible *Brassica Olearacea* L. *Sex. Plant Reproduction.* 8:345-353.
 - HOEKSTRA, F. A. (1979). Mitochondrial development and activity of binucleate and trinucleate pollen during germination *in vitro*. *Planta.* 145:25-36.
 - HOEKSTRA, F. A., & BRUINSMA, J. (1975). Respiration and viability of binucleate and trinucleate pollen. *Physiol Plant.* 34: 221-225.
 - HOEKSTRA, F. A., & BRUINSMA, J. (1975). Viability of Compositae pollen: germination *in vitro* and influence of climatic conditions during dehiscence. *Z Pflanzenphysiol.* 76:36-43.
 - HOEKSTRA, F. A., & BRUINSMA, J. (1978). Reduced independence of the male gametophyte in angiosperm evolution. *Ann. Bot.* 42:759-762.
 - IWANAMI, Y. (1959). Physiological studies of the pollen. *J. Yokohama Municip. Univ.* (C34 Biol. 13) 116:1-37.
 - JAZDZEWSKA, E., NICLAS, A., & MAJEWSKA-SAWKA, A. (1995). Progress towards sugar beet improvement through somatic hybridation. I. Inactivation of nuclei and cytoplasm donor and recipient protoplasts. *Acta Soc. Bot. Pol.* 64:341-347.
 - JOHNSON, P., & MARSH, D. G. (1965). *Nature.* 206:935 (170).

- JOHRI, B. M. & VASIL, I. K. (1961) Physiology of pollen. *Bot Rev.* 27:325-381.
- JOHRI, B. M., & SHIVANNA, K. R. (1977). Physiology of 2- and 3-celled pollen. *Phytomorfology.* 27:325-381.
- JENSEN, W. A., FISHER, D. B., & ASHTON, M. E. (1968). Cotton embryogenesis: the pollen cytoplasm. *Planta.* 81: 206-228.
- JAUH, G. Y., & LORD, E. M. (1996). Localization of pectins and arabinogalactan-proteins in Lily (*Lilium longifolium* L.) Pollen tube and style, and their possible roles in pollination. *Planta.* 199:251-261.
- KAWAGUCHI, K., SHIBUYA, N., & ISHII, T. (1996). A novel tetrasaccharide, with a structure similar to the terminal sequence of arabinogalactan-protein, accumulates in rice anthers in a stage-specific manner. *Plant J.* 9:777-785.
- KERHOAS, C., GAY, G., & DUMAS, C. (1987). A multidisciplinary approach to the study of plasma membrane of *Zea mays* pollen during controlled dehydration. *Planta* 171:1-10.
- KING, J. R., & HESSE, C. O. (1938). Pollen longevity studies with deciduous fruits. *Proc Am Soc Hortic Sci.* 36:310-313.
- KNOX, R. B. (1984). Pollen-pistil interactions. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. 17, ed. H. F. Linskens and J. Heslop-Harrison, pp. 508-608. *Berlin: Springer-Verlag.*
- KNOX, R. B., & HESLOP-HARRISON, J. (1971). Pollen-wall proteins: localization of antigenic and allergenic proteins in pollen-grain walls of *Ambrosia* spp. (rag-weeds). *Cytobios* 4:49-54.
- KNOX, J. P., LINSTED, P. K., KING, J., COOPER, C. & ROBERTS, K. (1990). Pectin esterification is partially regulated both within cell walls and between developing tissue of roots apices. *Planta.* 181: 512-521.
- KRISHNAN, B. H., FRENCH, V.R., & OKITA, T.W.(1986). Immunochemical studies on the role of the Golgi complex in protein-body formation in rice seeds. *Planta* 169:471-480.

- KROH, M. & KNUIMAN, B. (1982). Ultrastructure of cell wall and plugs in tobacco pollen tubes after chemical extraction of polysaccharides. *Planta*. 154:241-250.
- KWACK, B.H. 1967. Studies on cellular site of calcium action in promoting pollen tube growth. *Physiol Plant*. 20: 825-833.
- LANCELLE, S. A., CRESTI, M., & HEPLER, P. K. (1987). Ultrastructure of the cytoskeleton in freeze-substituted pollen tubes of *Nicotiana alata*. *Protoplasma*. 140:141-150.
- LAUZURICA, P., GURBINDO, C., MARURI, N., GALOCHA, B., DIAZ, R., GONZALEZ, J., GARCÍA, R., & LAHOZ, C. (1988a). Olive (*Olea europaea*) pollen allergens I. Immunochemical characterization by immunoblotting, CRIE and immunodetection by a monoclonal antibody. *Mol. Immunol.* 25:329-335.
- LAUZURICA, P., MARURI, N., GALOCHA, B., GONZALEZ, J., DIAZ, R., PALOMINO, P., HERNANDEZ, R., & LAHOZ, C. (1988b). Olive (*Olea europaea*) pollen allergens II. Isolation and characterization of two major antigens. *Mol Immunol.* 25: 337-344.
- LI, Y. Q., BRUUN, L., PIERSON, E. S., & CRESTI, M. (1992). Periodic deposition of arabinogalactan epitopes in the cell wall of pollen tube of *Nicotiana tabaccum*. *Planta* 188: 532-538.
- LI, Y. Q., CHEN, F., LINSKENS, H. F. & CRESTI, M. (1993). Distribution of unesterified and esterified pectin in cell walls of pollen tubes of flowering plants. *Sex Plant Reprod.* 7: 145-152.
- LICCARDI, G., D'AMATO, M., D'AMATO, G. (1996). Oleaceae pollinosis: a review. *Int Arch Allergy Immunol.* 111:210-217.
- LIN, J. -J., & DICKINSON, D. B. (1984). Ability of pollen to germinate prior to anthesis and effect of desiccation on germination. *Plant Physiol.* 74:746-748.
- LINSKENS, H. F. (1964). Pollen physiology. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 15:255-270.
- LOMBARDERO, M., BARBAS, J. A., MOSCOSO., DEL PRADO, J., & CARREIRA, J. (1994). cDNA sequence analysis of the main olive allergen, *Ole e I*. *Clin Exp*

- Allergy*.24:765-770.
- MAHESHWARI, P. (1950). An introduction to the Embriology of Angiosperms. *New York: McGraw-Hill book Co.*
 - MAJEWSKA-SAWKA, A., NAKASHIMA, H., & MORI, K. (1994). Isolation and culture of suspension-derived protoplasts of *Beta vulgaris* L. *Biol. Plant.* 36:9-13.
 - MALHÓ, R., & TREWAVAS, A. J. (1996). Localized apical increases of cytosolic free calcium control pollen tube orientation. *Plant Cell.* 8:1935-1949.
 - MALHÓ, R., & PAIS, M. S. S. (1992). Kinetics and hydrodynamics of *Agapanthus umbellatus* pollen tube growth: a structural and stereological study. *Sex Plant Reprod.*
 - MALHÓ, R., READ, N. D., TREWAVAS, A. J., & PAIS, M. S. (1995). Calcium channel activity during pollen tube growth and reorientation. *Plant Cell.* 7:1173-1184..
 - MANGIN, L. (1886). Recherches sur le pollen. *Soc Bot Fr.* 33: 512-517.
 - MARTÍN-OROZCO, E., CÁRDABA, B., DEL POZO, V., DE ANDRÉS, B., VILLALBA, M., GALLARDO, S., RODRÍGUEZ-GARCÍA, M, I., FERNÁNDEZ, M. C., ALCHE, J. D., RODRÍGUEZ, R., PALOMINO, P., & LAHOZ, C. (1994). Ole e I: epitope mapping, cross-reactivity with other Oleacea pollens and ultrastructural localization. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 104:160-170.
 - MASCARENHAS, J. P. (1975). The biochemistry of angiosperm pollen development. *Bot Rev.* 41:259-314.
 - MASCARENHAS, J. P. (1993). Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation. *The Plant Cell.* 5:1303-1314.
 - MASCARENHAS, J. P., & ALTSCHULER, M. (1983). The reponse of pollen to high temperature and its potential applications
 - MASCHARENAS, J.P. (1989). The male gametophyte of flowering plants. *Plant Cell* i:657-664.
 - Mc CORMICK, S. (1993). Molecular analysis of male gametogenesis in plants. *Trends Genet.* 7:298-303.
 - Mc CORMICK, S. (1993). " Male gametophyte development. *Plant Cell* 5: 1265-1275.

- KAROVSKY, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electronic microscopy. *J Cell Biol.* 27: 137^a-137B.
- MOURITZEN, P., & HOLM, P. B. (1995). Isolation and culture of barley megasporocyte protoplasts. *Sex. Plant. Reprod.* 8:321-325.
- MURASHIGE, T. Y., & SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol Plant.* 15: 473-479.
- MUSCHIETTI, J., DIRCKS, L., VANCANNEYT, G., & McCORMICK, S. (1994). LAT52 protein is essential for tomato pollen development: pollen expressing antisense LAT52 RNA hydrates and germinates abnormally and can-not achieve fertilization. *Plant J.* 6:321-338.
- NAKAMURA, S., YOSHIDA, K., & SUZUKI, H. (1980). Hemicellulose of the pollen tube wall of *Camellia japonica*. *Planta Cell Physiol.* 21:1383-1390.
- NOGUCHI, T. (1990). Consumption of lipid granules and formation of vacuoles in pollen tube of *Tradescantia reflexa*. *Protoplasma.* 156:19-28
- O'KELLEY, J. C. (1957). Boron effectes on growth, oxygen uptake and sugar absorption by germination pollen. *Am. J. Bot.* 44:239-244.
- OKADA, K., UEDA, J., KOMAKI, M. K., BELL, C. J., & SHIMURA, Y. (1991). Requirement of auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell.* 3: 677-684.
- OLMEDILLA, A., ALCHE, J. D., & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. (1997). Nucleolar evolution and coiled bodies durinig meiotic prophase in *Olea europaea*: differential localization of nucleic acids. *European Journal of Cell biology.* 74:181-189.
- OPARKA, K. J., & HARRIS, N. (1982). Rice protein-body formation: all types are initiated bu dilation of the endoplasmic reticulum. *Planta.* 154:184-188.
- PACINI, E. & JUNIPER, B. E. (1979a). The ultrastructural of pollen grain devolopement in the olive (*Olea europaea* L.) Proteins in the pore. *New Phytol* 83:157-164.
- PACINI, E. & JUNIPER, B. E. (1979b). The ultrastructural of pollen grain

- developement in the olive (*Olea europaea*).2. Secretion by the tapetal cells. *New Phytol.* 83:165-174.
- PFUNDT, M. (1910). Der Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die Lebensdauer des Blütenstaubes. *Jahrb Wiss Bot.* 47:1-40.
 - PIERSON, E. S., LI, Y. Q., ZHANG, H.Q., WILLEMSE, M. T. M., LINSKENS, H. F., & CRESTI, M. (1995). Pulsatory growth of pollen tubes: investigation of possible relationship with the periodic deposition of the cell wall components. *Acta bot Neerl* 44: 121-128.
 - PIERSON, E. S., MILLER, D. D., CALLAHAM, D, A., SHIPLEY, A.M., RIVERS, B. A., CRESTI, M., & HEPLER, P. K. (1994). Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium ion flux and the intracellular calcium gradient: effect of BAPTA-types buffers and hypertonic media. *Plant Cell.* 6: 1815-1828.
 - PREUSS, D., LEMIEUX, B., YEN, G., & DAVIS, R. W. (1993). A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Devel.* 7:974-985.
 - RAJAM, M. V. (1989). Restriction of pollen germination and tube growth in lily pollen by inhibitions of polyamine metabolism. *Plant Sci.* 59:53-56.
 - RAPOPORT, H. F., & RALLO, L. (1991). Post-anthesis flower and fruit abscission in the olive cultivar "Manzanillo". *J. Amer Soc Hortic Sci.* 116: 720-723.
 - READ, S. M., CLARKE, A. E., & BACIC, A. (1993). Stimulation of growth of cultured *Nicotiana tabacum* W38 pollen tubes by poly (ethylene glycol) and Cu (II) salts. *Protoplasma.* 177:1-14.
 - REISS, H. D., & HERTH. W. (1979). Calcium ionophore A 23187 affects localized wall secretion in the tip region of pollen tubes of *Lilium longiflorum*. *Planta.* 145:225-232.
 - REISS, H. D., & HERTH. W. (1982). Disoriented growth of pollen tubes of *Lilium longiflorum* Thunb. Induced by prolonged treatment with the calcium-chelating antibiotic, chlorotetracycline. *Planta.* 156: 218:225.
 - REYNOLDS, J. D., & DASHEK, W. V. (1976). Cytochemical analysis of callose

- localization in *Lilium longiflorum* pollen tubes. *Ann. Bot.* 40:409-416.
- RITTINGHAUS, S. P. (1886). Der Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die Lebensdauer des Blütenstaubes. *Verh Naturwiss Ver Rheinl.* 43:123-166.
 - RIVERA, F. G. (1941). Pleomorfismo y esterilidad ovárica del olivo. *Anales de la E. de P.A. y de E. A.* 1 Fasc. I y II: 75-94.
 - RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I., & FERNÁNDEZ, M. C., (1988). A review of the terminology applied to aperturas thickning of the pollen grain. *New Paeobotany and Plynology.* 54:159-163.
 - RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I., & FERNÁNDEZ, M. C., (1990). Ultrastructural evidence of endoplasmic reticulum changes during the maturation of olive pollen grain (*Olea europaea* L.). *Plant Syst Evol.* 171:221-231.
 - RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I., & FERNÁNDEZ, M. C. (1987). Cytoplasmic nucleoids during microsporogenesis in *Olea europaea* L. *Biol Cell.* 60:155-160.
 - RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I., FERNÁNDEZ, M. C., & ALCHE, J. D. (1995). Immunocytochemical localization of allergenic protein (Olea antigen I) in the endoplasmic reticulum of the developing olive pollen grain (*Olea europaea* L.). *Planta* 196: 558-563.
 - RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I., FERNÁNDEZ, M. C., ALCHE, J. D., & OLMEDIA, A. (1995). Endoplasmic reticulum as a storage site for allergenic proteins in pollen grain of several Oleaceae. *Protoplasma.* 197:111-116.
 - ROGGEN, H. P. J. R., & STANLEY, R. G. (1969). Cell-wall-hydrolysing enzymes in wall formation as measured by pollen tube extension. *Planta.* 84: 295-303.
 - ROSEN, W. G. & GAWLIK, S. R. (1966). Fine structure of lily pollen tubes following various fixation and staining procedures. *Protoplasma.* 61:181-191.
 - ROSEN, W. G., GAWLIK, S. R., DASHEK, W. V. & SIEGESMUND, K. A. (1964). Fine structure and cytochemistry of *Lilium* pollen tubes. *Am. J. Bot.* 5:61-71.
 - RUSSEL, S. D. (1992). Double fertilization. *Int. Rev. Cytol.* 140:357-388.
 - RUTTEN, A. L. M., & DERKSEN, J. (1990). Organization of actin filaments in

-
- regenerating and outgrowing subprotoplasts from pollen tube of *Nicotiana tabacum* L. *Planta*. 180:471-479.
- SASSEN, M. M. A. (1964). Fine structure of *Petunia* pollen grain and pollen tube. *Acta Bot. Neerl.* 13:175-181.
 - SHAW, G. (1971): In BROOKS, J., GRANT, P. R., MUIR, M., VAN GIJZEL, P., SHAW, G. (Eds): *Sporopollenin*. 305. London: Academic Press (19)
 - SHIVANNA, K. R., & JOHRI, B. M. (1985). The angiosperm pollen. Structure and Function. *New Delhi: Wiley Eastern Ltd.*
 - SHIVANNA, K. R., HESLOP-HARRISON, J., & HESLOP-HARRISON, Y. (1983). Heterostyly in *Primula*. 3. Pollen water economy: a factor in the intramorph-incompatibility reponse. *Protoplasma*. 117:175-184.
 - SHIVANNA, K. R., LINSKENS, H. F., & CRESTI, M. (1991). Responses of tobacco pollen to high humidity and heat stress: viability and germinability *in vitro* and *in vivo*. *Sex. Plant. Reprod.* 4: 104-109
 - SMART, I. J., & KNOX, R. B. (1980). Rapid batch fractionation of ryegrass pollen allergens. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 62: 179-187.
 - SOUTHWORTH, D. (1983). pH changes during pollen germination in *Lilium longiflorum*. In Pollen: Biology and Implication for Plant Breeding. D. L. Mulcahy y E. Ottaviano, eds. *Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam*.61-65.
 - STAFF, I.A., TAYLOR, P.E., SMITH, P., SINGH, M.B., & KNOX, R.B. (1990). Cellular localization of water soluble allergenic proteins in rye-grass (*Lolium perenne*) pollen using monoclonal and specific IgE antibodies with immunogold probes. *Histochem. J.* 22:276-29
 - STANLEY, R. G., & LINSKENS, H. F. (1974). Pollen: Biology, Biochemistry, Management. *Berlin: Springer-Verlag.*
 - STEER, M. W., & STEER, J. M. (1989). Pollen tube tip growth. *New Phytol.* 111:323-358.
 - SUBBAIAH, C. C. (1984). A polyethylene glycol based medium for *in vitro* germination
-

- of cashew pollen. *Can. J. Bot.* 62:2473-2475
- SWOBODA, I., DANG, T. C. H., HEBERLE-BORS, E., & VICENTE, O. (1995). Expression of Bet c 1, major birch pollen allergen, during anther development. *Protoplasma.* 187:103-110.
 - TANAKA, I., & ITO, M. (1981). Studies on microspore development in liliaceous plants. III. Pollen tube development in lily pollens cultured from the uninucleate microspore stage. *Plant Cell Physiol.* 22:149-153.
 - THIÉRY, J. P. (1967). Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopie.* 6:987-1018.
 - TIWARI, S. C., & POLITO, V. S. (1988a). Spatial and temporal organization of actin during hydration, activation and germination of pollen in *Pyrus communis* L.: a population study. *Protoplasma.* 147: 5-15.
 - TIWARI, S. C., & POLITO, V. S. (1988b). Organization of the cytoskeleton in pollen tubes of *Pyrus communis*: a study employing conventional and freeze-substitution electron microscopy, immunofluorescence, and rhodamine-phalloidin. *Protoplasma* 147:5-15.
 - TUPY, J. (1966). Synthesis of protein and RNA in pollen tubes stimulated with 2-thiouracil. *Biol. Plant.* 8:398-410.
 - URIU, K. (1959). Periods of pistil abortion in the development of the olive flower. *Proc. Am. Hort. Soc.* 73: 194-202.
 - UWATE, W. J., & LIN, J. (1980). Cytological zonation of *Prunus avium* L. pollen tubes *in vivo*. *J. Ultrastr. Res.* 71:173-184.
 - VASIL, J. K. (1964). Effect of boron on pollen germination and pollen tube growth. *Int. Symp. Pollen Physiol. Fert. Univ. Nijmegen, The Netherlands.* 107-109.
 - VENEMA, G., & KOOPMANS, A. (1962). A phase-contrast microscopic study of pollen grain germination, nuclear movement and pollen tube mitosis in *Tradescantia virginiana*. *Cytologia.* 27:11-24.
 - VENEMA, G., & KOOPMANS, A. (1962). A phase-contrast microscopic study of

- pollengrain germination, nuclear movement and pollentube mitosis in *Tradescantia virginiana*. *Cytologia*. 27: 11-24.
- VERGNE, P., & DUMAS, C. (1988). Isolation of viable wheat male gametophytes of different stage of development and variations in their protein patterns. *Plant Physiol*. 88:969-972.
 - VIAJAYARAGHAVAN, M.R., & PRABHAKAR, K. 1984. The endosperm. *In embryology of Angiosperms*, ed. B. M. Johri, pp. 319-376. Berlin: Springer-Verlag.
 - VILLALBA, M., BATANERO, E., LÓPEZ-OTÍN, C., SÁNCHEZ, L. M., MONSALVE, R. I., GONZÁLEZ DE LA PEÑA, M. A., LAHOZ, C., & RODRÍGUEZ, R. (1993). The amino acid sequence of *Ole e I*, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen. *Eur J Biochem*. 216: 863-869.
 - VILLALBA, M., BATANERO, E., MONSALVE, R. I., GONZÁLEZ DE LA PEÑA, M. A., LAHOZ, C., & RODRÍGUEZ, R. (1994). Cloning and expression of *Ole e I*, the major allergen from olive tree pollen. *J Biol Chem*. 269:15217-15222.
 - VILLALBA, M., LÓPEZ-OLÍN, C., MARTÍN-OROZCO, F., MONSALVE, R. I., PALOMINI, P., LAHOZ, C. & RODRÍGUEZ, R. (1990). Isolation of three allergenic fractions of the major allergen from *Olea* pollen and N-terminal amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 172. 523-528.
 - VITHANAGE, H. I. M. V., HOWLET, B. J., JOBSON, S., & KNOX, R.B. (1982). Immunocytochemical localization of water-soluble glycoproteins, including group 1 allergen, in pollen of ryegrass, *Lolium perenne*, using ferritin-labelled antibody. *Histochem. J*. 14:949-966.
 - WETZEL, C. L. R., & JENSEN, W. A. (1992). Studies of pollen maturation in cotton: the storage reserve accumulation phase. *Sex. Plant Peprod*. 5: 117-127.
 - WHEELER, A. W. (1992). Hypersensitivity to the allergens of the pollen from the olive tree (*Olea europaea*). *Clin Exp Allergy*. 22:1052-1057.
 - WILLISON, J. H. M., (1985). Isolated protoplast as laboratory tools in the study of cell wall deposition. In: FOWKE, L. C., CONSTABLE, F (ed). *Plant protoplasts*. CRC

Press, Boca Raton, Fla. 77-89.

- WODEHOUSE, R.P. (1935). Pollen Grains, Their Structure, Identification and Significance in Science and Medicine. *New York: McGraw-Hill Book Co.*
- YLSTRA, E., TOURAEV, A., BENITO MORENO, R. M., STOGER, E., VAN TUNER, A. J., VICENTE, O., MOL, J. N. M., & HEBERLE-BORS, E. (1992). Flavonols stimulate development, germination, and tube growth of tobacco pollen. *Plant Physiol.* 100:902-907.
- ZHOU, C., YANG, H.-Y., & XU, S. -X. (1990). Fluorescence microscopic observations of actin filament distribution in corn pollen and *Gladiolus* pollen protoplasts. *Acta Bot. Sinica.* 32:657-662.
- ZOHAR, Y. D, SPIEGEL-ROY, P. (1975). Beginning of fruit growing in the Old World. *Science.* 187:319-3027.
- ZUBERI, M.I., & DICKINSON, H.G., (1985). Pollen-stigma interaction in *Brassica*. III. Hydration of the pollen grains. *J. Cell Sci.* 76:321-336.