

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL,
CITOQUIMICO Y MORFOMETRICO
DEL GRANO DE POLEN DEL OLIVO
(OLEA EUROPAEA L.) DURANTE SU FORMACION

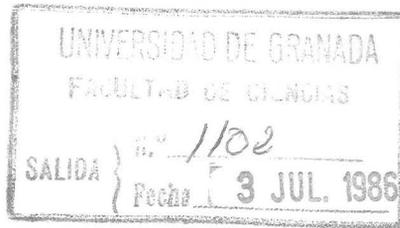
M. CARMEN FERNANDEZ FERNANDEZ

1986



A mis padres

Tesis doctoral, dirigida por la Dra. Isabel Rodriguez Garcia Colaborador Cientifico del C.S.I.C., en la Estación Experimental del Zaidín. Fué leida el dia 21 de Junio de 1.986, ante el tribunal formado por los Doctores: Fernandez Ruiz, Risueño Almeida, Rios Guadix, Matilla Carro, Almendros Gallego. Obtuvo la calificación de Apto "CUM LAUDE".



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS: SECCION BIOLOGICAS

Departamento de Biología Celular

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL, CITOQUIMICO Y MORFOMETRICO DEL GRANO DE POLEN DEL OLIVO (Olea europaea L.) DURANTE SU FORMACION

TESIS DOCTORAL

de

MARIA DEL CARMEN FERNANDEZ FERNANDEZ

Vº Bº

El director de la tesis

Vº Bº

El ponente de la tesis

Fdo:

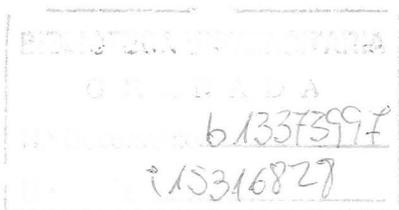
Dra. Mª Isabel Rodríguez García

Fdo:

Dr. Francisco Abadía Fencil

Granada, Mayo 1986

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS ESTACION EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN (GRANADA)



La Memoria que presentamos ha sido realizada en la Unidad Estructural de Bioquímica Vegetal (laboratorio de Microscopía Electrónica), de la Estación Experimental del Zaidín, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

AGRADECIMIENTOS:

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a la directora de esta Tesis Doctoral, Dra. M^a Isabel Rodriguez Garcia por aceptar su dirección, por sus valiosas enseñanzas y amplio sentido crítico de la investigación que ha sido la base en mi formación científica así como por el calor humano que me ha demostrado día a día y que ha favorecido que mi trabajo se realice en un ambiente cordial.

Igualmente quiero expresar mi gratitud más sincera al Dr. Francisco Abadia Fenoll, Catedrático-Director del departamento de Citología e Histología de la Universidad de Granada por aceptar la ponencia de esta tesis así como por su valiosa orientación en el capítulo de morfometría.

A D^a. Matilde Garrido Ortiz ya que su colaboración y ayuda técnica me han sido de gran utilidad y su apoyo moral diario me ha permitido realizar esta tesis con optimismo lo que ha sido el inicio de una gran amistad.

A la Dra. M.C. Risueño Almeida, por su lectura crítica y sus acertados consejos en lo relacionado con el núcleo.

A la Dra. Ruth Calvente Iglesias, por su asesoramiento en el estudio estadístico de los datos y su desinteresada ayuda en cuantos casos la he requerido.

A D. Manuel Martinez Martin por su valiosa colaboración de delineación realizado con su habitual interés y amistad.

Al Dr. D. Manuel Lachica Garrido, que facilitó mi contacto con el Centro Experimental del Zaidin de Granada (C.S.I.C.) y con el

grupo de trabajo en donde esta tesis se ha realizado.

A todos las personas de la Estación Experimental del Zaidín, a su Director Dr. Julio Boza y especialmente a mis compañeros de la Unidad Estructural de Bioquímica Vegetal que de una manera u otra hicieron que este trabajo viera la luz. Mis más sincero agradecimiento.

Por último, a todos los compañeros de la Escuela Universitaria de Formación del Profesorado de E. G. B. de Granada, en especial a los del Departamento de Ciencias Naturales por favorecer mi tarea en esta tesis y por el interés que han tomado.

I N D I C E

	Pag.
<u>INTRODUCCION</u>	8
1. ANTECEDENTES HISTORICOS DEL TEMA	10
2. GAMETOGENESIS MASCULINA EN ANGIOSPERMAS	12
2.1. Microsporogénesis	15
2.2. Formación y desarrollo del polén	16
2.3. Pared del polén	18
3. IMPORTANCIA DEL TEMA	22
<u>OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</u>	27
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	30
1. MATERIAL	31
2. METODOS	31
2.1. Proceso convencional de preparación de muestras	31
2.1.1. Fijación	31
2.1.2. Deshidratación	33
2.1.3. Inclusión	34
2.1.4. Ultramicrotomía	36
2.1.5. Tinción	36
2.1.6. Observaciones	37
2.2. Citoquímica	37
2.2.1. EDTA (ácido etilen diamino tetracético)	37
2.2.2. Método del ácido peryódico-tiosemicarbazida -proteinato de plata	38
2.2.3. Piroantimoniato potásico	39
2.3.4. Nitrato de lantano	40
2.3. Morfometría	40
<u>RESULTADOS</u>	42
1. DURACION DEL DESARROLLO DEL GRANO DE POLEN	43
2. TETRADAS	48
2.1. Telofase II - Interfase temprana	48
2.1.1. Núcleo	48
2.1.2. Citoplasma	48
2.1.3. Pared: Calosa	50

	Pag.
2.2. Tetradas en desarrollo	51
2.2.1. Núcleo	51
2.2.2. Citoplasma	52
2.2.3. Pared: Calosa, primexina	54
3. MICROSPORAS	70
3.1. Joven Microspora	71
3.1.1. Núcleo	71
3.1.2. Citoplasma	71
3.1.3. Pared: Exina	72
3.2. Microspora Vacuolada	74
3.2.1. Núcleo	74
3.2.2. Citoplasma	75
3.2.3. Pared: Exina, iniciacion de la intina	77
3.3. Microspora en división	77
4. GRANO DE POLEN	91
4.1. Joven grano de polen	91
4.1.1. Célula vegetativa	91
4.1.1.1. Núcleo	91
4.1.1.2. Citoplasma	92
4.1.1.3. Pared: Exina e intina	94
4.1.2. Célula generativa	94
4.1.2.1. Núcleo	94
4.1.2.2. Citoplasma	95
4.1.2.3. Pared: continuidad de la intina	95
4.2. Grano de polen medio	96
4.2.1. Célula vegetativa	96
4.2.1.1. Núcleo	96
4.2.1.2. Citoplasma	96
4.2.1.3. Pared: Exina e intina	97
4.2.2. Célula generativa	98
4.2.2.1. Núcleo	98
4.2.2.2. Citoplasma	98
4.2.2.3. Pared: Independización de la intina	99

	Pag.
4.3. Grano de polen maduro	99
4.3.1. Célula vegetativa	99
4.3.1.1. Núcleo	99
4.3.1.2. Citoplasma	99
4.3.1.3. Pared: consolidación de la exina e intina	100
4.3.2. Célula Generativa	101
4.3.2.1. Núcleo	101
4.3.2.2. Citoplasma	102
4.3.2.3. Pared	102
5. CITOQUIMICA	119
5.1. Ribonucleoproteínas: EDTA	119
5.2. Polisacáridos: Acido peryódico -tiosemicarbazida- proteinato de plata	120
5.3. Cationes: Piroantimoniato	121
5.4. Superficies celulares: Nitrato de Lantano	122
6. MORFOMETRIA	134
6.1. Microspora y grano de polen: célula vegetativa	134
6.1.1. Area celular, vacuolar, nuclear, nucleolar, lipídica, de plastidios y almidón.	134
6.1.2. Densidad de plastidios, almidon y lípidos	136
6.2. Grano de polen: célula generativa	137
6.2.1. Area celular, nuclear y nucleolar	137
6.3. Análisis estadístico	138
 <u>DISCUSION</u>	 152
1. ESTADIOS DE DESARROLLO EN EL POLEN	153
2. INCREMENTO DEL AREA CELULAR Y EVOLUCION DEL AREA VACUOLAR	154
3. EVOLUCION DEL NUCLEO	157
4. RIBOSOMAS Y MATERIAL NUCLEAR CITOPLASMATICO: Nucleo- loides y masas fibrilares	162
5. DIFERENCIACION DEL CITOPLASMA	166

	Pag.
6. DESARROLLO DE LAS PAREDES	172
<u>CONCLUSIONES</u>	184
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	189
APENDICE: tablas de datos y clave de abreviaturas de las figuras.	211

I N T R O D U C C I O N

El aforismo de que "todo ser vivo procede de otro ser vivo semejante a él" es de aplicación universal en todos los seres vivos. Por tanto la reproducción es una de las características fundamentales de los seres vivos que responde a la propiedad del protoplasma de poder extenderse en el espacio y en el tiempo, como consecuencia de la capacidad de autorreplicación que tienen algunos de los sistemas moleculares que los integran.

La reproducción sexual constituye la forma más generalizada de perpetuarse los seres vivos. En general es un proceso muy uniforme, que implica la existencia de células reproductoras o germinales, llamadas gametos, formados a partir de elementos somáticos que sufren un proceso de división celular especial -la meiosis- consistente en una serie de cambios morfológicos, bioquímicos, citológicos y fisiológicos perfectamente coordinados que acompañan al principal de ellos, que es la reducción de la dotación cromosómica parental diploide a una dotación cromosómica haploide. Los gametos así formados (masculino y femenino), por medio de la fecundación dan lugar al cigoto o huevo que al integrar los factores hereditarios recibidos está dotado para conseguir un avance evolutivo imprescindible al progreso de la especie en el tiempo - evolución adaptativa-.

Mientras que en los animales, el resultado directo de la meiosis son los gametos, en las plantas, los productos de la meiosis deben sufrir un proceso de maduración posterior, que consiste en varias divisiones mitóticas hasta formar los gametos. Por ello, en las plantas la gametogénesis está formada por dos procesos: esporogénesis y gametogénesis propiamente dicha. La esporogénesis se refiere a la meiosis que da lugar a las esporas y la gametogénesis a la maduración de las esporas ya formadas y a la formación de los gametos.

1. ANTECEDENTES HISTORICOS DEL TEMA

La sexualidad en Angiospermas era conocida ya en el Siglo III a. de C. cuando Arabes y Sirios acostumbraban a realizar el ritual de la polinización artificial de las palmeras datileras, aunque ellos no eran conscientes de la sexualidad como tal, ni de lo que ocurría después de espolvorear las flores femeninas con el polen.

Camerarius (1694), en la Universidad de Tübingen establece la sexualidad en Mercurialis annua, Kölreuter (1761), de la misma Universidad demuestra que las semillas pueden ser producidas por polinización artificial en Dianthus, Hyoscyamus, Matthiola, y Nicotiana. Sin embargo, entonces apenas sin valorar la gran importancia de la técnica de polinización artificial en la mejora de la cosecha y el cultivo de las plantas.

Un poco más tarde, un astrónomo italiano, Amici (1824), mientras estudia el estigma de Portulaca oleracea observa que el grano de polen, "revienta" hacia fuera en un tubo. Más adelante, en un detallado estudio de Hibiscus syriacus y P. oleracea, observa como el tubo crece poco a poco y llega a estar en contacto con el óvulo, (uno por cada óvulo) (Amici 1830). También este autor indica como el embrión no se origina del ápice del tubo, sino de una porción del óvulo "vesícula germinal", la cual ya existía antes de la entrada del tubo polínico.

Schleiden (1837, 1845) confirma los trabajos de Amici acerca del crecimiento y entrada del tubo polínico en el óvulo a través del micropilo, pero mantiene que el ápice del tubo polínico lleva la vesícula embrional y sufre divisiones para formar el embrión.

Hofmeister (1849) confirmó el trabajo de Amici e indicó como

en todas sus especies estudiadas (38 especies de 19 géneros de Angiospermas), el embrión se originó de la célula preexistente en el saco embrionario y no en el tubo polínico. Sus descripciones fueron convincentes y confirmadas por otros autores, terminando así la controversia Schleiden-Amici.

Hofmeister (1849) también estudió la formación de tetradas durante la microsporogénesis en Tradescantia, desarrollo y organización del gametofito femenino y formación del tipo celular de endosperma.

Strasburger (1879) trabajó sobre el desarrollo del gametofito femenino y observó la formación de tetradas, el establecimiento de la polaridad en el estadio binucleado y la organización del saco embrionario con 8 núcleos.

En 1884 se publicó el hecho muy extendido en varios géneros, de la formación en el grano de polen de la célula vegetativa y generativa y de la formación de los gametos masculinos. Pero la investigación más significativa fué el descubrimiento de la singamia en Monotropa (Strasburger 1884), la observación del ápice del tubo polínico con un núcleo vegetativo y dos gametos masculinos, la entrada del tubo a través del micropilo y el proceso de fusión de un gameto masculino con el núcleo de la oosfera. El también mencionó que el citoplasma del tubo polínico no entra en la oosfera.

Nawaschin (1898) descubre la doble fecundación en Fritillaria tenella y Lilium martagon observando la unión de un gameto masculino con la oosfera (singamia) y la fusión de otros gametos con los dos núcleos polares (triple fusión).

Guignard (1899) también observó la doble fecundación en Lilium y Fritillaria y la ilustró con magníficos esquemas.

Al finalizar el siglo XIX, eran ya conocidos todos los hechos básicos acerca de la reproducción de las plantas con flores, llegando a ser la embriología de las Angiospermas una disciplina consolidada.

Debido a la complejidad y amplitud del tema actualmente la mayoría de los grupos de investigación centran su atención en estadios específicos del desarrollo con aproximación orientativa hacia el estadio, ocurriendo a veces, que algunos de los hechos más interesantes han sido omitidos u olvidados conduciendo a malas interpretaciones.

Hay que destacar la enorme influencia que ha tenido en el conocimiento y desarrollo de la embriología, las mejoras y avances del instrumental utilizado en las últimas décadas, así como la mejora y puesta a punto de nuevas técnicas.

2. GAMETOGENESIS MASCULINA EN AGIOSPERMAS

La gametogénesis masculina en Angiospermas está constituida por la microporogénesis que se refiere a la formación de las 4 microsporas de una tetrad a partir de una célula madre del polen mediante división meiótica, y la microgametogénesis que comprende desde que las microsporas se liberan de la pared de calosa que rodea a las tetradas hasta la formación de los gametos masculinos en el tubo polínico. Después de la división meiótica, la joven microspora entra en una larga interfase, durante la cual esta célula se rodea de su propia pared celular muy específica y característica, mientras tanto el núcleo y el citoplasma se preparan para la división mitótica asimétrica que va a dar lugar al grano de polen bicelular o grano de polen propiamente dicho.

Una vez formadas las células vegetativa y generativa se produce la maduración del grano de polen. Durante este tiempo existe un elevado metabolismo por parte de la célula vegetativa que va a proveer al grano de polen de la maquinaria y reservas necesarias para el proceso de germinación del tubo polínico.

La maduración del grano tiene lugar todavía en la antera y es después de la dehiscencia de la misma cuando el grano ya maduro está en condiciones de poder germinar, siempre que se dé el medio y condiciones idóneas para ello (temperatura, humedad, medio nutritivo y hormonal etc.). Generalmente la formación de los gametos masculinos propiamente dicha tiene lugar en el tubo polínico. En Angiospermas, la microsporogénesis así como la mayor parte de la microgametogénesis se realizan dentro de la antera.

La antera: presenta dos tecas y cada una de ellas posee dos sacos polínicos o microsporangios. Las dos tecas se unen entre sí por medio de tejido conectivo con un haz vascular. Así mismo, la antera, se une al receptáculo floral por el filamento. Una antera joven posee células indiferenciadas llamadas Arqueosporiales, que al desarrollarse se diferencian en dos tipos: células parietales y células esporógenas. Las células parietales van a formar las células de la pared externa de la antera constiuida por un exotecio (con una o dos filas de células), endotecio (también de una o dos filas de células), capa intermedia y tapetum que es la capa de células más interna de entre las formadas. Inicialmente se le atribuyó al tapetum un origen parietal y actualmente se le reconoce un origen dual: parietal y tejido conectivo (Periasamy y Swamy, 1.966) (Bhandari, 1.968) e incluso en algunos casos puede proceder el tapetum del tejido esporógeno (Bhandari, 1.971).

El tapetum: es reconocido como un tejido importante particularmente en relación con el desarrollo del polen. Es la capa más

interna de la pared de la antera y rodea al tejido esporógeno.

El tapetum puede ser de dos tipos: glandular o secretor. En el tipo secretor, que es el más frecuente, las células tapetales permanecen intactas y persisten "in situ" y en el glandular o ameboideo las paredes tapetales se colapsan y los protoplastos salen hacia el lóculo de la antera y funden para formar un plasmodio cenocítico. El tipo de disolución de las paredes y degeneración del tapetum en relación con el desarrollo de las microsporas es extremadamente variable según las especies estudiadas (Steer 1.977, Hoefert 1.971, Biddle 1.979, Heslop-Harrison 1.963, Echlin y Godwin 1.968 a).

Estructuralmente el tapetum sufre grandes cambios durante la microsporogénesis. Se caracteriza por una elevada densidad ribosómica en un citoplasma uninucleado (Davis 1.966) o polinucleado (Schnarf 1.931), siendo bien conocida la poliploidía de estas células, (Bhandari y col. 1.976, Oksala y Therman 1.977). Durante la meiosis este tejido adquiere las características propias de células secretoras: abundancia de retículo endoplasmático, elevado número de dictiosomas, progresiva vacuolización y lisis de paredes.

Es conocida la síntesis de precursores de esporopolenina por el tapetum en este proceso (Heslop-Harrison, 1.968 b, Risueño y col. 1.969), sustancia que posteriormente va a constituir el principal componente de la pared externa del polen maduro (Dickinson 1.976). Finalmente degenera este tejido liberándose al lóculo de la antera productos de degradación de tipo lipídico y proteínico que se depositan en las paredes del grano dando lugar a depósitos de trifina y pollenkitt. La pigmentación amarilla que adquiere tanto la antera madura como el grano de polen maduro se debe a carotenos procedentes de la degeneración del tapetum.

Actualmente se admite que el tapetum puede estar implicado en tres aspectos del desarrollo del polen: nutrición de las microsporas, formación de la exina y síntesis del material que toma parte en la deposición de trifina y pollenkitt. También se atribuye un papel en las causas que pueden ocasionar esterilidad en el polen (Harvey y col. 1.972, Heslop-Harrison 1.972, Laser y Lersten 1.972).

2.1. Microsporogénesis

El tejido esporógeno de la antera antes de la meiosis se divide por mitosis hasta alcanzar un número determinado de células madres del polen, desconociéndose los factores que inducen la entrada de estas células en la meiosis.

Inicialmente las células madres del polen constituyen una masa compacta de células separadas unas de otras por paredes celulósicas primarias y comunicadas entre sí por plasmodesmos. Seguidamente entre la membrana plasmática y la pared primaria se depositan pequeñas vesículas que algunos autores admiten ser precursores y enzimas que contribuyen a la formación de calosa, polímero de glucosa en uniones $\beta(1-3)$ (Currier 1.956, Waterkeyn 1.962) separándose así las células madres del polen del tejido que constituye el tapetum.

Un primer depósito de calosa se produce en las células madres durante la leptotene-cigotene de la profase meiótica y los plasmodesmos existentes desaparecen, sin embargo se mantiene continuidad citoplasmática entre los microsporocitos vecinos a través de puentes intercelulares o conexiones citoplasmáticas (Heslop-Harrison 1.966, Risueño y col. 1.969) transformando el contenido de los esporangios en sincitios. Estos canales son de grandes dimensiones

(más de $1.5 \mu\text{m}$) permitiendo intercambios de citoplasma e incluso cambios de organelas de unas células a otras. También se ha observado en algunos casos paso de material nuclear de un meiocito a otro a través de estos canales (Stanley y Linskens, 1974). Durante la profase, continúa la segregación de calosa, llegando a desaparecer las conexiones citoplasmáticas al iniciarse la división cromosómica con la entrada de las células en metafase (Heslop-Harrison, 1.966).

Una vez terminada la división nuclear se forma la tabicación del citoplasma, bien de forma sucesiva después de la primera y segunda división meiótica como ocurre en las monocotiledóneas y algunas dicotiledóneas o bien de forma simultánea una vez terminadas las dos divisiones meióticas nucleares como es el caso de la mayoría de las dicotiledóneas (Maheshwari 1.950, Davis 1.966). Finalizada la división nuclear, pero durante la división citoplásmica, aún continúa la producción de calosa alrededor de cada espora haploide manteniéndose la tetrada unida gracias a esta pared especial que rodea a las cuatro microsporas de una misma tetrada.

Con la aparición de los primeros indicios de la pared del polen (primexina), todavía en la tetrada, se considera terminada la microsporogénesis.

2.2. Formación y desarrollo del polen

Después de la meiosis se forma la tetrada de las microsporas dentro de la pared especial de calosa. La microspora es la primera célula de la generación gametofítica responsable del desarrollo del grano de polen. Las microsporas determinan el diseño y la construcción inicial de la compleja pared externa del grano: la exina, así como el lugar donde van situadas las regiones aperturales de la pared. La vida de la microspora, termina con la primera

mitosis y mediante una división asimétrica se forman las células vegetativa y generativa del grano de polen.

La duración del periodo de microspora es variable según las especies, siendo más corto en las plantas tropicales que en las árticas, comprendiendo un tiempo que va desde los 4 días en Tradescantia reflexa, hasta todo el invierno en Betula odorata (Maheswari 1.949, 1.950).

En la joven microspora, recién liberada de la pared especial de calosa, el núcleo ocupa una posición central inmerso en un citoplasma no vacuolado, pero la vacuolización comienza poco después, de una manera espectacular coincidiendo en términos generales con el periodo de máxima expansión celular, es decir, con el de la vacuolización de la microspora. Según algunos autores la vacuola se reabsorbe durante el tiempo de división de la microspora (Knox 1984).

La primera mitosis del grano de polen es la indicadora del final del periodo de microspora y también es variable en el tiempo según las especies estudiadas.

Esta división celular asimétrica sigue un modelo preciso, la cual, merece una especial atención por dos razones:

1ª. Por la repartición de las organelas celulares entre las células vegetativa y generativa.

2ª. Por la precisión geométrica de su situación.

En muchos tipos de pólenes se ha demostrado una relación entre el lugar que ocupa la apertura y la futura posición de la célula generativa. Huynh (1.976), expresa esta idea en su "Ley de la

distancia más larga" en la que indica como la célula generativa elegirá el punto más lejano de las aperturas germinativas para así asegurar que el núcleo vegetativo entrará primero en el tubo polínico.

Después de la mitosis de la microspora, se puede decir que ha comenzado el periodo de desarrollo del polen en sentido estricto. Este se caracteriza por la acumulación de sustancias de reserva en el citoplasma de la célula vegetativa: proteínas, carbohidratos y lípidos. Esta parece ser la principal función de la célula vegetativa, la cual progresivamente se deshidrata en el grano maduro listo para la dehiscencia, que en la mayor parte de las Angiospermas permanece bicelular (Brewbaker, 1.967). En muy pocas familias, especialmente en compuestas, crucíferas y gramíneas, la célula generativa se divide precozmente formando un par de células espermáticas elongadas en el grano maduro de forma que estos granos son tricelulares cuando se liberan.

Por último, hay que destacar, que el grano de polen representa uno de los sistemas celulares aislados más sencillos en Angiospermas. En la madurez, alcanza características semejantes a las de una semilla madura: se llena de sustancias de reserva y se deshidrata.

2.3. Pared del polen

En la pared del polen se pueden distinguir dos partes (en el sentido dado por Heslop-Harrison 1.975).

a.- La exina, o capa estructurada externa constituída principalmente por esporopolenina y

b.- La intina, o capa interna, lisa de naturaleza polisacarídica.

Estas capas son completamente distintas desde el punto de vista químico, morfológico, genético y de desarrollo. La terminología aplicada a la pared del grano de polen es confusa, ya que se desarrolló y creció con los primeros trabajos al microscopio de luz y después fué utilizada para las imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de transmisión y de barrido (Erdtman 1.952, Faegri e Iversen 1.975).

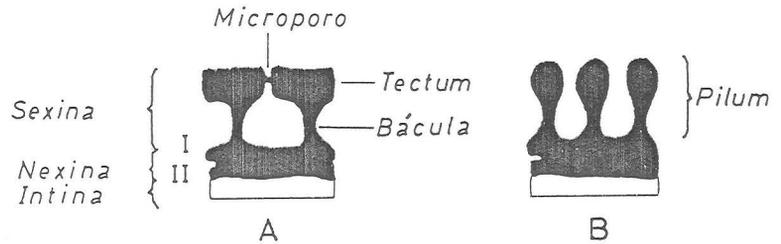
La esporopolenina es un polímero formado por la polimerización oxidativa de carotenoides y ésteres de carotenoides (Shaw 1.971, Brooks y Shaw 1.978) caracterizado por su resistencia a la biodegradación.

La exina: Tiene mucho en común con las propiedades de la lignina y de la cutina (Kolatt ukudy 1.980). La pared del polen puede contener alrededor del 1% de sílice, como fué determinado mediante microanálisis de rayos X (Crang y May 1.974).

En términos morfológicos se puede decir que hay dos tipos de exina:

A.- Cuando la parte estructurada contiene arcadas cubiertas por un techo o tectum, soportado por báculas (o "columelae") semejante a barras.

B.- Cuando la superficie externa de la exina es abierta careciendo de tectum y presentando sólo báculas o pilares ("pili"), las cuales pueden fundir entre sí por sus ápices o presentar ornamentación.



Estratificación de la exina

(esquema modificado de Heslop-Harrison 1.958 b, según Knox 1.984)

La exina, es compleja en su estructura, presentando varios estratos: (1) La capa externa o tectum (cuando está presente), (2) báculas o pilares, (3) Capa basal o nexina -I- y (4) la parte más interna o nexina -II-. También se le ha dado el nombre de ectexina al conjunto de tectum, báculas y nexina I y endexina a la nexina -II o capa basal interna.

En exinas tectadas, el tectum está perforado por microporos o canales de comunicación que conducen a los recintos cerrados de las arcadas. En algunos tipos de polen, pueden atravesar la capa basal o nexina -II unos microcanales que comunican con la intina (Heslop-Harrison 1.979).

En el grano de polen maduro está generalizada la presencia, en las arcadas de la exina o cavidades externas, de sustancias procedentes del tapetum como "pollenkitt" y trifinas.

La constancia observada en la estructura que presenta la exina, junto a la evidencia en experimentos genéticos realizados, indican

que tanto la forma como la estructura de la exina están bajo control esporofítico (Godwin, 1.968, a,b; Heslop-Harrison 1.968 b, Knox 1.976, 1.979).

Aperturas: La mayoría de los granos de polen poseen en su pared un área libre de exina por la cual emerge el tubo polínico para que pueda realizarse la fecundación. Existen algunas especies tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas en las que el polen no presenta aperturas germinales (polen inaperturado). Las aperturas de la pared del polen se establecen durante el periodo de tetradas.

Wodehouse (1.935), demostró que la ordenación de las cuatro microsporas en la tetrada y los puntos de contacto de cada microspora con sus vecinas sirven para delimitar los lugares de las aperturas germinales. Así en las tetradas más comunes que son del tipo tetraédrico, cada microspora contacta con las microsporas adyacentes en tres puntos que se corresponden a los lugares de las aperturas en los pólenes triporados.

La intina: Es la parte de la pared sintetizada por la microspora en último lugar, no alcanzando su grosor definitivo hasta el periodo de maduración. La intina es parte esencial de la pared del grano de polen ya que no se ha observado su ausencia en ninguna especie, mientras que la exina, puede reducirse e incluso falta en la pared del polen de algunas especies acuáticas.

La intina ocupa la parte más interna de la pared, mientras que en las aperturas germinales forma la superficie del grano ya que la exina está ausente o reducida frecuentemente a un opérculo en forma de casquete.

En muchos tipos de pólenes la intina apertural comprende una

capa gruesa de polisacáridos, que en la mayoría de los casos tienen túbulos orientados radial o tangencialmente. En estas zonas la intina se hace considerablemente más gruesa. En otros tipos de pólenes la intina puede estar constituida por más de una capa, que se diferencian por su estructura observada al microscopio electrónico de transmisión.

La parte interna de la intina apertural es predominantemente celulósica como lo indica su estructura microfibrilar, mientras que la zona externa tubular se tiñe con rojo de rutenio lo que indica un alto contenido de ácidos polisacarídicos (Mühlethaler 1.953, Sitte 1953, Bailey 1.960).

La intina también da positiva a distintas tinciones para proteínas (Tsinger y Petrovskaya-Baranova 1.961, Knox y Heslop-Harrison 1.969, 1.970, Southworth 1.973). Las proteínas han sido localizadas en túbulos o estructuras lamelares dentro de la matriz polisacarídica de la intina, por ejemplo, la fosfatasa ácida en la intina del polen de Crocus (Knox y Heslop-Harrison 1.971).

3. IMPORTANCIA DEL TEMA

El papel del polen es crucial en la reproducción sexual de las plantas. El polen es el transportador de gametos masculinos o sus células progenitoras en las plantas con flores. El grano contiene toda la información genética requerida para determinar un organismo entero a partir de una planta haploide (por ejemplo embrioides de polen en cultivos de tejidos), o bien puede unirse con el gameto femenino en la fertilización y formar un cigoto diploide y de aquí un nuevo esporofito.

Los gametos masculinos, células espermáticas o su progenitora (la célula generativa) están alojados dentro del citoplasma de la célula vegetativa. La célula vegetativa está rodeada por una compleja pared externa estructurada y su núcleo controla al menos inicialmente el metabolismo y crecimiento del tubo polínico que sigue a la germinación.

El conocimiento de la estructura y función del grano de polen es esencial en orden a producir mejoras en nuevos tipos de cosechas de plantas mediante hibridación y manipulación del sistema reproductivo, ya que el grano de polen y su tubo polínico son protagonistas primordiales en la fertilización y establecimiento de la semilla.

También para determinar las posibles causas que determinan la esterilidad del polen y conocer las anomalías que se presentan durante el desarrollo de los microsporocitos, es imprescindible tener previamente un conocimiento profundo del desarrollo del polen normal.

Una de las características más notables del grano de polen de las Angiospermas es la complejidad de su pared, como ya se ha visto anteriormente. Está generalmente aceptada la función de esta pared para proteger al gametofito masculino durante el periodo de dispersión del polen y como el tipo de polinización (aire, insectos o agua) puede tener una influencia importante en la evolución de la forma de grano. Sin embargo la existencia de una marcada estructura con sus arcadas y microcanales dentro de la pared del polen, específica para cada especie, sugiere que la exina juega un papel crucial en el reconocimiento de la superficie del estigma y en los primeros acontecimientos de la germinación del polen. Las arcadas de la exina están llenas de proteínas, glicoproteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos que aseguran una eficaz adhesión del polen a la superficie del estigma, así

como la iniciación del contacto macromolecular con el estigma, lo que conduce a la hidratación del polen y a su germinación.

Métodos citoquímicos han demostrado la presencia de un amplio espectro de enzimas (hidrolasas, transferasas, deshidrogenasas, oxidasas, ligasas y liasas) tanto en el citoplasma como en la pared del polen (Tsinger y Petrowskaya-Baranova, 1.961; Knox y Heslop-Harrison, 1.969, 1.970). Muchos de estos enzimas se localizan aparentemente dentro de la matriz polisacáridica de la intina, especialmente las hidrolasas; otras están presentes en las arcadas de la exina, preferentemente las deshidrogenasas; y algunas en ambos sitios (Knox y col., 1.975; Howlett y col., 1.979).

Algunos tipos de pólenes que se dispersan por corrientes de aire pueden llegar a estar en contacto con el tracto respiratorio del hombre, y al humedecerse liberan alérgenos causando la conocida fiebre del heno o polinosis (Howlett y Knox, 1983). Estudios inmunocitoquímicos han revelado que los alérgenos se localizan en la pared externa del polen, en la intina y en las arcadas y superficie de la exina (Knox y Heslop-Harrison, 1.970; Belin y Rowley, 1.971). Los alérgenos se liberan cuando el polen se humedece, aunque sólo sea momentáneamente, bien de la superficie del grano o bien a través de las aperturas germinales (Howlett y col., 1.973).

Los pólenes que causan alergia suelen proceder de árboles, hierbas y gramíneas del tipo anemófilo (=polinizados por el aire). Los pólenes entomófilos (=polinizados por insectos), raramente causan problemas de alergia, aunque ellos también contienen proteínas alergénicas. Pólenes de géneros de la misma familia, e incluso de especies muy próximas, pueden diferir en su capacidad para producir reacciones alérgicas. La razón por la que una proteína induce una respuesta alérgica, mientras otra no, no es conocida,

pero probablemente esté relacionado con los aminoácidos y su secuencia en el antígeno.

La principal característica de los antígenos del polen es su capacidad de producir reacciones alérgicas a muy bajas concentraciones.

Son evidentes las numerosas cuestiones que surgen en este campo y la necesidad de una investigación más intensa en este área del conocimiento que tanta implicación tiene para la sanidad humana.

El olivo (*Olea europaea* L.) pertenece a la familia Oleaceas, es un árbol no muy elevado, de copa redondeada y tronco grueso, que en los ejemplares viejos se retuerce y encorva dejando ver por sus tortuosidades que es una planta que puede pasar del millar de años. En nuestra península viene existiendo desde la época fenicia aunque en realidad fueron los árabes quienes los introdujeron en el sur e influyeron decisivamente en la difusión de esta planta (nombres como aceite o acebuche derivan del árabe).

Es de todos conocida la importancia económica de este cultivo en nuestro país y muy especialmente en Andalucía.

La propagación del olivo se lleva a cabo, casi exclusivamente, por vía asexual -multiplicación- sin embargo, la propagación sexual -reproducción- se emplea para la mejora genética, de aquí la enorme trascendencia del estudio del grano de polen de esta planta.

Tampoco hay que olvidar la elevada incidencia que tiene el polen del olivo como causante de enfermedades alérgicas y muy especialmente en nuestra región, lo que le hace ser un objeto de estudio doblemente atractivo.

No son muy numerosos los trabajos realizados en el polen del olivo a excepción de los realizados por el grupo de Pacini y colaboradores en Italia (Pacini y Cresti, 1.977; Pacini y Juniper 1.979 a,b).

En nuestra opinión se requiere un estudio sistemático del polen del olivo desde un punto de vista citológico, fisiológico, bioquímico e inmunológico, todo ello de manera coordinada.

Este trabajo pretende ser una contribución al conocimiento del polen del olivo desde el aspecto citológico, punto de partida para abordar el estudio del mismo en otras dimensiones.

O B J E T O Y P L A N D E T R A B A J O

Nos proponemos en este trabajo realizar la reconstrucción evolutiva del grano de polen de Olea europaea sativa variedad marteño, durante su desarrollo, determinando los cambios ultraestructurales que acompañan a todo cambio metabólico. Mediante el análisis morfométrico se estudia el comportamiento de los componentes celulares a lo largo de las diferentes fases secuenciales de este proceso. Es primordial determinar las características de esta especie y variedad, comparando nuestros resultados con los obtenidos por otros autores en el estudio de granos de polen de diferentes especies con el propósito de discernir entre las posibles diferencias específicas de cada especie o familia y los hechos comunes propios e inherentes al desarrollo del grano de polen en general.

Dados los diferentes y complejos procesos que tienen lugar durante la gametogénesis masculina, hemos centrado nuestro estudio en el "desarrollo del grano de polen" que comprende desde la formación de la tetraada, una vez finalizada la división meiótica, hasta la dehiscencia de la antera.

Para facilitar el estudio de este periodo lo hemos dividido en los siguientes estadios: tetradas, microspora y grano de polen, que a su vez los subdividimos de acuerdo con los parámetros o hechos más significativos que tienen lugar en este tiempo y centramos nuestra atención en el comportamiento o grado de desarrollo del:

- Núcleo
- Citoplasma
- Pared celular

Cuando se ha querido identificar o localizar determinados componentes se han utilizado las siguientes técnicas citoquímicas:

- La tinción del EDTA (etilen-diamino-tetra-acético) para confirmar la naturaleza ribonucleoproteíca de los nucleoloides:
- La técnica del ácido peryódico-tiosemicarbazida-proteinato de plata para localizar sustancias polisacáridicas en las paredes celulares.
- La presencia de cationes en el polen se ha demostrado mediante el piroantimoniato potásico.
- Para comprobar el paso de sustancias a través de la pared del grano se utilizó lantano como elemento traza.

Finalmente se ha utilizado el análisis morfométrico para conocer las variaciones que experimentan en densidad los plastidios, almidón y lípidos durante el desarrollo del polen así como los cambios porcentuales en la superficie celular de las áreas vacuolar, nuclear, nucleolar, de plastidios, almidón y lípidos. Posteriormente se realizó el estudio estadístico de estos datos para verificar el grado de significación de éstos.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

1. MATERIAL

El estudio se ha realizado en anteras de Olea europea L. variedad Marteño. La recogida de muestras se hizo en diferentes zonas de Granada durante el mes y medio que aproximadamente dura la floración del olivo en los meses de Mayo y Junio.

Debido a la larga duración del proceso de maduración del polen, hay fases que al ser muy largas permiten un estudio fácil, en cambio otras por su corta duración son difíciles de conseguir, por ello ha sido necesario hacer recolecciones de anteras durante varios años consecutivos hasta llegar a conseguir el mayor número de fases posibles, para así poder reconstruir de una forma completa el desarrollo evolutivo del grano de polen del olivo desde célula madre del polen o meiocito, pasando por el periodo de tetradas y microspora hasta llegar a grano de polen y su maduración.

2. METODOS

2.1. PROCESO CONVENCIONAL DE PREPARACION DE MUESTRAS

2.1.1. Fijación

Debido a la dificultad encontrada para obtener una fijación óptima de este material se utilizaron dos fijadores diferentes: glutaraldehído y formaldehído con distintos tampones variando su molaridad. El tampón cacodilato a 0.025 M, 0.15 M y 0.0015 M y el tampón fosfato a 0.05 M.

Glutaraldehído: El empleo de glutaraldehído como fijador es excelente ya que su acción fijadora no hace perder actividad

enzimática y preserva perfectamente las estructuras intracelulares, siendo ésta más perfecta si se hace una postfijación con tetróxido de osmio. La fijación óptima se obtuvo previa fijación de las anteras en una solución de glutaraldehído al 3% en tampón cacodilato 0.025 M a pH 7.5 a temperatura ambiente de 6 a 12 horas.

Preparación del glutaraldehído: El glutaraldehído se prepara en el momento de su uso a partir de una solución stock al 25% de la marca "polaron" diluyéndolo en tampón cacodilato a las distintas molaridades probadas hasta dejarlo al 3%. El tampón cacodilato se prepara disolviendo 2.675 gr. de cacodilato sódico en 500 ml. de agua destilada para obtener cacodilato 0.025 M y diluyendo éste para obtener el cacodilato 0.15 M y 0.015 M.

Formaldehído: La utilización de otros medios de fijación se relaciona con la diferente capacidad que presentan de actuar sobre estructuras celulares distintas y con ello facilitar el estudio de las mismas. Por esta razón, también se usó como fijador el formaldehído al 2% en tampón fosfato 0.05 M a pH 7, de 6 a 12 horas a temperatura ambiente ya que este fijador es muy eficaz para preservar las lipoproteínas que se encuentran situadas especialmente en los sistemas membranosos de las células por lo que aparecen más contrastadas las membranas aunque sin embargo, se obtiene una visión más incompleta de la estructura celular.

Preparación del formaldehído: Se obtiene diluyendo hasta el 2% en buffer fosfato 0.05 M que se prepara de la siguiente forma.

$\text{PO}_4 \text{Hk}_2$	(Merck) 0.1 M	17.42 g/l	(A)
$\text{PO}_4 \text{H}_2\text{K}$	(Merck) 0.1 M	13.61 g/l	(B)

Se toman aproximadamente 300 ml. de solución A y se añade solución B hasta alcanzarse pH 7.6 al pH-metro.

Para facilitar la penetración de los fijadores y posteriormente de la resina, las anteras después de estar 1 hora en el fijador eran cortadas con una hoja de afeitar longitudinalmente en dos partes. Pasado el correspondiente tiempo de fijación se lavaron las muestras tres veces en el correspondiente tampón durante dos horas.

Postfijación : A continuación se realizó una postfijación de las muestras con tetróxido de osmio al 1% preparado con el mismo buffer utilizado en la prefijación correspondiente y se mantienen las muestras en él durante 4 horas.

Preparación del tetróxido de osmio: Para conseguir una buena disolución se debe preparar 24 horas antes de su empleo. Para su preparación se partió de una ampolla de 100 mg. de tetróxido de osmio, marca "Serva" la cual hay que raspar, quitar la etiqueta pasándola por agua caliente y a continuación fría para que este cristalice en las paredes de la ampolla. A continuación se introduce ésta en un frasco de boca ancha con tapón esmerilado que contenga mezcla sulfocrómica, también se introduce una varilla de vidrio gruesa para que todo quede perfectamente limpio y así se mantiene durante una hora. Luego se pone todo a lavar y finalmente se pasa por agua destilada y después bidestilada. Se rompe la ampolla en el interior del frasco golpeándola con la varilla de vidrio gruesa y se le añaden 10 ml. de tampón que disuelve los cristales y así se conserva en el frigorífico a 4° C.

Una vez transcurrida la postfijación, se lavan las muestras 3 veces con tampón, siendo la duración de cada lavado de 20 a 30 minutos.

2.1.2 Deshidratación

La deshidratación se efectuó introduciendo las muestras en disoluciones de etanol (cuando usamos Epón como resina) o acetona (cuando

se utiliza Araldit) progresivamente más concentradas, utilizando los siguientes tiempos:

Acetona o alcohol al 30%	15 minutos
"	"	40% 30 minutos
"	"	70% 2 horas *
"	"	90% 2½ horas
"	"	100% 4 horas (hacer varios pases) *

* Cuando la experiencia lo requería las muestras se mantenían en esta concentración , hasta 12 horas (toda la noche).

El empleo de concentraciones graduales de estas soluciones, se hace con el fin de evitar cambios bruscos en la deshidratación, que podría traer como consecuencia alteraciones ultraestructurales o provocar una retracción del tejido.

2.1.3 Inclusión

La inclusión se realizó en resina Epón (Epikote 812) ó Araldit

El Epón se compone de:

Mezcla A	40 cc.
Mezcla B	60 cc.
DMP - 30 acelerador	1.8 cc.

Se conserva en el interior de jeringas en el congelador.

Para preparar el Epón se utiliza dos mezclas :

Mezcla A

Epón (Epicote 812)	15.5 cc.
Anhidrido Dodec. Succínico (DDSA)	25 cc.

Mezcla B

Epón (Epikote 812) 50 cc.
 Anhidrido Metil Nádic (MNA) 44.5 cc.

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

El Araldit se prepara de la siguiente forma:

MY 753..... 49 gr.
 DDSA 49 gr.
 BDMA 1.5 gr.
 Dibutylphtalate ... 2.7 gr.

Se agita esta mezcla en el agitador magnético y se conserva en el interior de jeringas en el congelador.

El proceso de inclusión se realiza de una manera gradual. Cuando la resina utilizada es Epón se hace un paso intermedio con óxido de propileno, que es un disolvente del alcohol y de 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 óxido de propileno de 15 a 20 minutos. Las mezclas graduales de Epón y óxido de propileno se realizan de la siguiente forma:

Oxido de propileno + Epón (3:1) 1 hora
 Oxido de propileno + Epón (1:1) 2 "
 Oxido de propileno + Epón (1:3) 4 "

A continuación las muestras se introducen en Epón puro durante 10 a 12 horas.

Con el Araldit no es necesario el uso del óxido de propileno y las mezclas graduales de resina se hacen con acetona. Las proporciones de las mezclas y tiempos utilizados son los mismos que para el Epón.

Se colocan las muestras en las cápsulas adecuadas, se orientan y se llena la cápsula de resina.

La polimerización se realiza en estufa a 60° C. durante 24 horas.

2.1.4 Ultramicrotomía

Se talla sobre el bloque, montado en el ultramicrotomo en posición de tallado, un tronco de pirámide cuya base, con forma de trapecio, contiene la zona de los sacos polínicos de la anteras. Una vez tallada la pieza se pasa a la obtención de los cortes para lo que se utilizó un ultramicrotomo "ULTRACUT E" REICHERT JUNG. Generalmente se emplearon cuchillas de vidrio de 45°, y sólo en algunos casos en que se obtenían cortes dificultosos con el vidrio, se ha utilizado una cuchilla de diamante. Los cortes obtenidos quedan flotando sobre una superficie de agua bidestilada y su grosor está relacionado con el color que presentan estos con el agua debido a la reflexión de la luz. Los más adecuados son los de color blanco-amarillo, cuyo grosor es de 600 a 800 Å. De la superficie del agua los cortes son recogidos por contacto con rejillas de cobre de 3 mm. de diámetro y de 200 a 300 mallas.

2.1.5 Tinción

Los cortes fueron teñidos, en acetato de Uranilo y posteriormente con citrato de plomo según Reynold, (1963).

Para la tinción se colocan las rejillas flotando sobre una gota de acetato de uranilo al 5% en agua destilada de tal forma que

los cortes estén en contacto con el uranilo y se tienen 30 minutos permaneciendo durante ese tiempo en oscuridad y a continuación son lavados en agua destilada.

Posteriormente las rejillas son teñidas con citrato de plomo que se prepara:

Nitrato de plomo 1.33 gr.
 Citrato de trisódico+2H₂O 1.67 gr.

Esta disolución se agita durante un minuto en un agitador magnético tras lo cual se deja reposar 30 minutos. Añadiendo 8 ml. de NaOH normal y se completa hasta 50 ml con agua bidestilada.

Es necesario extremar las precauciones tiñendo el material en medio alcalino y evitando la contaminación ambiental de CO₂ pues rápidamente precipita. Una placa petri invertida es utilizada como protector ambiental sobre las gotas de citrato de plomo rodeadas de lentejas de sosa. Se coloca la rejilla sobre la gota de citrato de plomo de forma que los cortes estén en contacto con él durante 5 ó 6 minutos y finalmente se lavan las rejillas en agua bidestilada.

2.1.6 Observaciones

Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión "ZEISS" modelo EM 10 C. Los negativos fotográficos se han tomado sobre placas "Dupont" o carrete de 35 mm. "Kodak technical pan film 2415", y el positivado se realizó sobre papel fotográfico "Ilford" de todas gradaciones.

2.2 CITOQUIMICA

2.2.1 EDTA (ácido etilen diamino tetra acético).

En esta técnica, preferencial para identificar ribonucleoproteínas

a microcopía electrónica, la fijación se realiza solo con glutaraldehído al 3% de 6 a 12 horas a 4° C., siendo el resto del proceso de fijación idéntico al descrito en el método convencional salvo en la tinción (Bernhard 1969) que a continuación se describe.

En primer lugar los cortes son teñidos con acetato de uranilo en disolución acuosa al 5% durante 20 a 25 minutos. Posteriormente se realiza el tratamiento de los cortes con EDTA, para lo cual se prepara una disolución de 2.925 gr. de EDTA en 10 cc. de agua destilada a la que se añade sosa concentrada gota a gota hasta la disolución total. El pH se lleva a 7 con sosa y una vez conseguido se completa hasta 50 cc. con agua destilada. El tratamiento de los cortes con el EDTA así preparado dura de 30 a 35 minutos, pasados los cuales se lavan tres veces en agua destilada.

Finalmente se realiza la tinción con citrato de plomo, de la forma ya descrita en el proceso convencional.

Con este método se tiñe preferencialmente el R.N.A. nuclear y fue utilizado para confirmar la naturaleza ribonucleoproteica de los nucleoloides.

2.2.2 Método ácido peryódico-tiosemicarbazida-proteinato de plata.

Esta técnica utilizada para identificar polisacáridos a microscopía electrónica y puesta a punto por Thiery (1967), difiere del método convencional en que la fijación se realiza sólomente con glutaraldehído al 3% durante 6 a 12 horas a 4° C. y en la tinción que a continuación se describe.

Los cortes son recogidos en rejilla de oro y/o platino. En primer lugar se dejan flotar los cortes sobre ácido peryódico al 1%

en agua destilada de 20 a 30 minutos, pasados los cuales se lavan en agua destilada varias veces manteniendo el agua en agitación. Posteriormente los cortes se dejan flotar en una solución de tiosemicarbazida al 1% en ácido acético al 10% de 30 a 40 minutos a lo que sigue un lavado rápido en ácido acético al 10% en agua destilada y otro en agua destilada.

Por último los cortes así tratados se colocan en proteinato de plata al 1% durante 30 minutos en oscuridad total.

Los testigos se obtienen bien suprimiendo la oxidación por el ácido peryódico, bien modificando la naturaleza de la oxidación utilizando agua oxigenada o bien omitiendo el paso sobre la tiosemicarbazida.

2.2.3 Piroantimoniato potásico

Esta técnica es utilizada para detectar cationes en las células y se realiza utilizando como único fijador de las muestras el piroantimoniato-ósmino preparado de la siguiente forma:

Se toma un volumen de solución acuosa de piroantimoniato potásico al 5% que se disuelve mal, por lo que es calentado hasta la ebullición y disolución total, añadiendo agua posteriormente hasta completar el volumen inicial. Se prepara un volumen igual al anterior de tetróxido de ósmio al 2% en agua destilada. Se mezclan ambos volúmenes y se ajusta el pH a 7.5 con ácido acético.

Las muestras se mantienen durante 2 horas en el piroantimoniato-ósmino así preparado, transcurridas las cuales, son lavadas varias veces con una solución acuosa de sacarosa al 6.5% a partir de lo cual se siguen los métodos habituales de deshidratación, inclusión y tinción.

2.2.4 Nitrato de lantano

El nitrato de lantano se ha utilizado como elemento traza para detectar espacios inter y extracelulares, superficies celulares y paso de sustancias a través de paredes celulares. Esta técnica difiere en la fijación que a continuación se describe:

Para la fijación se toma 1 ml. de una disolución de glutaraldehído al 25% y se mezcla con 9 ml. de una solución stock de buffer con trazas de nitrato de lantano de la casa Emscope "ya preparada". Las muestras se mantienen en este fijador de 6 a 12 horas tras lo que son lavadas en buffer cacodilato 0.1 M a pH 7.7. La postfijación se realiza introduciendo las muestras durante 2 horas en una solución de 5 ml. de OsO_4 al 2% con 5 ml. de buffer cacodilato con trazas de nitrato de lantano, a partir de aquí se siguen los métodos habituales de deshidratación, inclusión y tinción.

2.3 MORFOMETRIA

Para los estudios morfométricos fué utilizado un analizador semiautomático "IBAS 1, de Kontron", en cuyo tablero magnético se colocan fotografías obtenidas al microscopio electrónico sobre las que se delimitan mediante una pluma o cursor las áreas a estudiar. Las medidas de las áreas obtenidas representan el tamaño en micras al cuadrado ya que el programa permite introducir el factor de aumento real del positivo. También se realizó el contaje del número de plastidios, almidón y lípidos. Todas las medidas se realizaron sobre fotografías seleccionadas de secciones completas de células en los diferentes estadios estudiados.

De los valores obtenidos se obtuvieron las medias con su error típico y las desviaciones típicas sobre las que se efectuó el estudio estadístico para relacionar los distintos estadios.



La homogeneidad de la varianza se contrastó mediante la F de Snedecor que valora la hipótesis nula de igualdad de varianzas de distintas poblaciones. Si el valor de F no es significativo, se acepta la hipótesis nula en cuyo caso se ha realizado el contraste de la t de Student calculando la razón t por la expresión desarrollada por Cochran y Cox (1.950). Si el valor de F es significativo, las varianzas son iguales, en cuyo caso se ha realizado el contraste de las medias por la t de Student para muestras pequeñas, que establece la hipótesis nula de igualdad de las medidas en las poblaciones estudiadas. Los test se realizaron siempre para un error de 0.05.



R E S U T A D O S

1. DURACION DEL DESARROLLO DEL GRANO DE POLEN

El tiempo de floración del olivo en la variedad aquí estudiada, es aproximadamente de mes y medio y abarca desde el comienzo de la formación de pequeños capullos de unos 2mm. de longitud, hasta que las flores están totalmente desarrolladas y abiertas: dehiscencia de la antera (Lámina I).

El determinar que tiempo corresponde a cada una de las diferentes fases encontradas durante la formación y desarrollo del polen es difícil, ya que la rapidez con que se desarrolla este proceso depende de la temperatura, humedad y demás factores que en definitiva condicionan el clima y que son variables de un año a otro. También hay que tener en cuenta que dentro de un mismo árbol no todas las ramas comienzan la floración a la vez, sino que se observa un desarrollo más temprano en la zona sur que es donde el árbol recibe mayor cantidad de luz. Incluso dentro de una misma ramita en todos los capullos no hay una misma sincronización en su desarrollo, aunque si están en una fase muy próxima. Teniendo en cuenta todos estos factores y eligiendo siempre una misma zona del árbol, los datos obtenidos pueden darnos una idea aproximada bastante fiable de la duración del desarrollo del polen del olivo y del tiempo relativo de sus diferentes etapas, ya que estos han sido recogidos durante cuatro años consecutivos.

Durante los primeros 7 días la mayor parte de los capullos tenían anteras con células madres del polen en su interior, mientras que en los 2 ó 3 días siguientes mayoritariamente se encontraban

tetradas. El estadio de microspora, era encontrado con mayor frecuencia desde el día décimo de la recolección hasta el decimoquinto, siendo dentro de esta la fase vacuolada la que con mayor frecuencia se encuentra. Por último en los 20 a 25 días finales de la floración encontramos que la mayoría de las anteras poseen granos de polen, teniendo mayor probabilidad de encontrarlos con el grano de polen maduro (esquema I).

De estas observaciones se deduce que mientras la formación de la microspora tiene lugar en la antera en un periodo de tiempo relativamente corto (menos de un tercio del tiempo total), la formación y maduración del grano de polen es un periodo de larga duración. Por ello el proceso se puede dividir en una larga interfase de la microspora que comprende un periodo breve de tetradas, liberación de una microspora joven (prevacuolada) y a continuación vienen la vacuolización de la microspora que precede a la división asimétrica que dará lugar al grano de polen propiamente dicho y por último, se inicia otra larga interfase del grano de polen que durará hasta la dehiscencia de la antera donde se produce la maduración del grano que es el estadio de más larga duración.

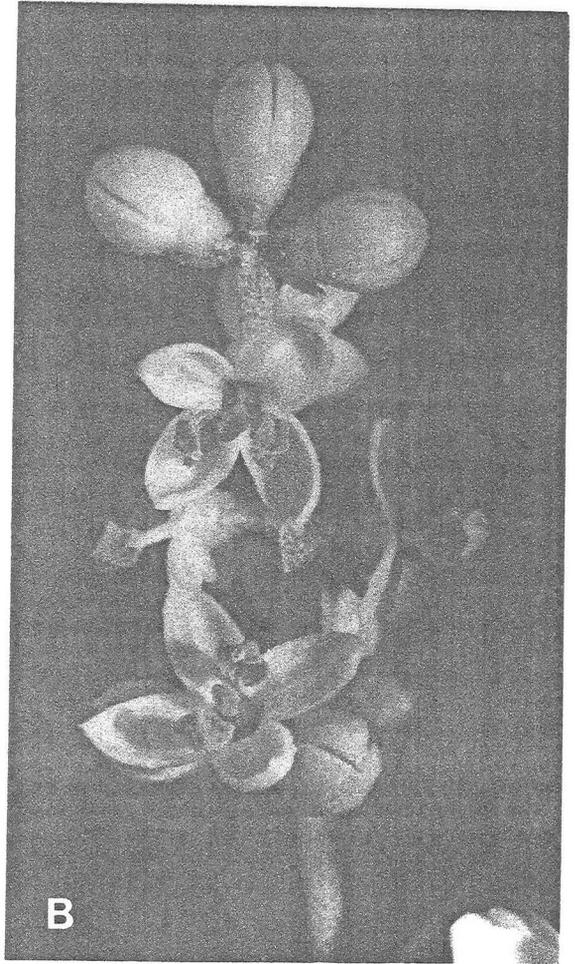
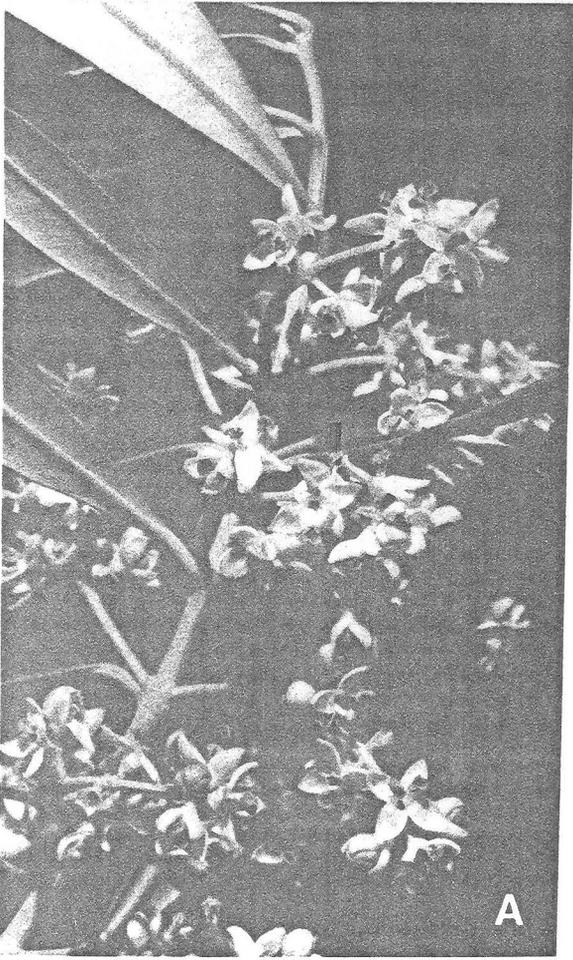
LAMINA I

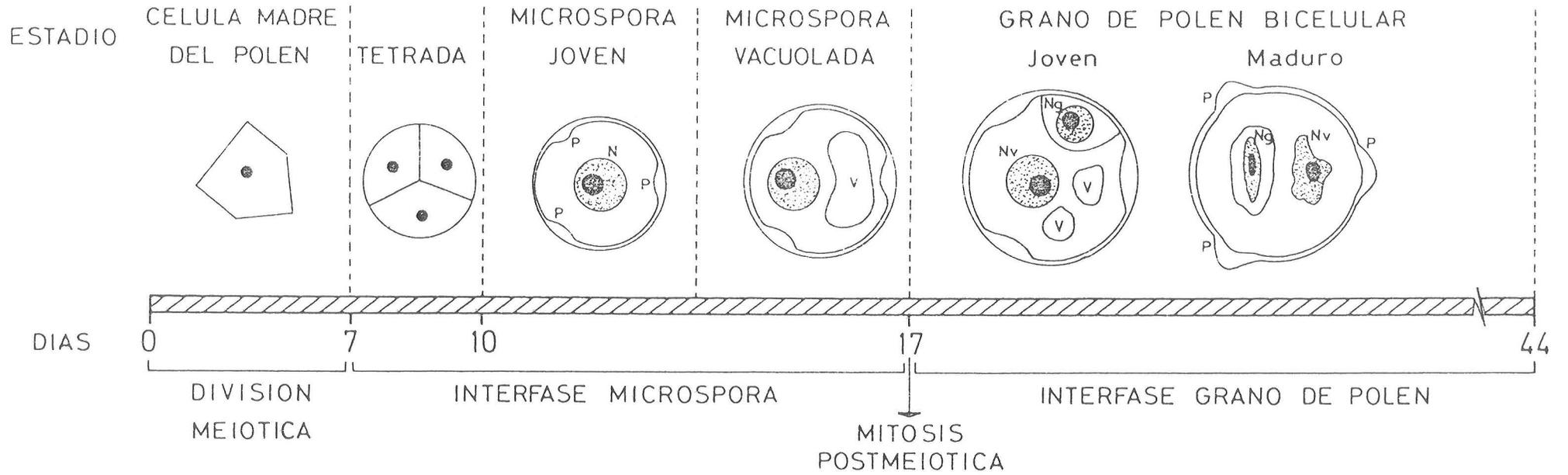
Flores del olivo

A. Ramita de olivo con flores abiertas y anteras amarillas, índice de su madurez, algunas anteras amarillo-pardas signo de la pérdida de polen.

B. Detalle de una ramita donde se puedan observar capullos próximos a la apertura y flores recientemente abiertas.

C. Detalle de la flor del olivo donde se observa la dehiscencia de las anteras.





ESQUEMA I.

Estimación de la duración del desarrollo del grano de polen de *Olea europaea*

2. TETRADAS

En Olea europaea, la formación de las tetradas tiene lugar una vez terminada la telofase II por medio de una citocinesis simultánea, al igual que ocurre en la mayoría de las dicotiledóneas.

2.1. TELOFASE II - INTERFASE TEMPRANA

Una vez terminada la 2ª división meiótica encontramos cuatro núcleos en la periferia de un citoplasma de bajo contenido ribosómico. En los cortes observados generalmente se encuentran 3 núcleos dispuestos en los vértices de un triángulo imaginario, el cuarto núcleo está situado en otro plano, y por esta razón difícilmente es posible obtener una imagen simultánea de los cuatro núcleos (fig. 1).

2.1.1. Núcleo

Al final de la telofase II los núcleos, se encuentran con un alto grado de condensación de su cromatina, distribuida por todo el núcleoplasma y frecuentemente adosada a la cubierta nuclear que ya está completa. El nucleolo se encuentra en fase de reorganización, observándose en los espacios intercromatínicos algunos cuerpos prenucleolares esféricos que fundirán posteriormente con el nucleolo hasta la reorganización completa (figs. 1, 2, 3, 4, 6). Tanto nucleolo como cuerpos prenucleolares están constituidos únicamente por componente fibrilar.

2.1.2. Citoplasma

En el citoplasma se observa una polarización en los orgánulos celulares, situados preferentemente en los planos ecuatoriales entre los núcleos (fig. 1). Uniendo a dos núcleos aún se observan restos del huso acromático (figs. 1, 2).

Las mitocondrias son difíciles de distinguir de los plastidios aunque los últimos son algo mayores y presentan en su estroma pequeñas masas fibrilares de elevada densidad electrónica (figs. 3, 4).

El aparato de golgi está representado por algunos dictiosomas con pocos sáculos (de 3 a 4) localizados preferentemente en las cercanías de los núcleos (fig. 6). Hay que destacar la elevada densidad del contenido de 1 o 2 de las cisternas de mayor longitud que constituye el dictiosoma. Este hecho se hace más evidente cuando la muestra se fijó solo con glutaraldehído (fig. 3). En ésta aún no se distingue una destacada actividad secretora de vesículas, necesarias para la formación de los tabiques celulares que dan lugar a las cuatro microsporas de una misma tetra. El momento de la formación del tabique no nos ha sido posible encontrarlo a pesar de las numerosas muestras observadas en diferentes días del desarrollo, lo que nos sugiere que este proceso debe ser muy corto en relación con la duración de la meiosis y posterior interfase y por tanto difícil de conseguir para observarlo.

El retículo endoplasmático es muy escaso, las pocas cisternas observadas son cortas, con ribosomas en su membrana (retículo rugoso) y muy próximas a la cubierta nuclear (fig. 4).

Los pocos ribosomas que hay en este estadio están dispersos por el citoplasma fundamental y se localizan preferentemente en el plasmalema y sus cercanías formando polirribosomas (figs. 5, 6). Ocasionalmente, también se observa algún agregado de polirriboso-

mas por citoplasma (fig. 6).

En este periodo se encuentran con frecuencia en el citoplasma unos cuerpos esféricos semejantes en estructura a los cuerpos prenucleolares y de apariencia muy compacta (figs. 2, 4), conocidos en la literatura con el nombre de nucleoloides (Dickinson and Heslop-Harrison 1.970).

Junto a los nucleoloides también se localizan unas masas irregulares, de estructura fibrilar y de menor densidad que ellos. Estas masas forman una red trabecular laxa, sin membrana que les rodea y que pueden tener en su interior 1 ó 2 glóbulos de 0.19 μ m. de diámetro aproximadamente y de densidad análoga a los nucleoloides (figs. 3, 4, 5).

Durante todo este periodo no aparecen cuerpos lipídicos citoplasmáticos en ningún momento.

El plasmalema presenta zonas de aparente retracción ya que en su interior aparecen unos espacios más claros que el resto de la pared de calosa y similar en su aspecto al de las numerosas áreas que en este momento se encuentran en el citoplasma y también en las cercanías del plasmalema (figs. 1, 2).

2.1.3 Pared: Calosa

La pared de calosa que inicia su formación durante la profase meiótica según ha sido descrito para otras especies (Waterkeyn, 1.962 Heslop-Harrison, 1.968 a, b), continúa aumentando de grosor durante toda la meiosis hasta después de formarse los tabiques celulares, que dan lugar a las cuatro microsporas (figs. 1,2,5,6).

2.2. TETRADAS EN DESARROLLO

Al final de la telofase II, con la tabicación del citoplasma se origina la tetrada propiamente dicha, apareciendo las cuatro microsporas (iguales entre sí) todavía unidas por la calosa, pero con los citoplasmas independientes (fig 7). En este momento se inicia la larga interfase de la microspora donde comienzan a depositarse las primeras capas de la pared del polen aún en presencia de calosa. Este periodo es de gran trascendencia ya que en él se marcan los caracteres definitivos de la exina. Por ello, el grado de evolución de la pared, nos sirve como punto de referencia para conocer el estadio de desarrollo en las tetradas (figs. 13, 14, 15).

2.2.1. Núcleo

El núcleo de las jóvenes microsporas de la tetrada, siempre ocupa una posición central en la célula llegando a ser, algo menos de la cuarta parte del área celular (figs 7, 10, 13, 14, 15, 18).

La cromatina comienza su descondensación, haciéndose cada vez menores las masas de cromatina condensada hasta que comienza el depósito de la primexina (figs 13, 14, 15). Las zonas intercromatínicas han aumentado su contenido en material denso a los electrones con respecto al estadio anterior (fig. 12). Este material está constituido por fibras pericromatínicas así como por la aparición progresiva de gránulos pericromatínicos de tamaño entre 50 y 80 nm. y rodeados por un halo de 100 nm. (figs. 14, 18).

El nucleolo esta ya totalmente organizado, generalmente está desplazado lateralmente en el núcleo y constituido unicamente por el componenete fribricular (figs. 10, 13, 14, 15, 18). No se observa la presencia de centros fibrilares.

2.2.2. Citoplasma

El citoplasma en esta fase es más denso que en la fase anterior y se observa un progresivo enriquecimiento en sus organelas.

Las mitocondrias ya en este periodo pueden diferenciarse fácilmente de los plastidios ya que presentan largas crestas filiformes que pueden llegar a abarcar todo su interior (figs. 16, 17, 22), en algunas ocasiones se pueden observar en división y en otros casos aparecen en la matriz mitocondrial unos filamentos de elevada densidad electrónica que pueden corresponder a D.N.A. (fig. 20).

Los plastidios, casi el doble en tamaño que las mitocondrias presentan un estroma grisáceo y homogéneo y en la mayor parte de los casos tienen en su interior una malla de mayor densidad electrónica (figs. 10, 13), a la vez que se inicia la presencia de pequeños gránulos de almidón (fig. 8).

El aparato de golgi, está constituido por dictiosomas poco aparentes y poco numerosos que se localizan preferencialmente próximos al núcleo. Igual que en la fase anterior, en muestras fijadas sólo con glutaraldehído, se puede observar una mayor densidad en el contenido de las cisternas de mayor longitud (fig. 13).

El retículo endoplasmático continúa siendo escaso y está constituido por cortas cisternas rugosas más frecuentes en las proximidades de la cubierta nuclear (fig. 22).

El citoplasma presenta un incremento en la población de ribosomas que inicialmente siguen localizándose preferencialmente junto al plasmalema (figs. 10, 13) mientras que en las fases del comienzo del depósito de la primexina y la exina (fases finales del desarrollo de la tetrada) la distribución de éstos ya es más homogénea por todo el citoplasma (figs. 14, 17).

Los nucleoloides ya observados anteriormente continúan en tetradas, pero su tamaño y características se hacen análogos al del nucleolo en esta fase. Estos cuerpos, de aproximadamente 1μ de diámetro son de apariencia finamente granular, muy compactos y de elevada densidad electrónica (fig. 10). Raras veces se encuentran zonas más claras en su interior. En la periferia de estos cuerpos el grado de dispersión de las partículas que los componen se hace mayor (fig. 11). A veces estos nucleoloides pueden aparecer rodeados de polirribosomas (fig. 19).

Continúan encontrándose en este estadio las masas fibrilares ya descritas en el estadio anterior (figs. 10, 12, 13). Nucleoloides y masas fibrilares pueden tener diversos grados de asociación entre ellas: bien separadas, próximos entre sí o en contacto.

En la tetrada inicialmente no se observan cuerpos lipídicos en el citoplasma, sin embargo, en las últimas fases cuando se está iniciando la formación de las probáculas de la exina, se encuentran en abundancia, localizándose muy próximos al plasmalema (fig. 16).

La tetrada recién formada presenta en todo su citoplasma gran cantidad de áreas claras de forma irregular, observándose frecuentemente fundidos con el plasmalema, el cual presenta muchas ondulaciones. Aparentemente estas áreas claras vacían su contenido al exterior del plasmalema donde está la pared de calosa que presenta en estos momentos estratos de diferentes densidades (figs. 10, 13). Al ir avanzando el desarrollo de la tetrada estas áreas transparentes a los electrones se modifican, de forma que al comenzar el depósito de primexina entre la calosa y el plasmalema se observan áreas más pequeñas y a veces con un contenido fibrilar laxo o bien denso en su interior (figs. 7, 14). A continuación, durante el depósito de las probáculas de la exina, el citoplasma de la tetrada nuevamente aparece cargado de gran cantidad de áreas redondeadas, transparentes

a los electrones y de mayor tamaño, semejantes en su apariencia a pequeñas vacuolas que pueden presentar un contenido más o menos fibrilar, restos de membranas o a veces inclusiones muy densas que pueden estar en comunicación con la primexina (figs.17,18)

2.2.3. Pared: calosa, primexina

Inicialmente las jóvenes microsporas reunidas en tetradas, sólo están rodeadas por la pared de calosa, constituida por estratos de distinta densidad (fig 10). Dentro de la calosa se observan pequeños gránulos densos a los electrones (fig. 9) que se acumulan preferencialmente en forma de glóbulos de mayor densidad en los restos de los tabiques de separación de la tetrada que aún quedan en la pared de calosa entre las 4 microsporas (figs. 7, 16, 17).

Una vez terminada la segregación de calosa, se observa un depósito de material fibrilar entre el plasmalema y la calosa que progresivamente se va extendiendo hasta rodear la microspora por completo y formar la primexina (figs. 14, 15). La estructura fibrilar que presenta la primexina, se corresponde con la de una pared celulósica (figs. 16, 17).

En este momento se determinan las zonas que darán lugar a los poros o aperturas que son consideradas modificaciones estructurales de la propia pared por donde el tubo polínico encontrará una salida en el momento de la germinación del grano de polen.

En Olea europaea el grano de polen tiene tres aperturas ecuatoriales y equidistantes que al desaparecer la calosa quedan ya perfectamente delimitadas en la exina. Estas tres zonas aperturales en este estadio se presentan como pequeñas regiones en las que no hay

depósitos de primexina, y por tanto en ellas el plasmalema, está en contacto con la calosa. Hay que destacar, que debajo del plasmalema, en estas regiones se observan cisternas de retículo endoplasmático rugoso adosadas y paralelas a él (fig. 8).

Durante la formación de la primexina, se observan ondulaciones en el plasmalema, encontrándose en los salientes de estas ondulaciones unas acumulaciones de partículas densas, aparentemente ribosomáticas (figs. 7, 14). En estos mismos sitios posteriormente sobre la primexina, se observan acumulaciones de material fibrilar procedente del citoplasma a través del plasmalema y que corresponde a las probáculas o primeros indicios de la exina estructurada (figs. 17, 18).

Durante la liberación desde la calosa, las probáculas se hacen más densas tomando el aspecto de las báculos propiamente dichas de la exina (fig. 19). En ellas ya se observan unos orificios o microcanales que permanecieron durante todo el desarrollo de la exina (fig. 21). Simultáneamente se consolida la capa basal de la exina, por empaquetamiento más denso de las fibrillas de la primexina y aporte de un material granular semejante al que anteriormente se había visualizado inmerso en la calosa. También se inicia la formación de la endexina, entre el plasmalema y la base de las báculos, como una lámina densa que irá engrosando ya durante el estadio de microspora libre (figs. 19, 21). En este estrato se encuentran restos de membranas que incluso se observan en estadios más tempranos y que probablemente van a dar lugar a las estructuras lamelares que se visualizan en la endexina madura (figs. 16, 19).

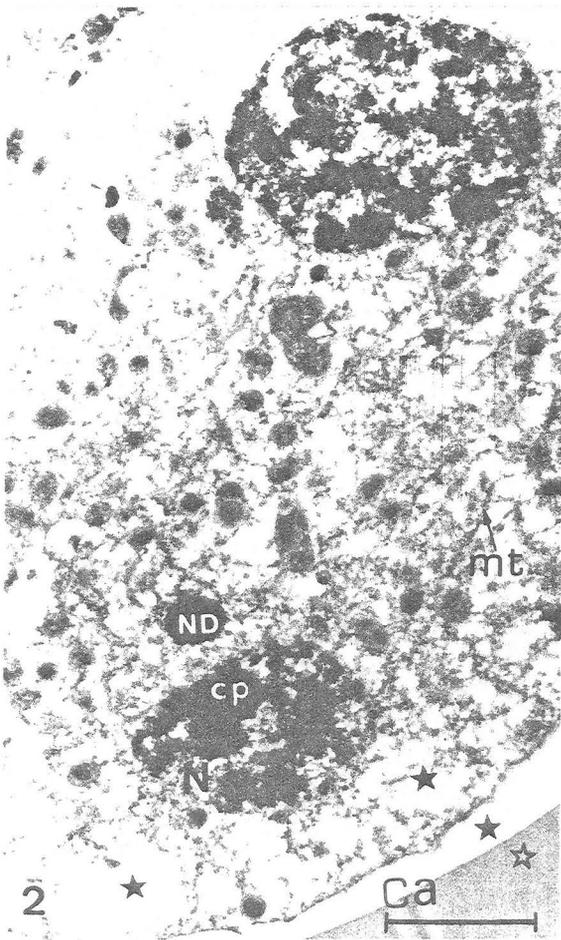
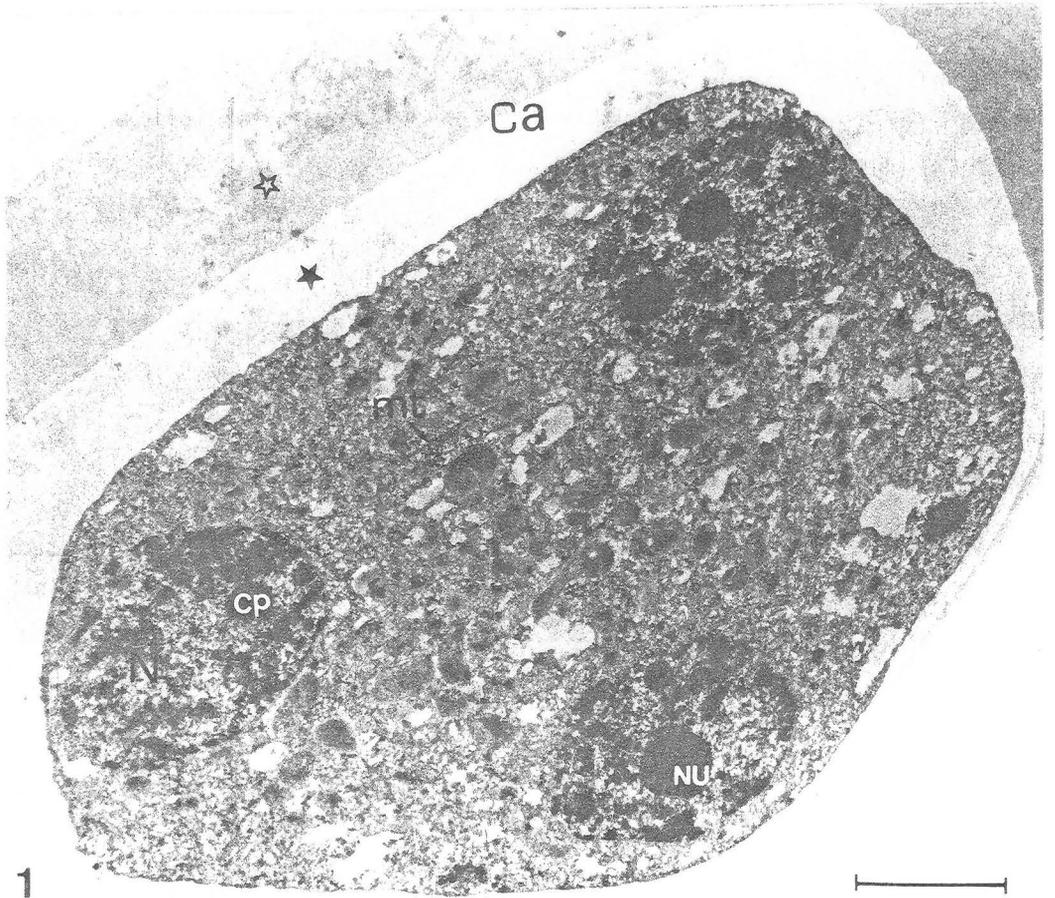
LAMINA II

Telofase - Interfase temprana

Fig. 1. Se observan tres núcleos del meiocito situados en un mismo plano finalizando su reorganización, con cuerpos prenucleolares densos en los espacios intercromatínicos. En el citoplasma, las organelas se sitúan preferentemente en los planos ecuatoriales entre los núcleos. Observese la distinta densidad de los estratos de calosa (★, ☆) (x10.500).

Fig. 2. En el citoplasma entre los dos núcleos se observan microtúbulos procedentes del aparato mitótico, un nucleoloide, plastidios y mitocondrias sin diferenciar y gran cantidad de áreas claras semejantes al estrato interno de la calosa (★) (x10.000).

Fig. 3. Citoplasma a mayor aumento, pudiéndose apreciar la estructura interna de mitocondrias, plastidios y dictiosomas con un contenido denso en sus cisternas, el cual se hace más evidente en la cisterna más larga. Observese la escasez de ribosomas que presenta el citoplasma. Fijación con glutaraldehído sólo al 3% en tampón cacodilato 0.025 M (x25.000).



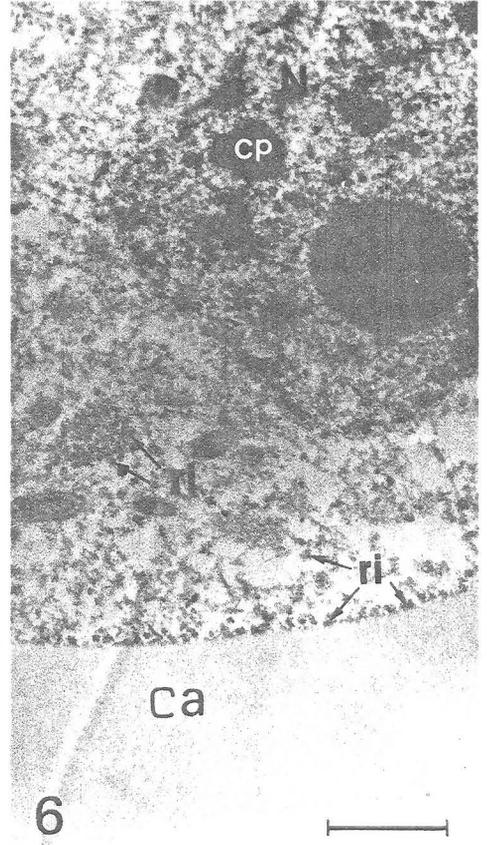
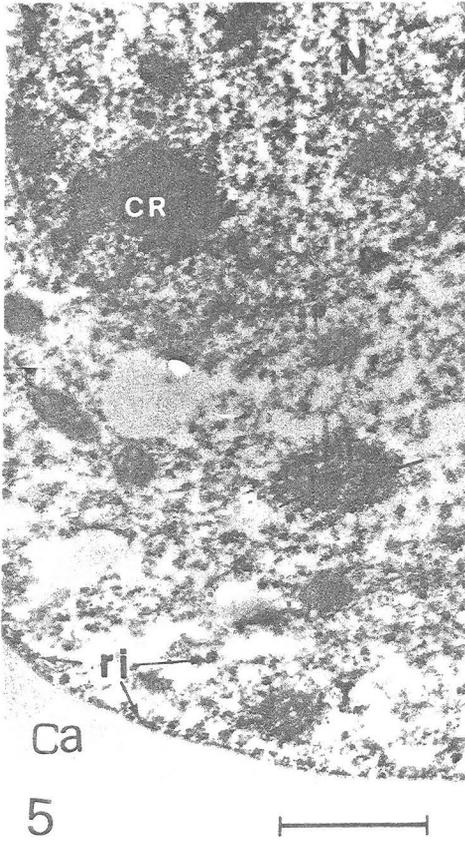
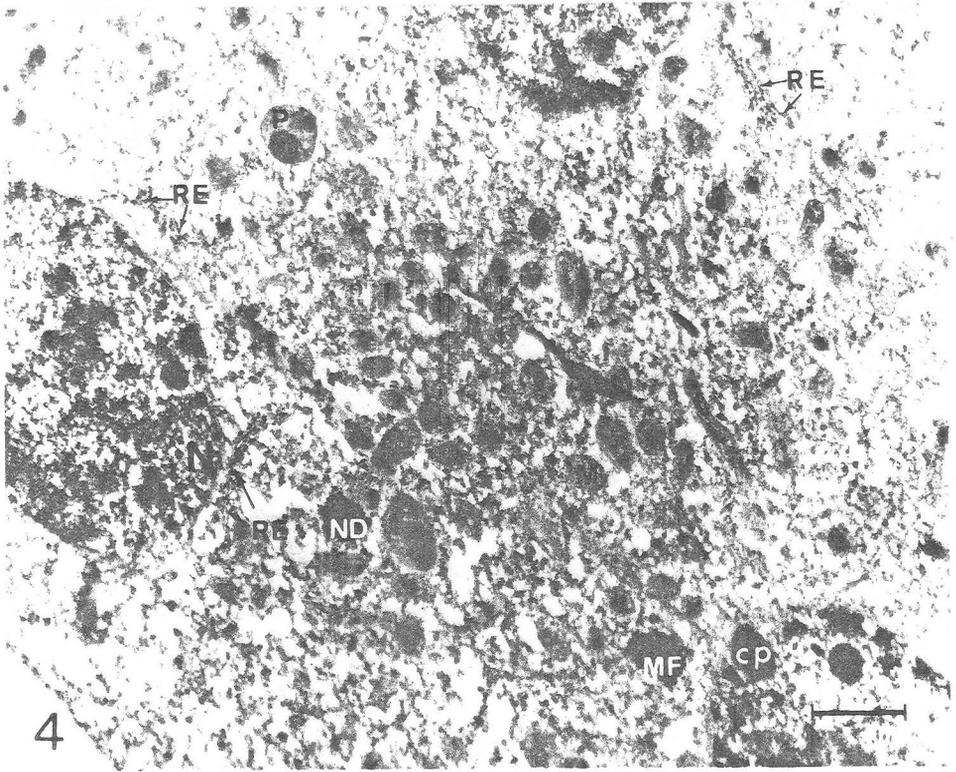
LAMINA III

Telofase - Interfase temprana

Fig. 4. Final de telofase II, antes de iniciarse la tabicación que dará lugar a las cuatro microsporas. Hay que señalar que las pocas cisternas de retículo endoplasmático rugoso que se observan, están en las proximidades de los núcleos (x12.600).

Fig. 5. En el citoplasma se puede observar una masa fibrilar con dos glóbulos más densos en su interior (flechas). Los ribosomas se localizan preferencialmente junto al plasmalema en forma de poliribosomas. En el núcleo se pueden observar masas de cromatina condensada y el material intercromatínico fibrilar (x20.000).

Fig. 6. En el citoplasma pobre en ribosomas distribuidos heterogeneamente se puede observar, una agrupación de poliribosomas, así como su localización preferencial junto al plasmalema (x16.000).



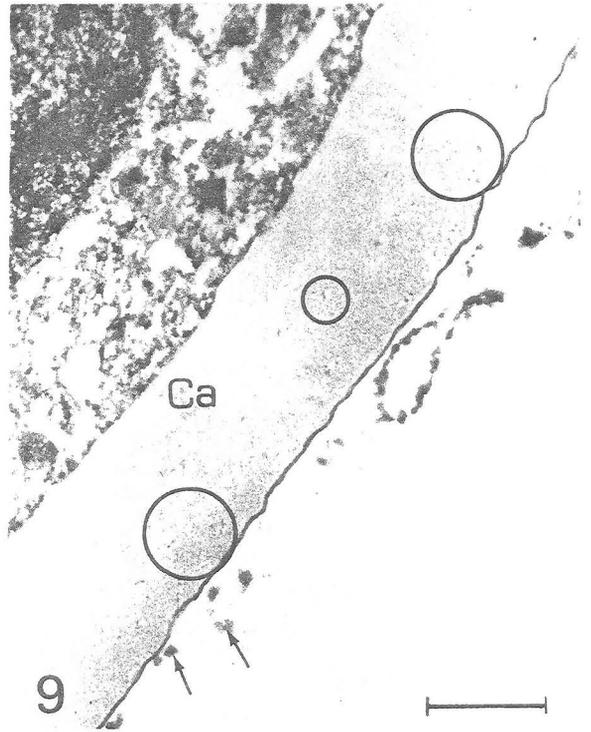
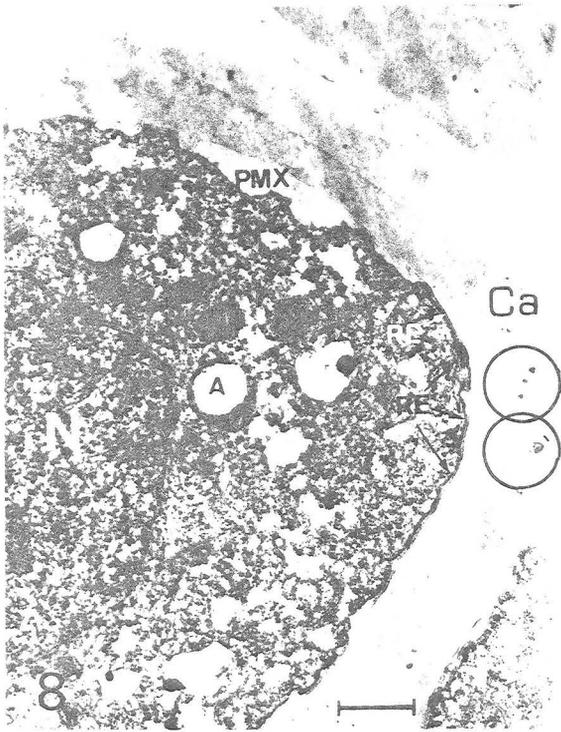
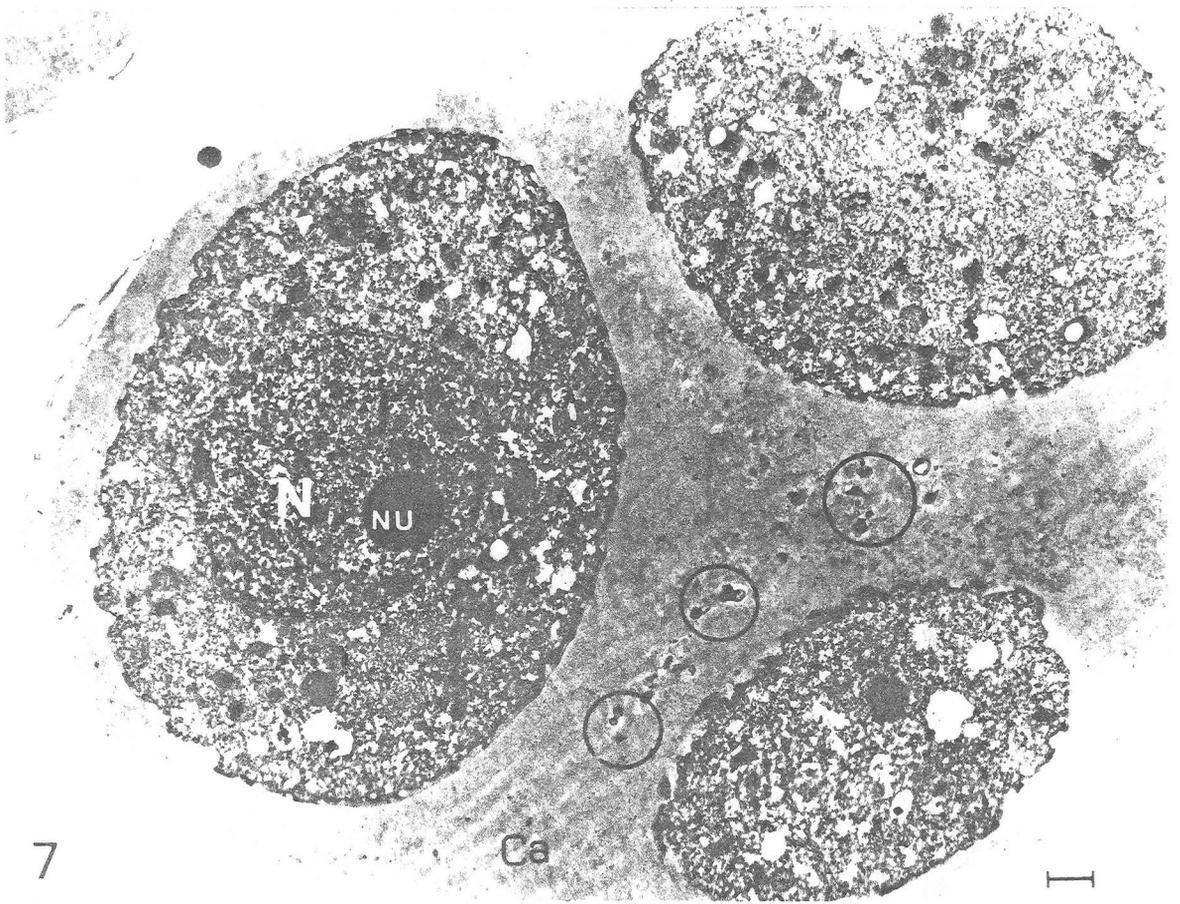
LAMINA IV

Tetradas en desarrollo

Fig. 7. Se pueden observar las tres microsporas de una tetrada situadas en un mismo plano unidas por la pared de calosa, con gran cantidad de partículas densas inmersas en su interior, mayoritariamente en los restos de tabiques de separación de las células (círculos) (x5.700).

Fig. 8. Inicio de la formación de la primexina entre el plasmalema y la calosa. Se observa una zona con cisternas de R.E. adosadas paralelamente al plasmalema sin que haya indicios hacia el exterior de depósitos de primexina. En este lugar se localiza la formación de la futura apertura (x10.400).

Fig. 9. Detalle de la pared de calosa donde se pueden observar pequeñas partículas densas en su interior (círculos) (x16.000).



LAMINA V

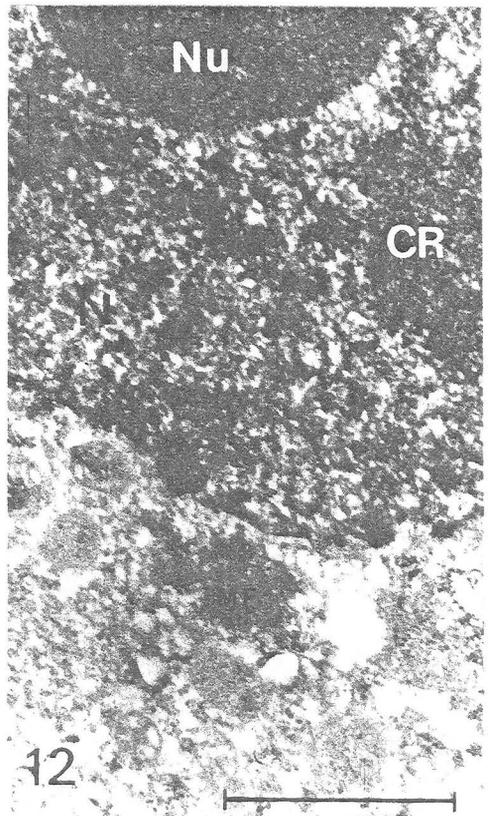
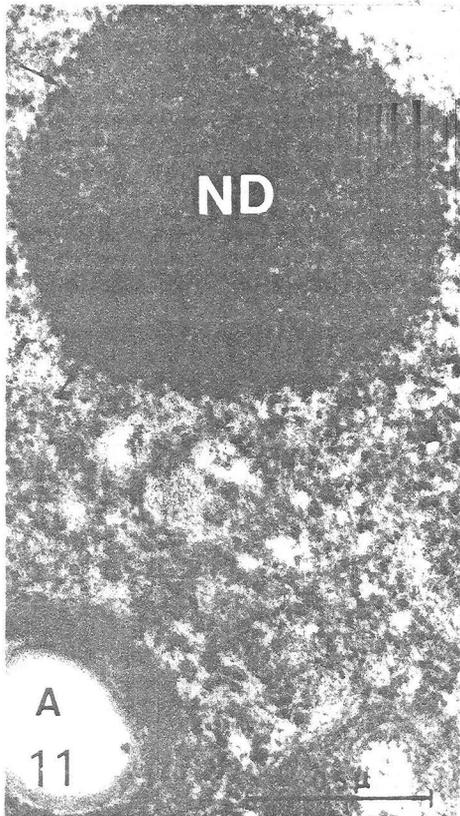
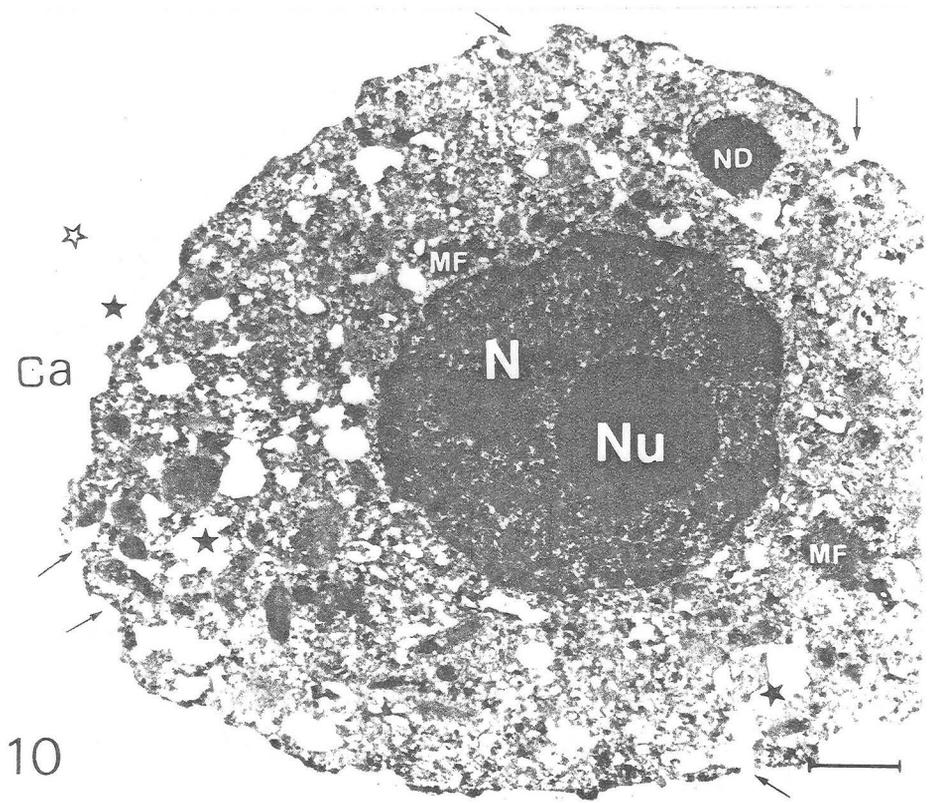
Tetradas en desarrollo

Nucleoides y masas fibrilares

Fig. 10. Microspora de una tetrada con nucleoloide y masas fibrilares. Continúa la segregación de calosa, observándose gran cantidad de áreas claras citoplasmáticas (★) de igual densidad que el estrato más interno de los dos de diferentes densidades que presenta la pared especial de calosa (★,☆). A veces esta áreas parecen fusionarse al plasmalema y vaciar su contenido (flechas). Fijación glutaraldehido solo 3% en tampón cacodilato 0.025 M (x12.000).

Fig. 11. Nucleoloide a gran aumento, en el que se puede distinguir su componente finamente granular que se hace más evidente en la periferia (flechas) (x50.000).

Fig. 12. Masa fibrilar a gran aumento de contorno irregular y menor densidad que el nucleolo. Fijación: glutaraldehido solo al 3% en tampón cacodilato 0.025 M (x31.000).



LAMINA VI

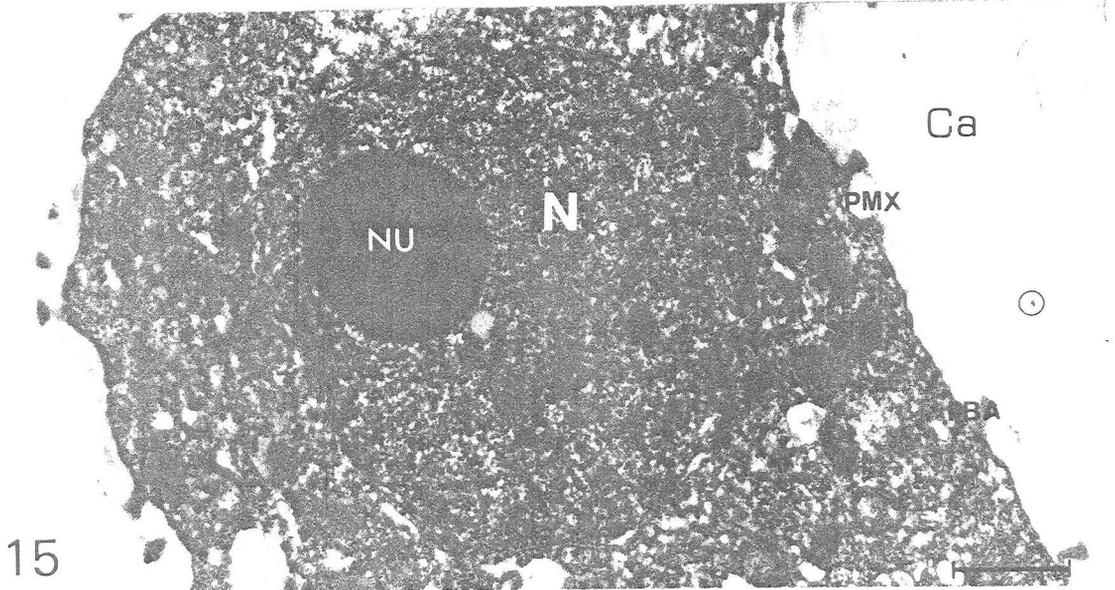
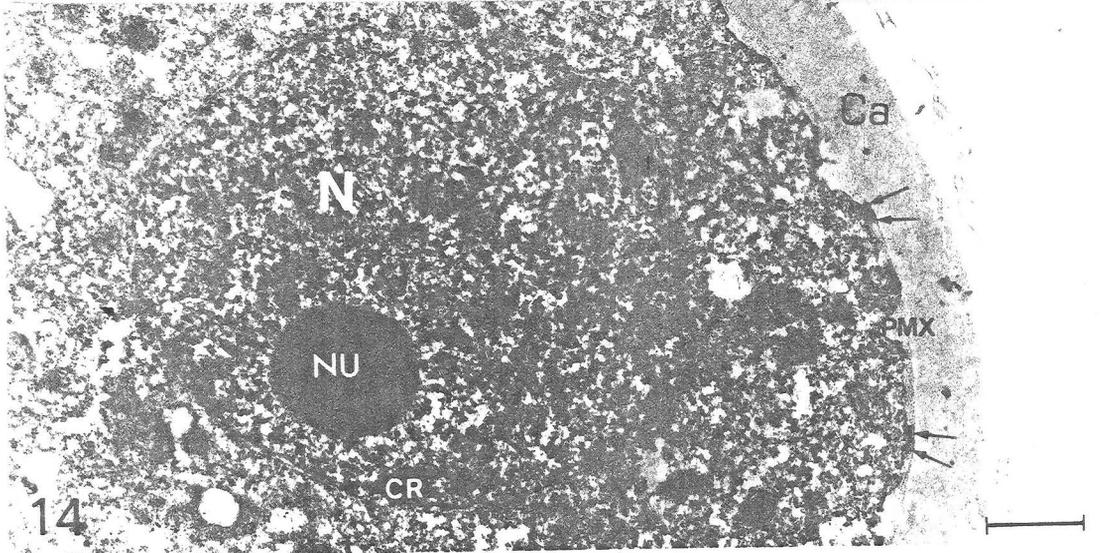
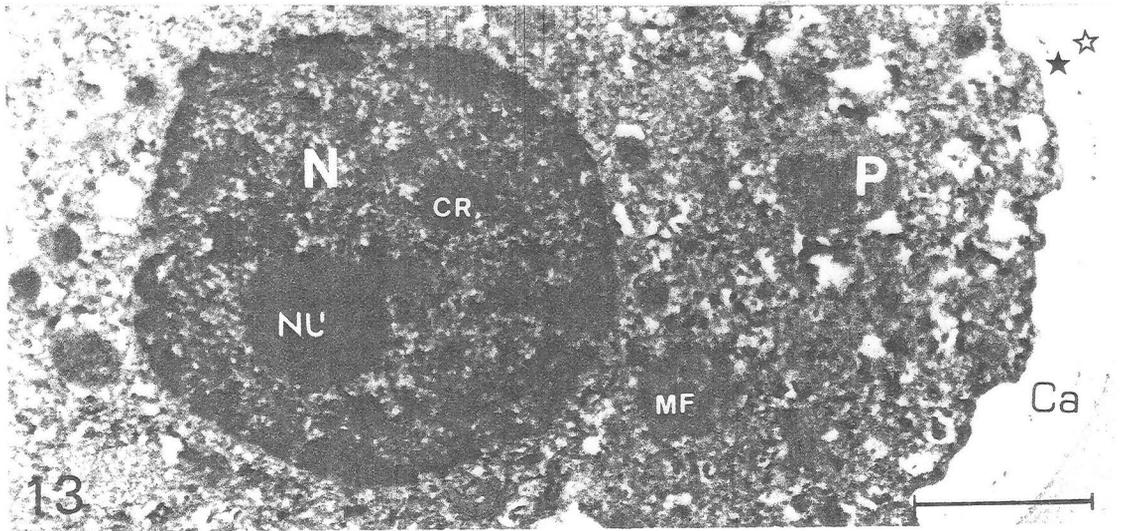
Tetradas en desarrollo

Relación entre la condensación de la cromatina y el grado de desarrollo de la pared.

Fig. 13. Microspora de una tetrada en la que el núcleo presenta gran cantidad de cromatina condensada y la pared especial de calosa aún se está segregando. Fijación con glutaraldehído solo al 3% en tampón cacodilato 0.025 M (x24.000).

Fig. 14 El núcleo de esta microspora presenta un mayor grado de descondensación de la cromatina y entre el plasmalema y la calosa se observan los primeros depósitos de primexina (x12.600).

Fig. 15. El núcleo presenta la cromatina muy descondensada a la vez que comienzan a observarse los primeros indicios de la exina: probaculas (x16.000).



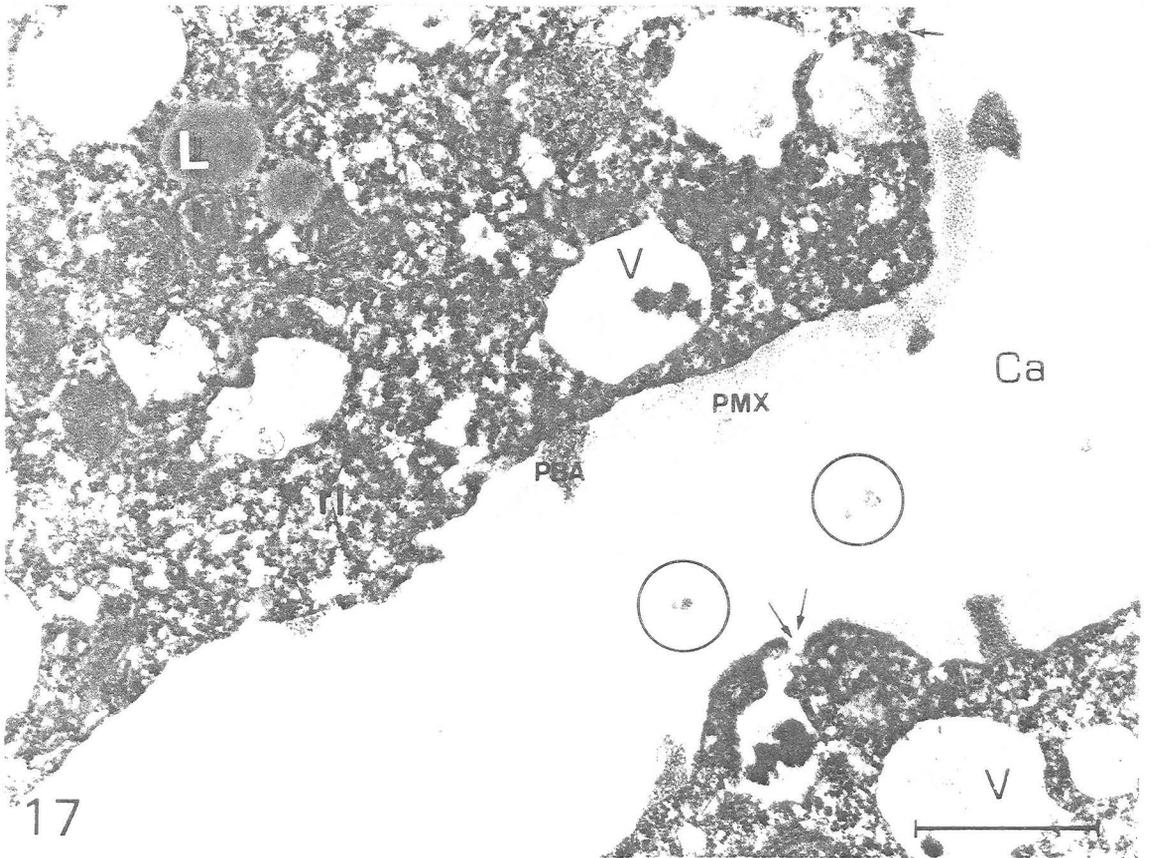
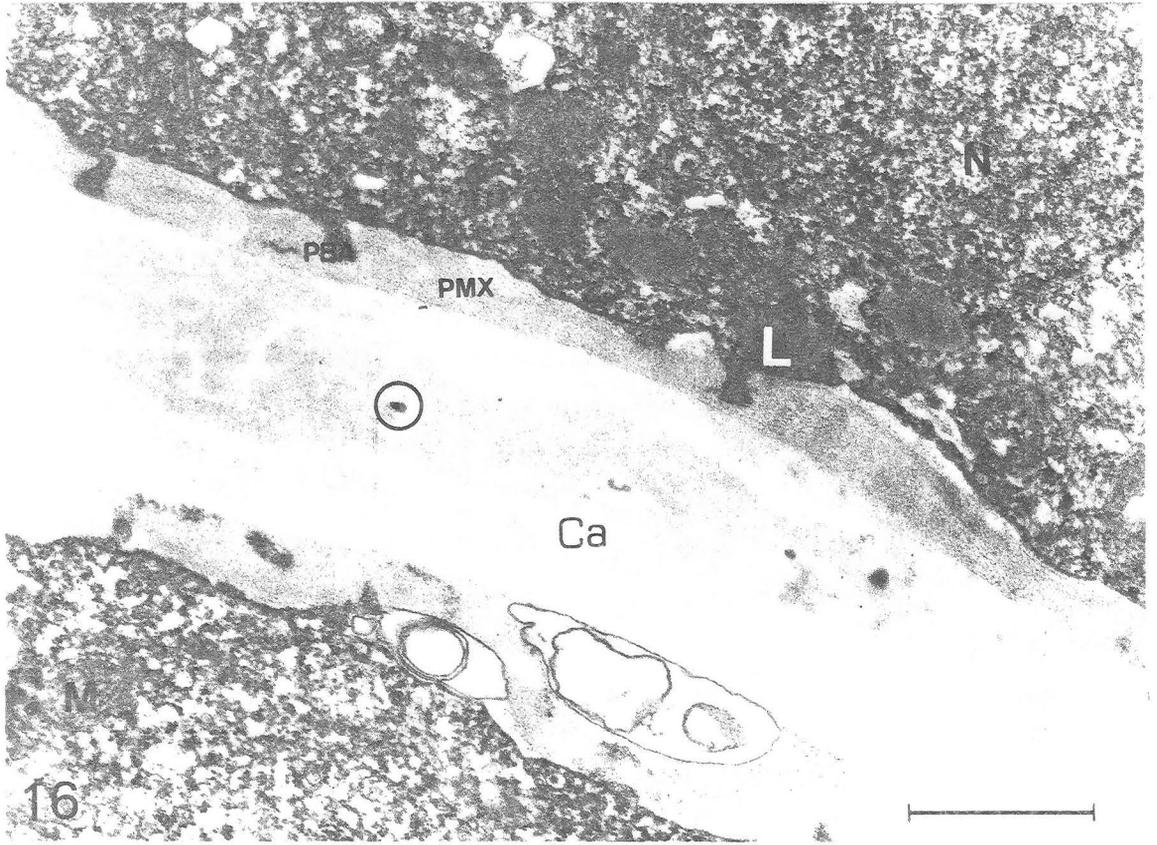
LAMINA VII

Tetradas en desarrollo

Iniciación de la exina

Fig. 16. Tetrada en la que se ha comenzado la formación de las báculas de la exina. En las proximidades del plasmalema se encuentran cuerpos lipídicos. Observense estructuras membranosas en la primexina y partículas densas en la calosa (círculos) (x25.000).

Fig. 17. Formación de las probáculas de la exina en la tetrada. en el citoplasma se observan gran cantidad de vacuolas con contenido de distintas densidades vaciandolo a la primexina (flechas). Observese la riqueza del citoplasma en lípidos y ribosomas así como las partículas densas en la calosa (círculos) (x25.000).



LAMINA VIII

Tetradas en desarrollo

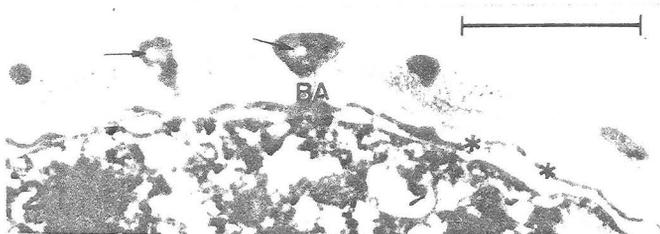
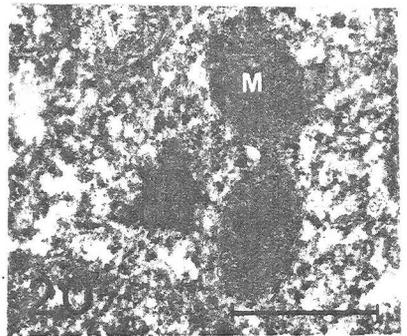
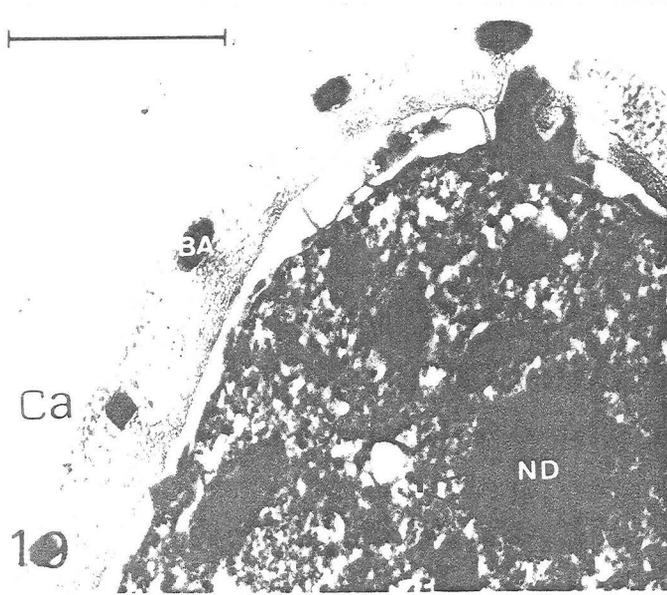
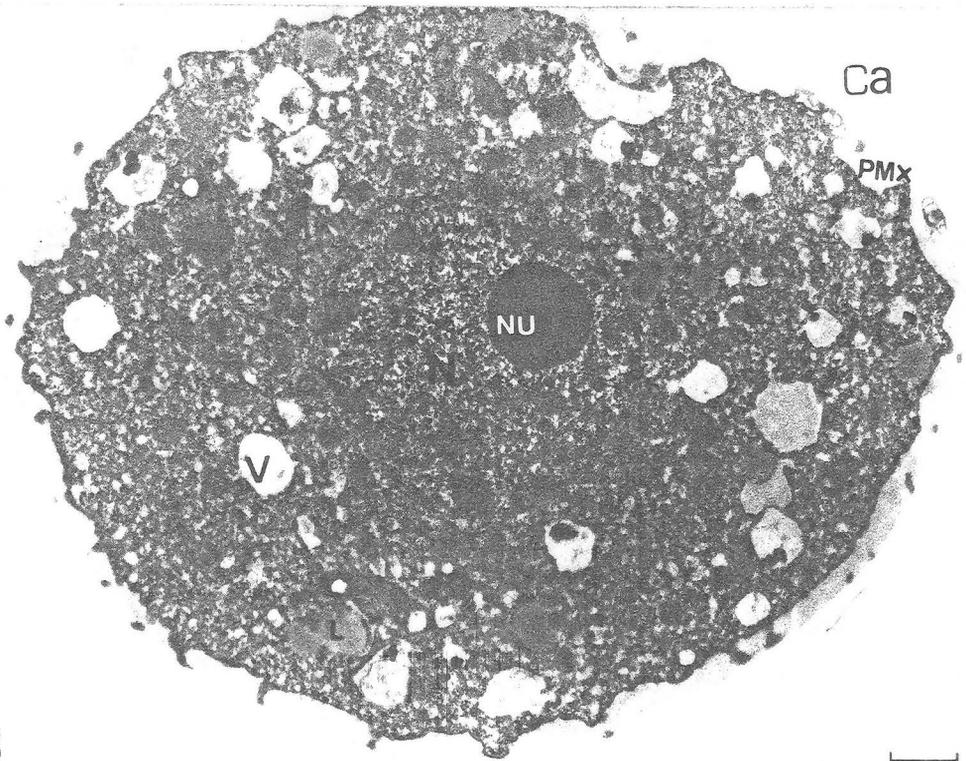
Fig. 18. Vista general de la microspora proxima a liberarse de la pared de calosa. El núcleo en posición central con la cromatina muy descondensada, el citoplasma con gran cantidad de pequeñas vacuolas y lípidos y la pared durante la formación de las probáculas (x9.000).

Fig. 19. Detalle de la pared de la microspora en la que ya se estan formando las báculas propiamente dichas, comienza a observarse una zona con estructuras membranosas debajo de las báculas (★). Observe como el nucleoloide citoplasmático está rodeado de polirribosomas (x28.800).

Fig. 20. Detalle del citoplasma donde se observa una mitocondria en división, con gránulos de elevada densidad en su interior (x20.000).

Fig. 21. Detalle de la pared de una microspora. Las báculas de la exina estan ya muy desarrolladas y en ellas aparecen unos orificios blancos (flechas). La capa basal de la exina aparece ya como una linea continúa que une las báculas por su base (★) (x24.000).

Fig. 22. Detalle del citoplasma donde se observan mitocondrias de largas crestas y una de las escasas cisternas de R.E. proxima a la cubierta nuclear (flechas) (x16.200).



3. MICROSPORAS

Este estadio comienza con la liberación de la microspora de la tetrada, por degradación de la calosa y finaliza con la formación del grano de polen bicelular. En el estadio de microspora se completa la larga interfase iniciada en la tetrada; sigue la profase mitótica y termina con la división asimétrica que da lugar a la célula generativa y vegetativa del grano de polen.

En este estadio ocurren hechos muy significativos como es el rápido aumento del volumen de la microspora que llega a duplicarse gracias a la espectacular vacuolización citoplasmática, característica de este periodo. Simultáneamente tiene lugar una elevada polarización de las organelas celulares que precede a la mitosis asimétrica. En este tiempo también se completa la formación de la pared externa o exina de la microspora y se inicia la formación de la intina.

Teniendo en cuenta estos cambios citados, el estadio de microspora se podría dividir en :

Joven microspora: libre en el lóculo de la antera una vez degradada la pared especial de calosa, el núcleo es central y los orgánulos se distribuyen por igual en todo el citoplasma.

Microspora vacuolada: Cuando el núcleo se ha desplazado lateralmente por la presencia de una o pocas vacuolas grandes y por tanto los orgánulos citoplasmáticos se polarizan.

Microspora en división: desde que el núcleo comienza la división mitótica asimétrica hasta que se forma la pared que separa a las dos nuevas células originadas.

3.1. JOVEN MICROSPORA

3.1.1. Núcleo

En este periodo el núcleo se localiza en el centro de la microspora que llega a ocupar lo mismo que en la tetrada algo menos de la cuarta parte del área celular total.

La cromatina se presenta con diferentes grados de condensación a lo largo de todo el periodo, sin embargo hay una disminución del material de las zonas intercromatínicas, lo que indica una disminución de fibrillas intercromatínicas ya que los gránulos pericromatínicos se observan igual que anteriormente (fig. 23).

El nucléolo a veces en contacto con la cubierta nuclear está constituido unicamente por el componente fibrilar en cuyo interior aparecen espacios claros. Presenta centros fibrilares en cuyo interior se observa cromatina condensada en contacto con espacios claros o vacuolas nucleolares (figs. 23, 24).

3.1.2. Citoplasma

El citoplasma de la microspora recién liberada parece menos denso en orgánulos que el de la tetrada madura.

Las mitocondrias siguen siendo numerosas, pequeñas y de las mismas características que en las tetradas maduras.

Los plastidios en algunas ocasiones presentan pequeños depósitos de almidón en su interior. Se puede observar formas alargadas y en división, y a veces plastidios en forma de cuchara aunque no de forma generalizada (fig. 25).

El aparato de Golgi es poco representativo en comparación con los estadios anteriores, siendo poco frecuente la presencia de dictiosomas.

Los cuerpos lipídicos son francamente escasos en la joven microspora en contraste con lo que ocurría en las últimas fases de desarrollo de las tetradas.

El retículo endoplasmático, sigue siendo escaso, apreciando todavía bajo de forma de cortas cisternas aisladas y a veces en contacto con la cubierta nuclear (fig. 26).

El citoplasma de la microspora joven, menos denso en su contenido que el de la tetrada, tiene también una población ribosómica menor, aunque siguen encontrándose en el citoplasma nucleoloides rodeados por un halo de polirribosomas, que en algunos casos llegan incluso a tener mayor diámetro que el propio nucleoloide (fig. 26). También se observan con frecuencia sólo agregados de polirribosomas por el citoplasma (fig. 27). Por el contrario, ya en esta fase es rara la presencia de las masas fibrilares de densidad media descritas en las tetradas junto a los nucleoloides.

En la microspora joven, inicialmente no hay ningún tipo de vacuolas en su citoplasma, sin embargo, al ir avanzando en su desarrollo aparecen en un momento dado unas vacuolas muy redondeadas o áreas translúcidas a los electrones. Estas áreas pueden llegar a ser muy numerosas y en todo caso su contenido claro es análogo al de unas zonas que van apareciendo en este momento debajo de la exina (figs. 23, 24, 25).

3.1.3. Pared: exina

En la microspora recién liberada, la exina ya está íntegramente

formada por sus diferentes elementos: bacúlas, capa basal y endexina, aunque progresivamente se van produciendo variaciones en las dimensiones de estos. La capa basal, que inicialmente apenas si existía en la tetraedra, se engruesa hasta que en las zonas interaperturales llega a tener aproximadamente igual espesor que la endexina, marcándose una diferencia de contraste entre ambas, siendo la endexina mucho más contrastada (fig. 23). En la parte externa de la endexina, limitando con la capa basal, se pueden distinguir ocasionalmente, unas lamelas semejantes a estructuras de membranas y conocidas en la bibliografía como "White line".

Las báculos o columnas que inicialmente ya están delimitadas en cuanto al número, aumentan progresivamente en sus dimensiones llegando a ser más gruesas en sus ápices. Entre las arcadas de las columnas se aprecia un material fibrilar ténue sin ninguna ordenación determinada (figs. 23, 26). En la extexina continúan observándose los orificios blancos o microcanales de $0.1 \mu\text{m}$. de diámetro y que aparecen distribuidos en ella aparentemente al azar (fig. 29).

En este estadio aún no se observa la intina aunque esporádicamente se observan unas zonas claras como si fueran retracciones del plasmalema con la endexina que son más aparentes en las regiones aperturales (figs. 23, 25, 29).

En las zonas aperturales el plasmalema presenta una depresión hacia el citoplasma quedando encima de él una matriz poco densa a los electrones en forma de lente en la que se observan las lamelas semejantes a estructuras de membranas o "White line" antes descritas correspondientes a una diferenciación de la endexina. Por encima de la endexina disminuye gradualmente la parte estructurada de la exina llegando a desaparecer la capa basal y solo quedando las protuberancias correspondientes a las báculos (figs. 23, 24). Los límites laterales de la endexina diferenciada marcan las

las dimensiones del poro que va aumentando durante su desarrollo.

3.2. MICROSPORA VACUOLADA

Es significativo el aumento del tamaño de la microspora, que en este momento llega a superar el doble del tamaño de la microspora joven.

3.2.1. Núcleo

Durante todo este largo proceso el núcleo se va desplazando paulatinamente hacia un lateral de la microspora, hasta que antes de la división ocupa una posición totalmente lateral, situándose entre dos zonas aperturales. La cubierta nuclear se ondula ligeramente, perdiendo el aspecto esférico de las fases anteriores.

La cromatina alcanza su máxima descondensación, siendo las masas cromatínicas menos abundantes y de menor tamaño que en fases anteriores, hasta que al final de este proceso la cromatina llega a descondensarse totalmente. Las regiones intercromatínicas aumentan progresivamente su contenido en material fibrilar y granular, de tal forma que el contraste que presenta el núcleo en esta fase se debe a este material. Los gránulos pericromatínicos son menos abundantes (figs. 31, 32, 33), pero sin embargo, aparecen otros elementos granulares agrupados que podrían corresponderse con gránulos intercromatínicos de unos 20 a 30 nm (figs. 31, 32).

El nucleolo aparece activo como lo indica la presencia ya de

componente granular aunque no es muy abundante (figs. 31, 32, 37). Los centros fibrilares son difícilmente observables siendo de pequeño tamaño y estructura homogénea (fig. 31). Al final de este periodo el nucleolo se hace todavía más activo y muestra vacuolas de contenido granular que podrían corresponderse a partículas pre-ribosómicas acumuladas (fig. 37).

3.2.3 Citoplasma

El citoplasma en este estadio se hace más rico en su contenido que en el estadio de microspora joven y las organelas citoplasmáticas se polarizan junto con el núcleo a una zona lateral.

Las mitocondrias siguen siendo numerosas, en muchas ocasiones adoptan formas alargadas y presentan una matriz clara con gran cantidad de crestas cortas cortas y gruesas (figs. 31, 32, 35).

Los plastidios se mantienen en número pero aumentan de tamaño y se incrementa su contenido de almidón que con frecuencia puede llegar a ocupar todo el plastidio (fig. 31, 33). En muchas ocasiones igual que las mitocondrias adoptan formas alargadas y sin embargo son pocos los plastidios que adoptan la forma de cuchara o copa (fig. 34).

En la microspora vacuolada se incrementa el número de dictiosomas que constituye el aparato de golgi. Los dictiosomas son de mayor tamaño que en estadios anteriores y de mayor actividad debido a la segregación de vesículas. Estas se localizan en las proximidades de plasmalema y a veces en contacto con él (figs. 35, 38).

También se detecta un ligero aumento en la cantidad de cuerpos lipídicos (fig. 31).

El número de cisternas de retículo endoplasmático rugoso aumenta espectacularmente de forma que las largas cisternas se agrupan paralelamente en paquetes formados incluso por más de 20 de estas cisternas, que se localizan preferentemente en zonas próximas al núcleo (fig. 31).

Igualmente se incrementa considerablemente la población ribosómica en este estadio. los ribosomas preferentemente forman polirribosomas dispersos por la matriz citoplasmática dándole un típico aspecto punteado a ésta (figs. 30, 35).

Durante la vacuolización de la microspora llegan a desaparecer los nucleoloides y sólo en muy raras ocasiones se encuentran agregados de partículas semejantes a polirribosomas (fig. 28). Como se puede ver existe una relación entre la desaparición de los nucleoloides en el citoplasma de la microspora y el incremento de los ribosomas.

Al principio del proceso de vacuolización el citoplasma de la microspora presenta algunas vacuolas que gradualmente van aumentando en tamaño y disminuyendo en número siendo cada vez mayor el espacio citoplasmático ocupado por el sistema vacuolar. Cerca de las vacuolas son frecuentes cisternas de retículo rugoso paralelas al tonoplasto (figs. 30, 36). El interior de estas vacuolas presenta un material fibrilar de densidad media disperso por la matriz clara. En ocasiones pueden aparecer inclusiones muy densas a los electrones así como estructuras membranosas (figs. 31, 33). Adosado a la parte interna del tonoplasto se encuentra acúmulos de material granular muy denso que nos recuerda a restos de ribosomas en degradación (fig. 36). Estas vacuolas se irán fusionando hasta que en el periodo más próximo a la división celular solo queda una gran vacuola que ocupa la mayor parte de la célula y desplaza al núcleo y demás organulos lateralmente hacia un extremo del grano llegándose a alcanzar una marcada polarización celular (fig. 32).

3.2.3. Pared: Exina, iniciación de la intina

Durante la vacuolización de la microspora se inicia el depósito de la intina que aparece como una delgada zona poco densa entre el plasmalema y la endexina (figs. 32, 38). Esta capa es de espesor constante salvo en las zonas aperturales donde adquiere un gran desarrollo (figs. 33, 34). En las proximidades de la intina se localizan dictiosomas muy activos con gran cantidad de vesículas en los extremos y vesículas aisladas que entran en contacto con el plasmalema (figs. 35, 38).

La exina continúa su desarrollo, las columnas de la ectexina se engruesan fundamentalmente en sus ápices, de forma que algunas se pueden unir entre sí. El material fibrilar situado entre las arcadas de la exina, ya observado anteriormente se condensa en la base de estas arcadas formando una cubierta de la capa basal de la exina (fig 36).

En las zonas aperturales la intina se hace considerablemente de mayor tamaño. El plasmalema continúa arqueado hacia dentro formando la intina una especie de bolsa o casquete, entre el anterior espacio en forma de lente de la endexina (observado en la joven microspora) y el plasmalema. Simultáneamente el plasmalema de esta regiones presenta delgadas evaginaciones que dan lugar a pequeños túbulos ramificados dentro de la intina (figs. 33, 34, 35).

3.3. MICROSPORA EN DIVISION

Una vez alcanzada la polarización de la microspora gracias a la presencia de la gran vacuola central, la microspora entra en su primera división mitótica que es asimétrica y la llevará a transformarse en grano de polen bicelular.

En este momento la cromatina alcanza su máximo grado de condensación como corresponde a su estado profásico y el nucleolo entra en fase de dispersión haciéndose los centros fibrilares de mayor tamaño y heterogéneos (fig. 39). Al final de la profase la envoltura nuclear se rompe y los cromosomas se dispersan por el citoplasma ordenándose en la metafase en un plano próximo a la pared celular en un citoplasma rico en ribosomas (fig. 40). Se observan los microtúbulos correspondientes al huso acromático más o menos paralelos entre sí y perpendiculares al plano de división. Estos microtúbulos parten de ambos lados de los cromosomas y desaparecen por un extremo en las proximidades del plasmalema y por el otro en las proximidades de los orgánulos (fig. 40). En el interior de la zona donde están los cromosomas no se observa ningún orgánulo.

En telofase, los cromosomas tienden a reorganizarse en cada uno de los polos para formar los núcleos hijos (fig. 41), que posteriormente adquieren de nuevo la forma esférica característica de la interfase. Simultáneamente se observan entre los microtúbulos del huso mitótico en el plano ecuatorial vesículas redondeadas de contenido transparente a los electrones (fig. 41) y que funden entre sí para dar el tabique de separación de las dos nuevas células formadas: célula generativa y célula vegetativa con diferente dotación citoplasmática ya que hay una desigual repartición de los orgánulos tras la división mitótica asimétrica (fig. 42).

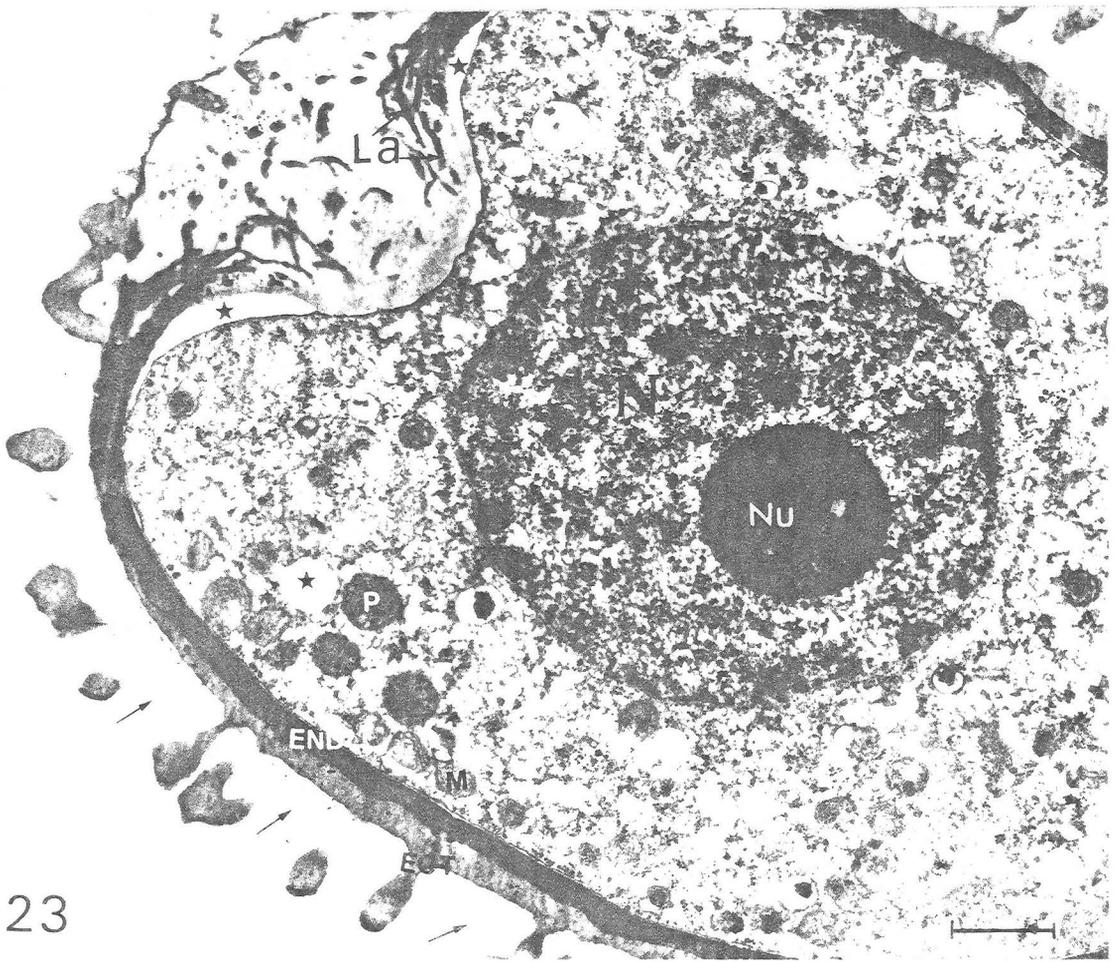
LAMINA IX

Microspora Joven

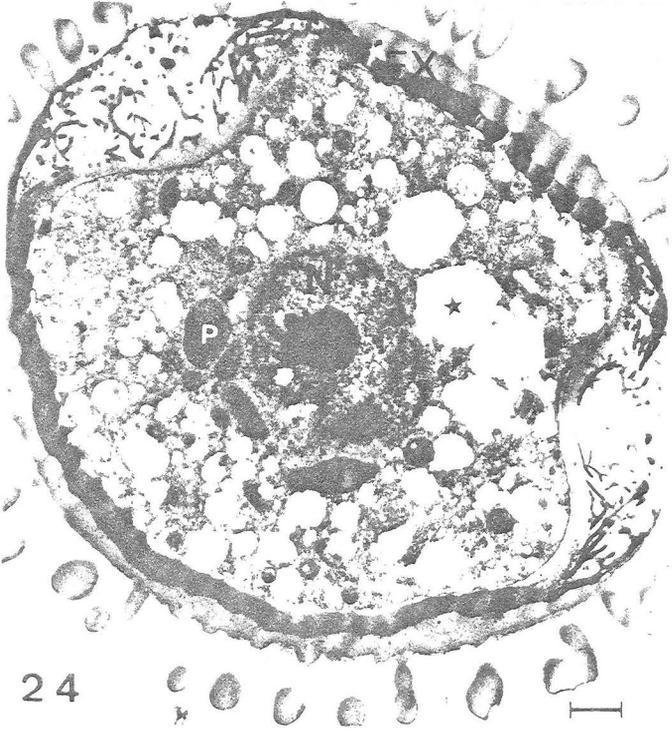
Fig. 23. El núcleo central con la cromatina bastante descondensada. Se observa una disminución del material intercromatínico aunque continúan los gránulos pericromatínicos. El nucleolo con pequeñas vacuolas nucleolares en contacto con centros fibrilares. En el citoplasma se observan unas áreas claras semejantes a las que aparecen bajo la endexina apertural (★). La exina ya está formada. La endexina se diferencia en la región de las aperturas en un espacio en forma de lente donde se localizan unas lamelas. Obsérvese el material fibrilar localizado entre las arcadas de la exina (flechas) en aparente desorden (x14.000).

Fig. 24. Microspora joven donde el citoplasma presenta gran cantidad de áreas claras (★). Obsérvese como debajo de la exina todavía no hay zonas claras (x7.000).

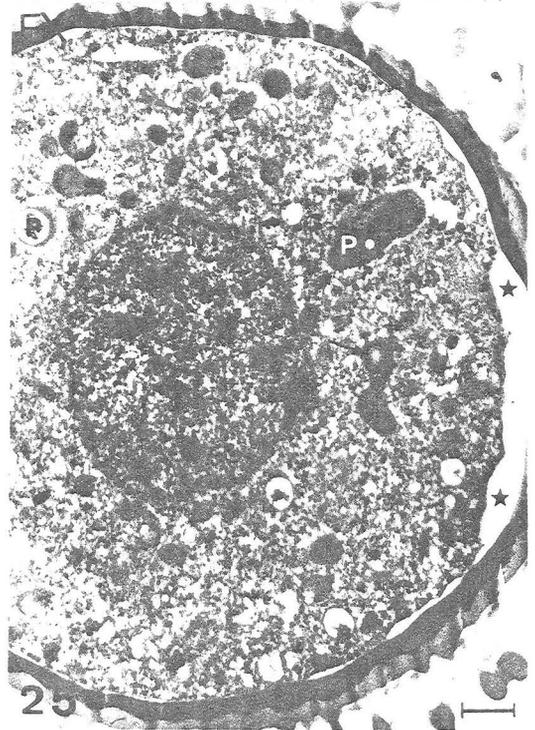
Fig. 25. Microspora joven con áreas claras debajo de la exina interapertural (★) y con pocas áreas claras en el citoplasma. Obsérvese plastidios con indicios del almidón (flechas), en división y otros en forma de cuchara (x7.000).



23



24



25

LAMINA X

Microspora joven y microspora vacuolada

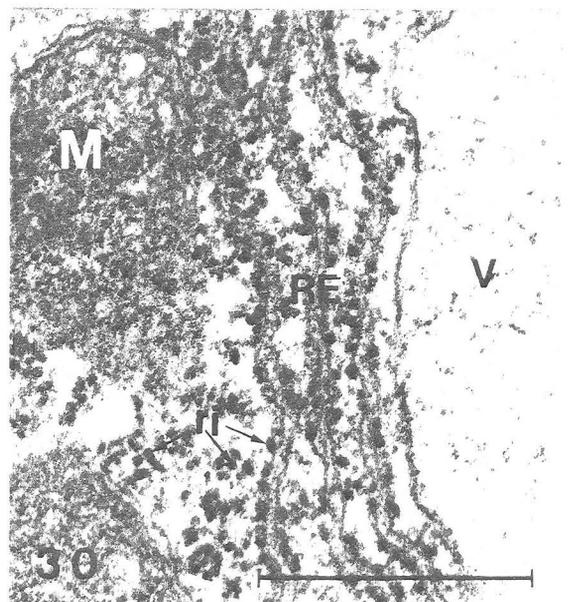
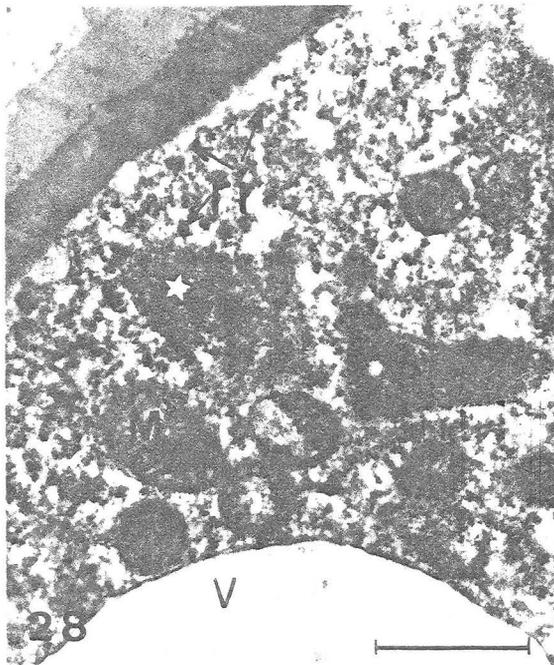
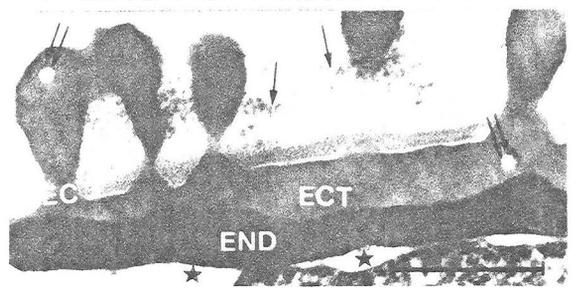
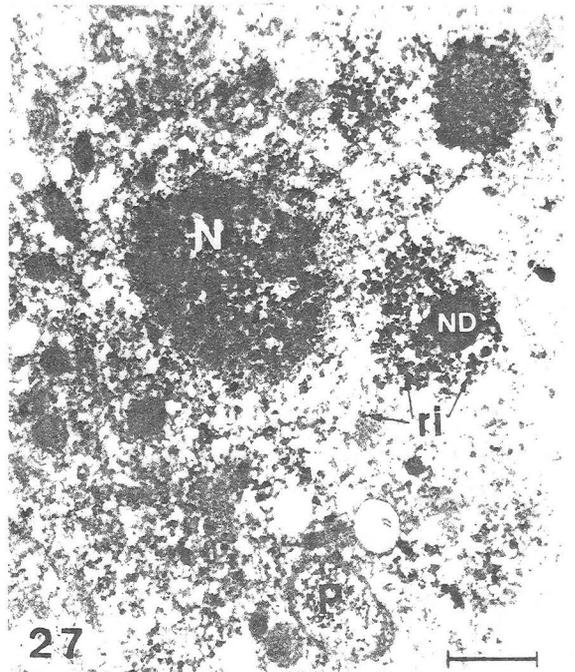
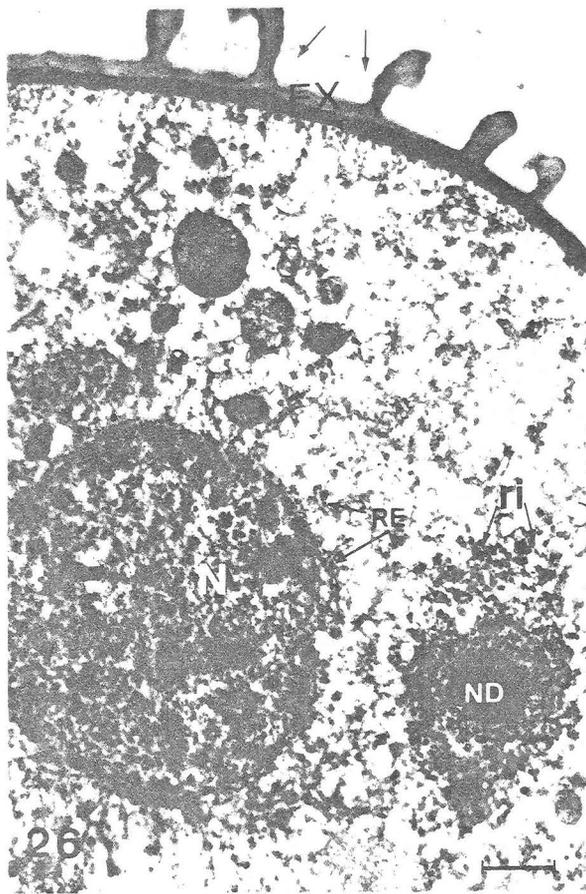
Fig. 26. Joven microspora con el núcleo en el centro. Cromatina en fase de descondensación. Citoplasma pobre en ribosomas donde se localiza un nucleolo rodeado de polirribosomas. Cortas y escasas cisternas de retículo endoplasmático proximas a la cubierta nuclear. La exina ya está formada. (x9.500).

Fig. 27. Citoplasma de la microspora joven con escasos ribosomas dispersos y algunos agrupados. Nucleolo rodeado de ribosomas. (x12.000).

Fig. 28. Microspora vacuolada con numerosos ribosomas dispersos por el citoplasma y un acúmulo de ribosomas (★) (x20.000).

Fig. 29. Pared de la microspora joven constituida por los dos estratos de la exina: la endexina más densa y la ectexina más clara, con unos orificios transparentes a los electrones (doble flecha). Entre las báculas se localiza un material fibrilar sin ordenación determinada (flechas). Debajo de la exina se observa un espacio transparente a los electrones (★) (x20.000).

Fig. 30. Detalle del citoplasma de la microspora vacuolada con largas cisternas de retículo endoplasmático rugoso en las proximidades de una vacuola. Ribosomas dispersos por el citoplasma fundamental (x36.800).

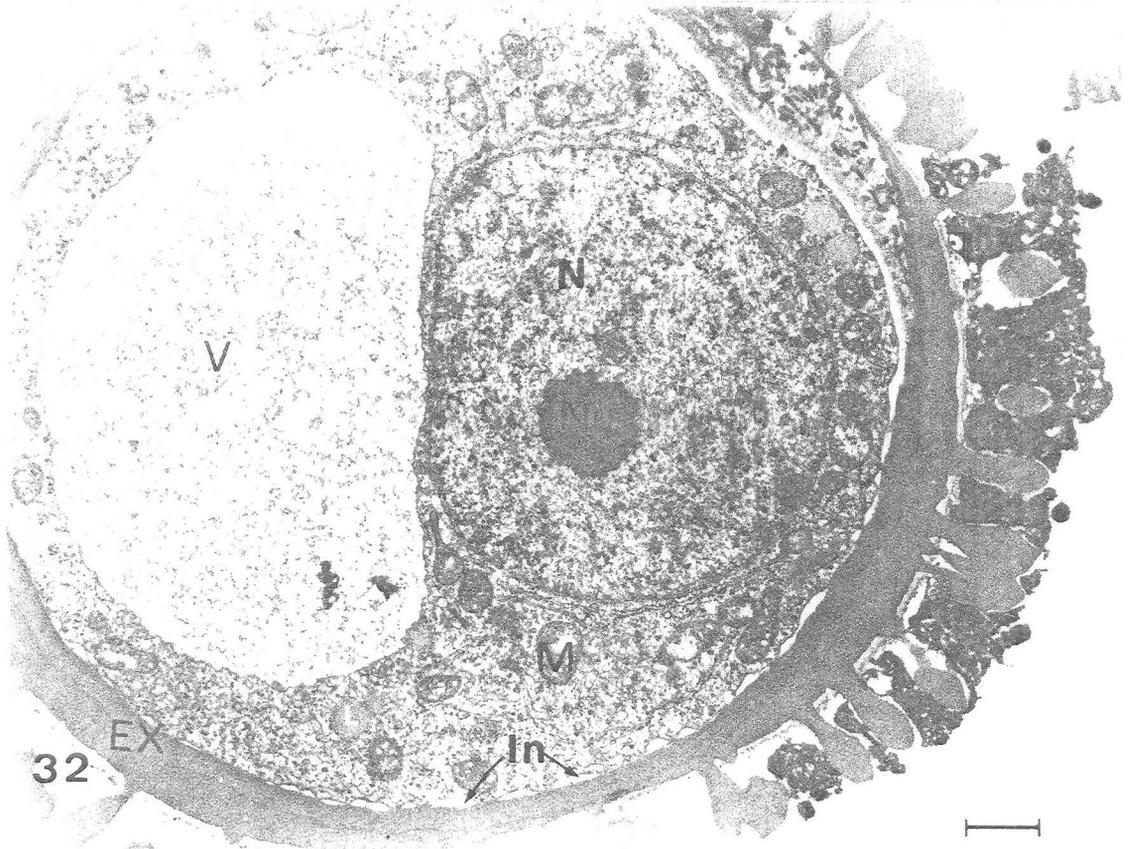
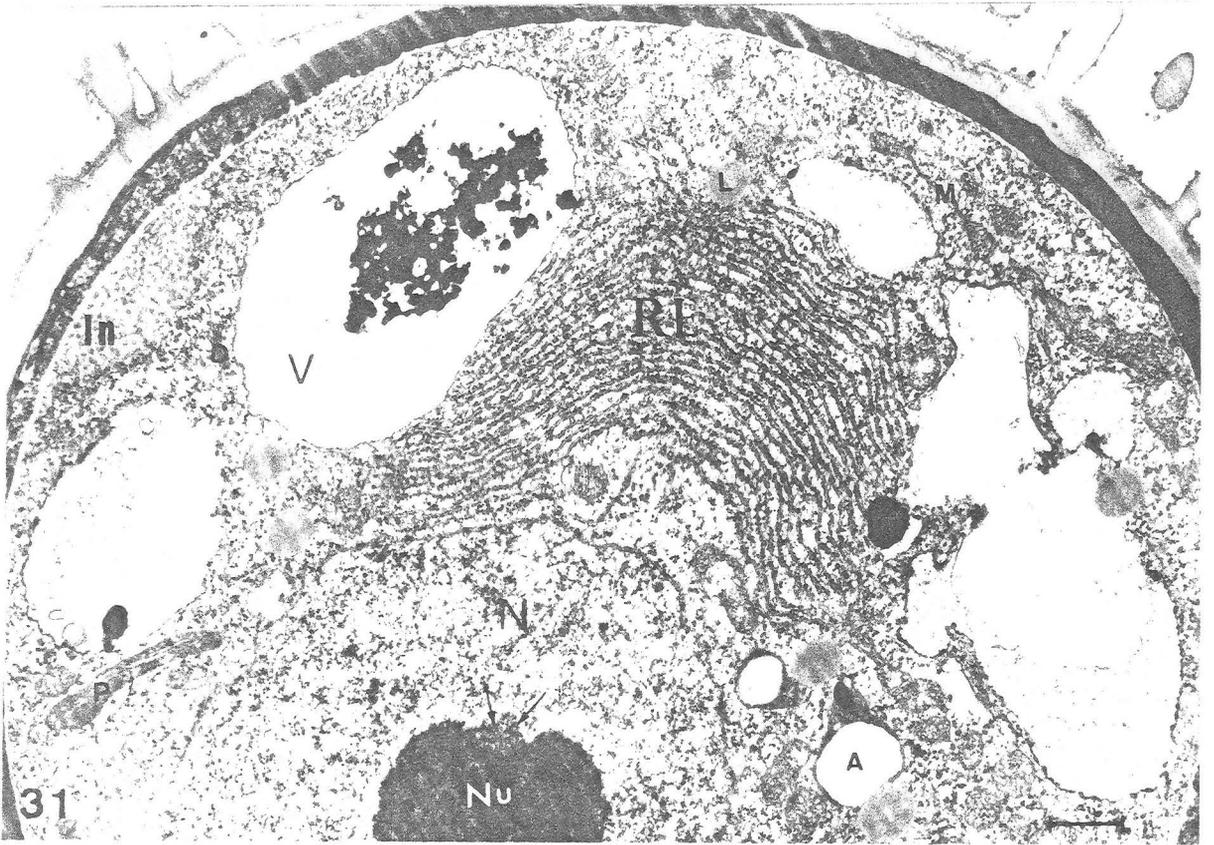


LAMINA XI

Microspora vacuolada

Fig. 31. Microspora vacuolada con el citoplasma cargado de largas cisternas de retículo endoplasmático rugoso en las proximidades de un núcleo con la cromatina prácticamente descondensada, las zonas intercromatinicas aumentan su contenido en material fibrilar y granular aunque hay una disminución de gránulos pericromatínicos respecto a fases anteriores. Núcleo con su organizador nucleolar (flechas), que aparece activo ya que presenta algo de componente granular con centros fibrilares de pequeño tamaño. El citoplasma presenta grandes vacuolas con diferente grado de densidad en su contenido: fibrilar o glomérulos muy densos. Algunos lípidos, mitocondrias y plastidios a veces en formas alargadas. Observese el desarrollo de la intina sobre todo en la zona apertural (x9.800).

Fig.32. Microspora con una gran vacuola que ocupa practicamente la mitad de la célula desplazando el núcleo y la mayor parte de los orgánulos hacia el polo opuesto. Inicio de la formación de la intina. En las zonas intercromatínicas se observan elementos granulares agrupados que responderían a gránulos intercromatínicos además de pocos gránulos pericromatínicos. Fijación: glutaraldehido osmio usando tampón fosfato (x10.000).



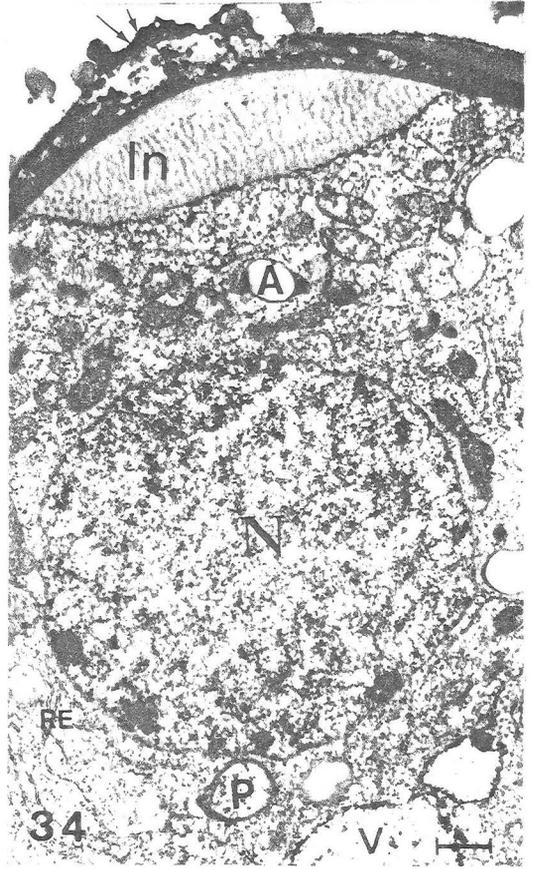
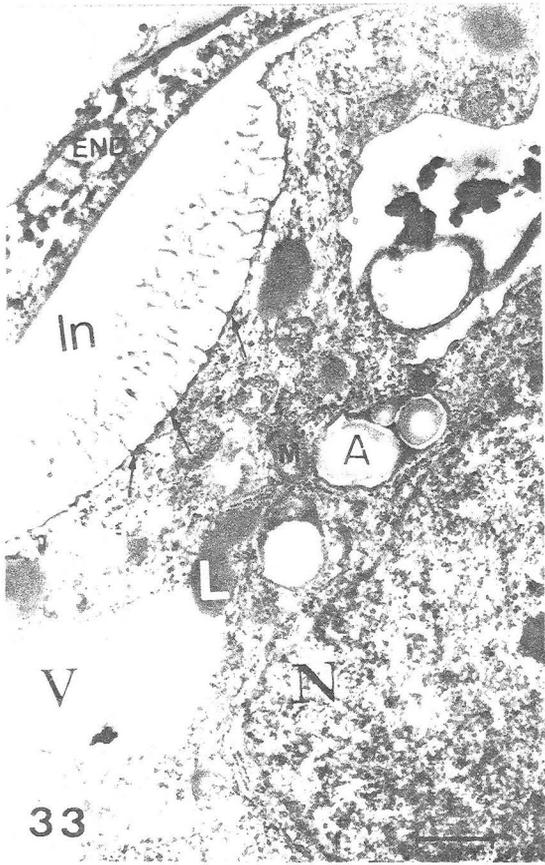
LAMINA XII

Microspora vacuolada

Fig. 33. Zona de la intina apertural, entre el plasmalema curvado hacia el citoplasma y la endexina de forma alargada. El plasmalema en esta zona está produciendo túbulos hacia la intina apertural (flechas). En el citoplasma, vacuolas con membranas en su interior (x10.000).

Fig. 34. Microspora con el núcleo central y la cromatina muy descondensada. La intina de las aperturas llena de túbulos. Coronando a la apertura encontramos una cubierta de material denso (★) (x7.200).

Fig. 35. Detalle del citoplasma de la microspora vacuolada. La intina apertural está cargada de túbulos observándose su continuidad con el resto de la intina. La endexina con estructuras lamelares. Dictiosomas proximos a la intina y vesículas en las proximidades del plasmalema (flechas). Obsérvese la abundancia de ribosomas citoplasmáticos (x22.000).



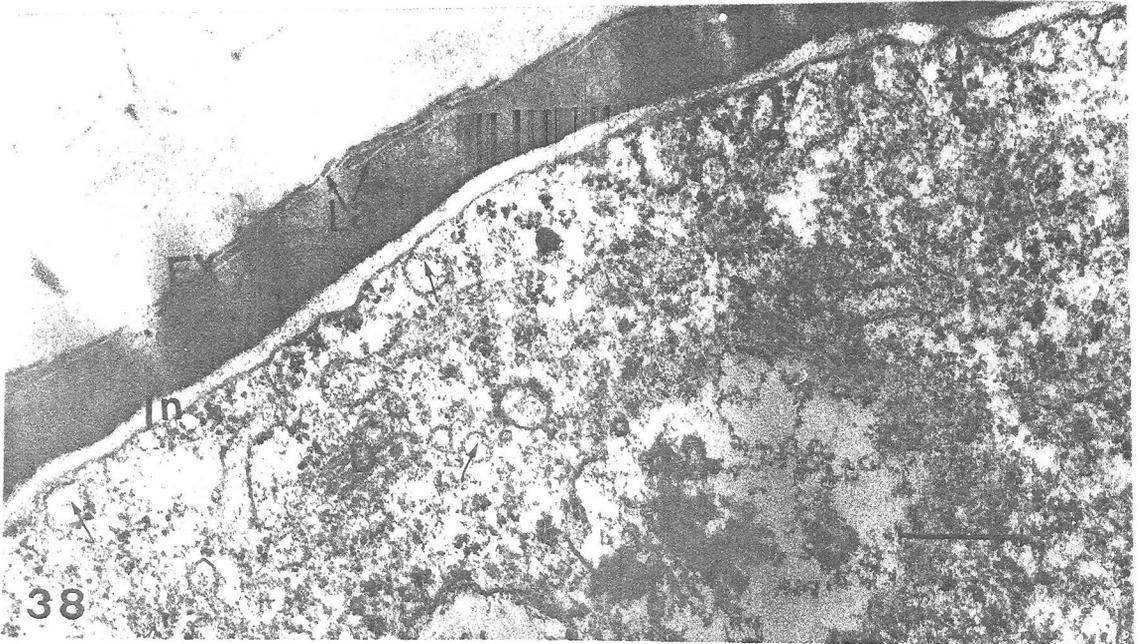
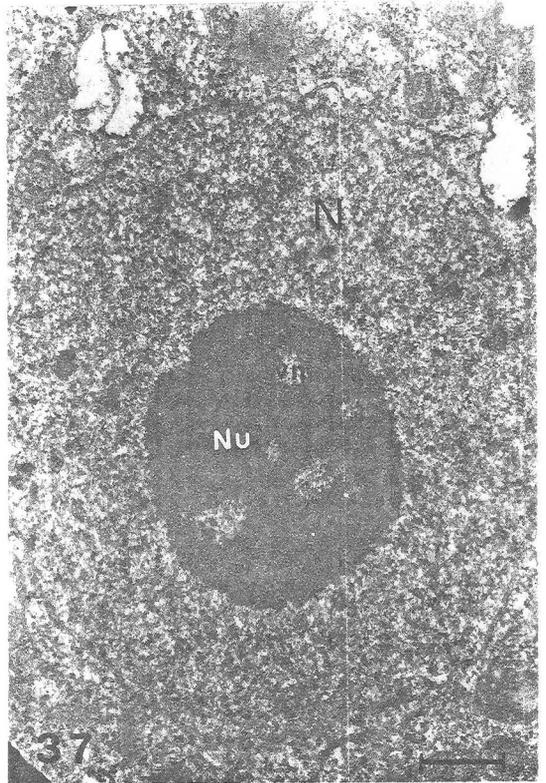
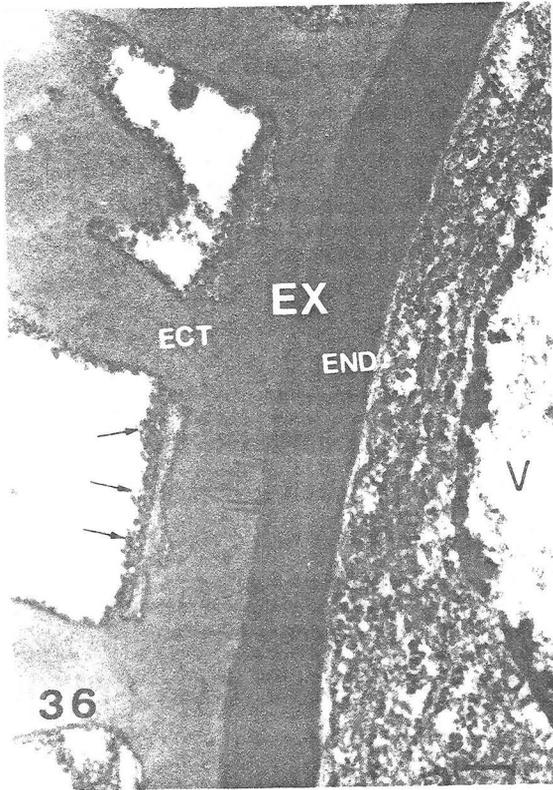
LAMINA XIII

Microspora vacuolada

Fig. 36. Pared de la microspora vacuolada. En la endexina, en el límite con la capa basal de la ectexina, se pueden distinguir estructuras lamelares con una línea central más clara (doble flecha). Material fibrilar entre las arcadas que cubre a la capa basal (flechas). Cisternas de R.E. se encuentran paralelas y próximas a la superficie del grano. Obsérvese el material muy denso adosado a la membrana vacuolar (x7.600).

Fig. 37. Núcleo de microspora vacuolada próximo a la división mitótica asimétrica con la cromatina totalmente descondensada. Las zonas intercromatínicas son ricas en material fibrilar y granular. El nucléolo es muy activo como lo indican sus vacuolas de contenido granular que corresponderían a partículas preribósomias acumuladas (x10.800).

Fig. 38. Detalle de la formación de la intina interapertural con dictiosomas próximos a ella emitiendo vesículas (flechas) las cuales también se observan en contacto con el plasmalema. Se distinguen claramente las estructuras lamelares características de la endexina (x16.000).



LAMINA XIV

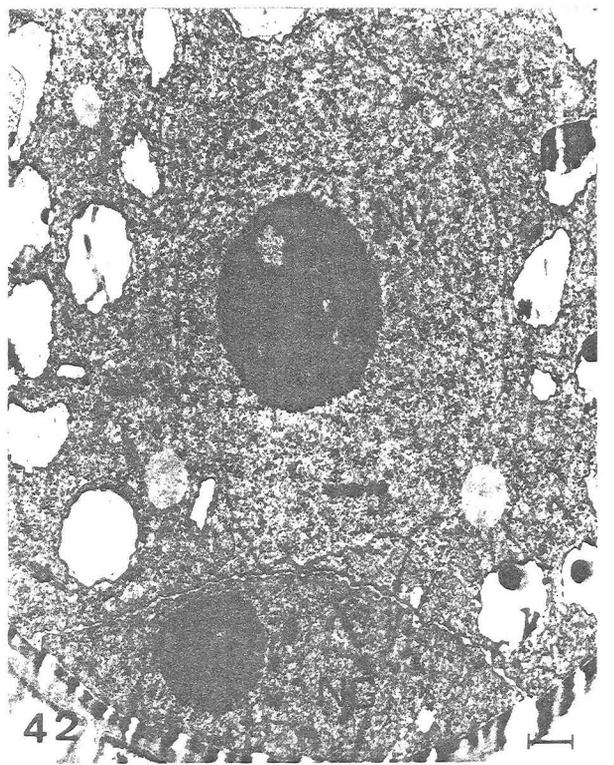
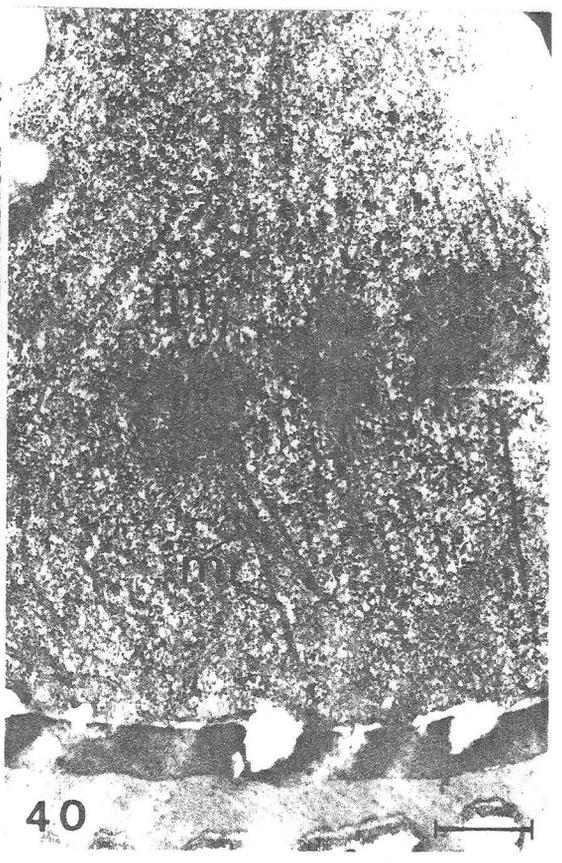
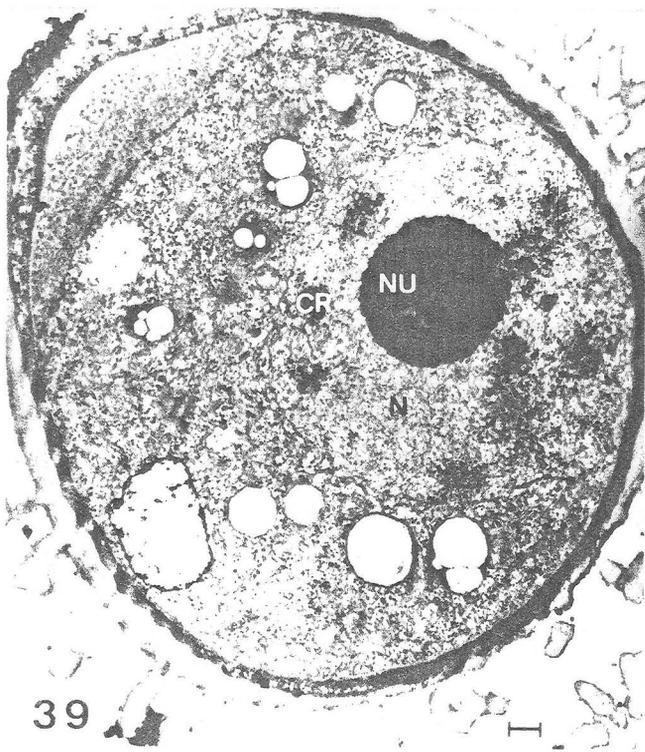
Microspora en división: mitosis asimétrica

Fig. 39. El núcleo de la microspora se encuentra desplazado lateralmente. La cromatina comienza a condensarse correspondiéndose a una profase muy temprana (x4.100).

Fig. 40. Microspora en metafase. Los cromosomas, situados en el plano de división cerca de la pared, de los que parten microtúbulos a ambos polos celulares (x13.000).

Fig. 41. Microspora en final de telofase, reorganizándose los dos nuevos núcleos todavía unidos por microtúbulos. En la zona media entre los núcleos se pueden observar gran cantidad de pequeñas vesículas transparentes a los electrones (círculos) alineadas, iniciándose así la nueva pared celular entre las dos nuevas células (x7.000).

Fig. 42. Grano de polen bicelular recién formado con sus nuevas células: generativa y vegetativa. La pared celular que separa las dos células ya se ha completado (flechas). El núcleo vegetativo con la cromatina muy descondensada y el nucleolo con los componentes fibrilar y granular entremezclados y con vacuolas en su interior. El núcleo generativo de cromatina más condensada que el anterior y el nucleolo con centros fibrilares (x6.400).



4. GRANO DE POLEN

Después de la mitosis asimétrica postmeiotica, con la formación de las células generativa y vegetativa, se inicia la maduración del grano de polen. Este periodo es el más largo de todos los que hasta ahora se han estudiado, durante el que ambas células sufren cambios morfológicos importantes, reflejo de cambios metabólicos que se producen en este tiempo en el grano. Para su estudio subdividimos este periodo atendiendo fundamentalmente a la forma y posición de la célula generativa en :

Joven grano de polen: recién terminada la división celular, cuando la célula generativa de forma elipsoidal todavía está unida a la pared del grano.

Grano de polen medio: cuando la célula generativa se independiza de la pared del grano y adquiere una forma más o menos esférica rodeada completamente por el citoplasma de la célula generativa.

Grano maduro: Cuando la célula generativa vuelve a tener una forma alargada elipsoidal desplazándose hacia uno de los poros, opuestos al polo donde inicialmente se había formado.

4.1. JOVEN GRANO DE POLEN

4.1.1. Célula vegetativa

4.1.1.1. Núcleo

El núcleo vegetativo en el grano bicelular joven es de mayor tamaño que el generativo situándose en el centro del grano. Este

núcleo es esférico aunque la cubierta nuclear presenta ligeras ondulaciones.

La cromatina alcanza rápidamente el grado máximo de descondensación (fig. 42).

Las regiones intercromatínicas son muy activas ya que tienen gran cantidad de material semidenso a los electrones constituido por fibrillas inter y pericromatínicas, numerosos gránulos pericromatínicos y algunos grupos de gránulos intercromatínicos (fig. 42).

El nucléolo formado por componente fibrilar y granular finamente entremezclado presenta centros fibrilares de pequeño tamaño y difíciles de observar. El nucleolo presenta vacuolas de contenido granular, típicas de su estado activo (fig. 42).

4.1.1.2 Citoplasma

El citoplasma del grano de polen desde su inicio es rico en su contenido, especialmente en la célula vegetativa, en donde se encuentran todos los plastidios y la mayor parte de los demás orgánulos celulares. Esta densidad en orgánulos e inclusiones paraplastmáticas aumenta progresivamente a lo largo de la maduración del grano.

Las mitocondrias en número elevado, que se mantiene a lo largo del desarrollo del polen son generalmente de forma ovoidea, presentan gran cantidad de crestas mitocondriales que indican una elevada funcionalidad. Son poco frecuentes las formas alargadas.

Los plastidios que en su totalidad han quedado en esta célula

después de la división asimétrica, aumentan ligeramente en número con respecto a la microspora y todos ellos están cargados por uno o más granos de almidón de considerable tamaño que llegan a ocupar incluso el plastidio completamente (fig. 43).

El aparato de Golgi está representado por un elevado número de dictiosomas, constituidos por cisternas muy activas, agrupadas en número de 4 ó 5 por dictiosoma. Los dictiosomas se encuentran dispersos por todo el citoplasma observándose con frecuencia en las zonas cercanas a la pared celular, fundamentalmente en las proximidades de los poros (fig. 42).

Las cisternas de retículo endoplasmático rugoso siguen encontrándose en gran cantidad durante esta fase, aunque es menos frecuente observarlas agrupadas en paquetes paralelos ya que mayoritariamente estas cisternas están aisladas o con ramificaciones (fig. 47).

El citoplasma continúa siendo muy rico en ribosomas, encontrándose la mayoría formando polirribosomas dispersos por el citoplasma fundamental (figs. 44, 47).

También se observa un ligero aumento de cuerpos lipídicos (fig. 43).

En este estadio merece destacar el cambio que sufre la gran vacuola que ocupaba la mayoría del citoplasma en el estadio anterior y que parece fragmentarse en vacuolas más pequeñas, encontrándose ahora en mayor número y con un material muy denso en los bordes del tonoplasto e inclusiones muy electrodensas (figs. 45, 47). Es frecuente observar rodeando a las vacuolas cisternas de retículo endoplasmático rugoso (fig. 47).

4.1.1.3. Pared: Exina e intina.

Cuando se forma el polen bicelular, la exina ya ha quedado prácticamente formada y la intina que es continúa con la pared de la joven célula generativa, comienza a aumentar progresivamente en espesor (fig. 44). Sin embargo, es en este periodo cuando el desarrollo de las zonas aperturales es más evidente. El plasmalema, pierde su curvatura hacia el interior del citoplasma para ponerse en un plano horizontal a la vez que se incrementa la cantidad de túbulos de la intina poral, con un contenido todavía poco denso a los electrones (figs. 43, 49). La región en forma de lente de la endexina disminuye en espesor para aumentar en longitud, perdiendo por tanto esta forma. En cortes ecuatoriales se observa en la parte externa apical del poro una fina capa de material fibrilar muy densa a los electrones a cuyos lados se encuentran pequeñas columnas de la ectexina que se insertan directamente en la endexina faltando por tanto, la capa basal (fig. 43).

4.1.2. Célula Generativa

4.1.2.1. Núcleo

El núcleo es ligeramente alargado, adaptándose a la forma elipsoidal que tiene la célula en este tiempo y la ocupa prácticamente salvo en una estrecha zona de citoplasma que le rodea (fig 42).

Las masas de cromatina están algo más condensadas que en el núcleo vegetativo de la otra célula.

Las zonas intercromatínicas presentan solamente material fibrilar y algunos gránulos pericromatínicos.

El nucleolo presenta los dos componentes: componente fibrilar y granular lo que es índice de una cierta actividad, además presenta centros fibrilares de mayor tamaño que los del nucleolo de la célula vegetativa (fig. 42).

4.1.2.2. Citoplasma

En esta célula es muy reducido, con una población ribosómica análoga a la de la célula vegetativa, alguna cisterna de retículo endoplasmático y algún otro orgánulo aislado como mitocondrias, dictiosomas, cuerpos lipídicos o vacuolas pero nunca plastidios (figs. 43, 44).

4.1.2.3. Pared: continuidad de la intina

Cuando el grano de polen está recién formado es frecuente observar como el tabique de separación entre las dos células aún no se han completado, de forma que en los extremos de la célula generativa en la zona más próxima a la pared del polen se pueden observar vesículas de gran tamaño aún sin fusionarse y con microtúbulos perpendiculares entre ellas, restos del aparato mitótico (fig. 44).

Cuando la pared ya se ha completado esta se mantiene unida a la intina y está constituida por dos membranas que dejan en su interior una zona transparente a los electrones de grosor prácticamente constante, aunque en algunas zonas puede engrosarse algo más lo que le confiere una ligera irregularidad a la pared (figs. 42, 43). Posteriormente la célula generativa se va abombando

adquiriendo una forma más o menos esférica hasta llegar a estrangularse e independizarse de la pared del grano (figs. 45, 46).

4.2 GRANO DE POLEN MEDIO

4.2.1. Célula vegetativa

4.2.1.1. Núcleo

El núcleo vegetativo mantiene su forma esférica. La cromatina se observa prácticamente descondensada mostrando algunas masas de cromatina muy densas que son de diferente tamaño muy próximas a la cubierta nuclear (fig. 51).

Las zonas intercromatínicas van perdiendo el material semidensado a los electrones siendo prácticamente las únicas estructuras que se mantienen los gránulos pericromatínicos.

El nucleolo va perdiendo su actividad.

4.2.1.2. Citoplasma

En general el contenido citoplasmático de este estadio es más rico en organelas que en las fases anteriores.

Las mitocondrias sin ninguna característica específica, son en su mayoría ovoides y raramente presentan alguna forma alargada.

Se hace evidente el aumento de plastidios y gránulos de almidón respecto al estadio anterior, siendo este el periodo de mayor contenido en almidón (figs. 50, 51).

Los dictiosomas que constituyen el aparato de golgi se encuentran dispersos por el citoplasma sin ninguna localización preferencial, ni actividad secretora al menos aparentemente.

Las cisternas de retículo endoplasmático rugoso solo ocasionalmente se encuentran agrupadas paralelamente. Sin embargo, estas siempre aparecen dilatadas y con una mayor densidad a los electrones en su contenido (fig. 52).

Es notable el aumento de los cuerposlipídicos en esta fase (fig. 46) encontrándose estos en estrecha relación con ribosomas y cisternas de retículo endoplasmático rugoso (fig. 52) así como agrupados entre sí (fig. 51).

Las vacuolas en este estadio son numerosas y muy pequeñas pudiendose considerar como vesículas grandes con inclusiones globulares muy densas en su interior (fig. 50, 51).

4.2.1.3 Pared: Exina e intina

En esta fase aunque la pared no presenta nuevos elementos estructurales, a excepción de las regiones aperturales, se aprecia sin embargo, un aumento del grosor de la ectexina especialmente en la capa basal. El material fibrilar que anteriormente era observado en la base de las arcadas de la exina ahora, se extiende hacia las báculas o columnas, llegando a formar una cubierta de la ectexina, salvo en la parte superior de estas báculas (fig. 53).

En las zonas aperturales se puede observar un abombamiento del plasmalema hacia afuera el cual ya cesa en la emisión de su evaginaciones para formar los túbulos de la intina poral. Al mismo tiempo se forma una zona de intina homegénea entre el plasmalema y los

túbulos que hace que estos se aproximen cada vez más al ápice del poro. Los túbulos parecen llenarse gradualmente de un material denso a los electrones. La capa situada encima de la intina poral (endexina) se va haciendo más delgada, aumentando en longitud y la masa fibrilar densa que corona al poro aumenta de grosor (figs. 48, 50, 51).

4.2.2. Célula generativa.

En este estadio la célula generativa adquiere forma esférica, con su núcleo central que se adapta a la forma de la célula y está rodeado por una delgada capa de citoplasma (fig. 51).

4.2.2.1. Nucleo.

Se observa una progresiva condensación de la cromatina en masas de gran tamaño que se adosan frecuentemente a la membrana nuclear (fig.46).

Las zonas intercromatínicas, bastante escasas, mantienen los gránulos pericromatínicos (figs. 46, 51).

El nucleolo aparece densamente empaquetado, constituido sólo por el componente fibrilar (fig. 51).

4.2.2.2. Citoplasma.

El escaso citoplasma que posee esta célula mantiene las características del estadio anterior.

4.2.2.3. Pared: independización de la intina.

La pared ya formada en el estadio anterior mantiene constante sus características a lo largo de su desarrollo.

4.3. GRANO MADURO

4.3.1. Célula vegetativa

4.3.1.1. Núcleo

Este núcleo en el grano maduro sigue ocupando una posición central. La cubierta nuclear se va ondulando progresivamente de forma que en un estadio avanzado se puede encontrar el núcleo totalmente lobulado y de aspecto "ameboideo" (fig. 54).

La cromatina se mantiene en estado de semidescondensación (fig. 54).

El nucléolo disminuye considerablemente su tamaño quedando como un resto fibrilar.

4.3.1.2. Citoplasma

El citoplasma es tan rico en este estadio que es difícil distinguir con nitidez la individualidad de sus diferentes componentes (fig. 54).

Las mitocondrias prácticamente todas presentan forma redondeada y con el mismo grado de desarrollo que en estadios precedentes (fig. 55).

Las zonas aperturales están muy abultadas. En el ápice del poro desaparece cualquier componente de la exina que queda relegada a ambos lados del mismo. En un corte central el poro aparece coronado por la masa fibrilar muy densa, a continuación le sigue la intina poral llena de túbulos ramificados, algo más engrosados que en estadios anteriores y cargados de un contenido muy denso con respecto a la matriz de la intina en la que se encuentran inmersas. Debajo de esta, la capa de intina carente de túbulos se hace mayor, presentando bandas de material más denso. Llama la atención la presencia constante de cisternas de retículo endoplasmático rugoso adosadas paralelamente al plasmalema de esta región (figs. 59, 60).

Se puede decir que en este momento el grano de polen está listo para germinar si encuentra el sustrato adecuado (fig. 58).

4.3.3. Célula generativa

La célula generativa adquiere una forma muy alargada (fig. 54).

4.3.3.1 Núcleo

Al igual que ocurrió anteriormente al adaptarse este núcleo a la forma de la célula aparece alargado. Sólo en cortes transversales de esta célula parece redondeado (figs. 54, 57).

El grado de condensación de la cromatina es muy elevado lo que le confiere un alto contraste a esta célula (ya que el núcleo la ocupa prácticamente) dentro del grano de polen (fig. 54).

El nucléolo de pequeño tamaño es difícilmente observable.

4.3.2.2. Citoplasma

El citoplasma de esta célula no presenta cambios con respecto a los primeros estadios de su formación. Merece destacar la presencia de microtúbulos que en cortes longitudinales aparecen a ambos lados del núcleo formando bandas en dirección del eje longitudinal de la célula frecuentemente en contacto con la pared (fig. 56), y en cortes transversales los microtúbulos forman paquetes distribuidos por el citoplasma y cerca de la pared celular preferencialmente (fig. 57).

4.3.2.3. Pared

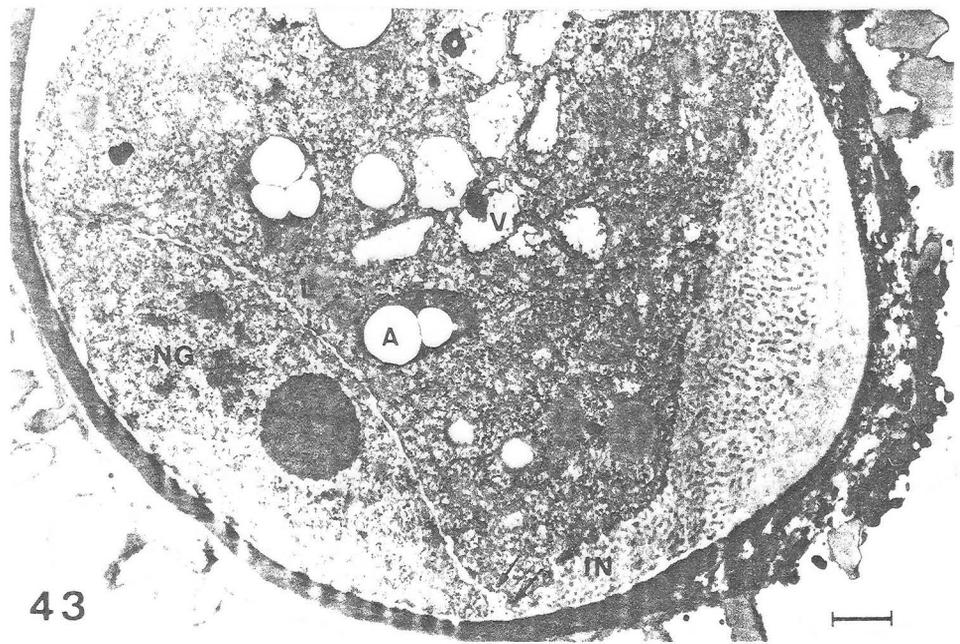
Presenta las características anteriormente descritas. En cortes transversales se aprecian filamentos que atraviesan esta pared (fig. 57).

LAMINA XV

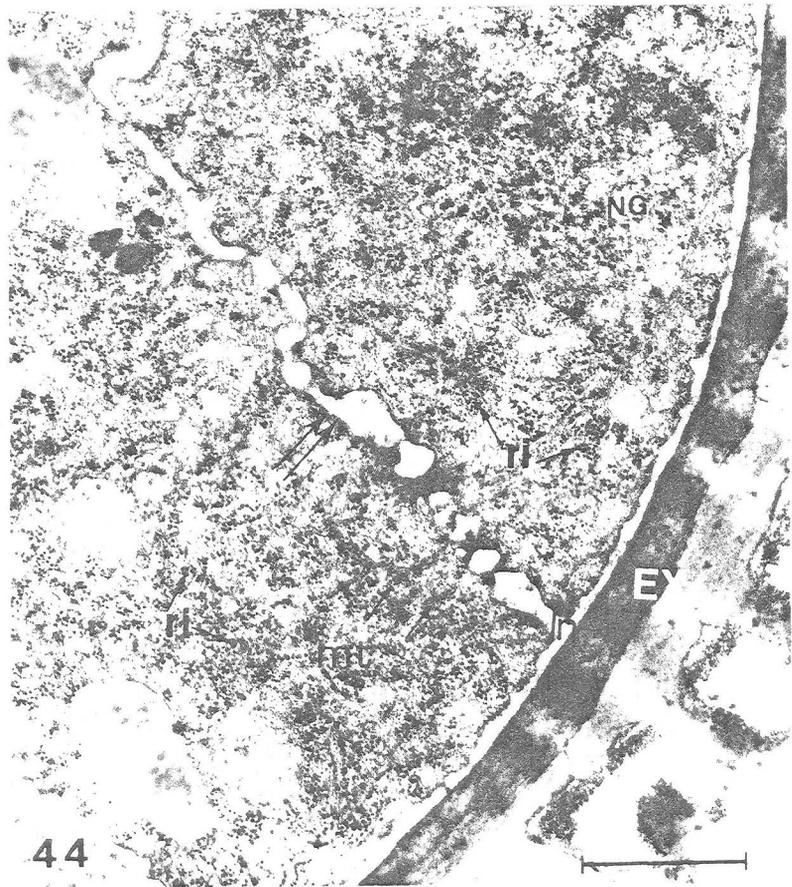
Grano de polen recién formado

Fig. 43. Grano de polen recién formado con la célula generativa por tanto adosada a la pared del grano. El núcleo de la célula generativa presenta cromatina parcialmente condensada. El citoplasma de la célula vegetativa es rico en ribosomas, cuerpos lipídicos, plastidios con almidón y restos de la gran vacuola. La intina poral presenta gran cantidad de túbulos y se continúa con la pared de la célula generativa (flechas). El ápice del poro está coronado por un material fibrilar denso (★) (x7.600).

Fig. 44. Detalle de la formación de la pared celular que separa a las dos nuevas células. El tabique se forma por fusión de vesículas (doble flecha) y se finaliza por los extremos. Hay microtúbulos entre las vesículas no fusionadas aún, obsérvese la riqueza de ribosomas en el citoplasma de ambas células. El tabique que separa ambas células es continuo con la intina (x22.000).



43



44

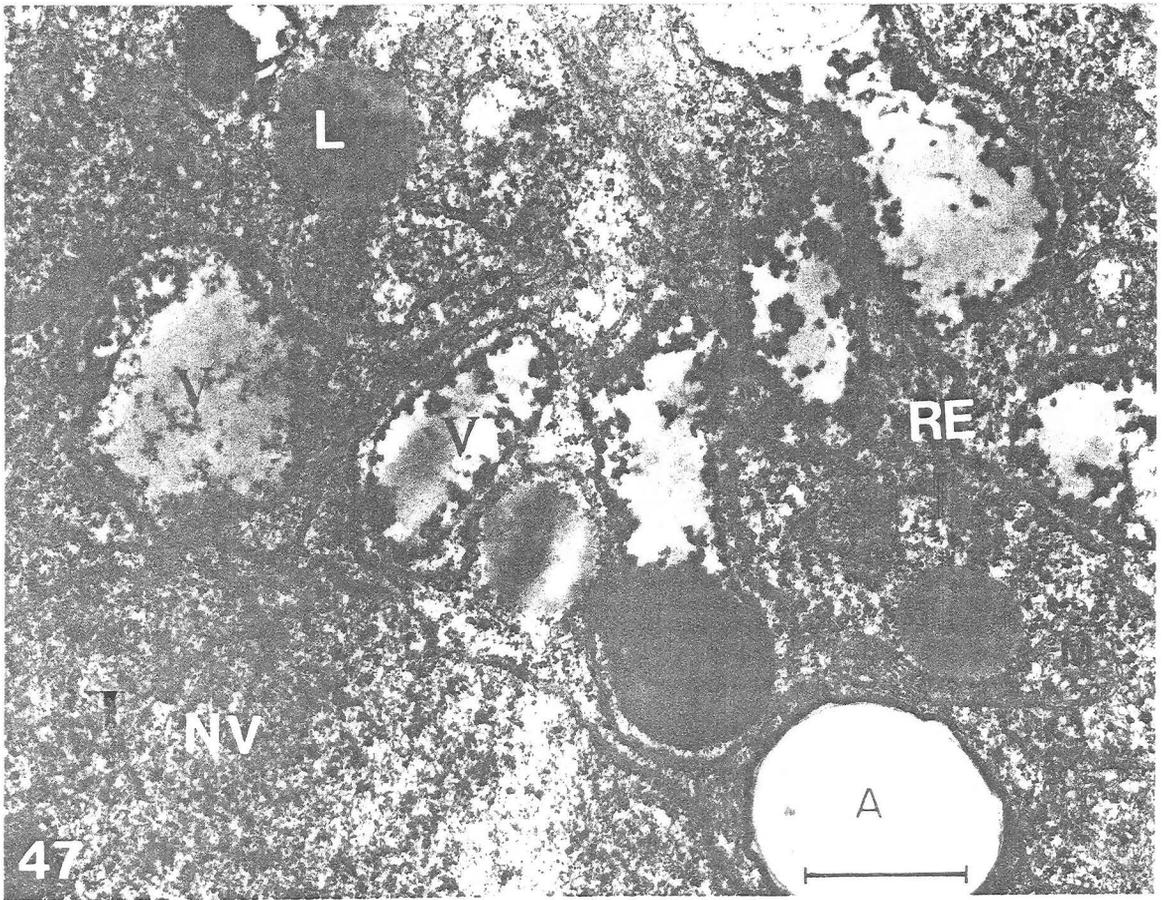
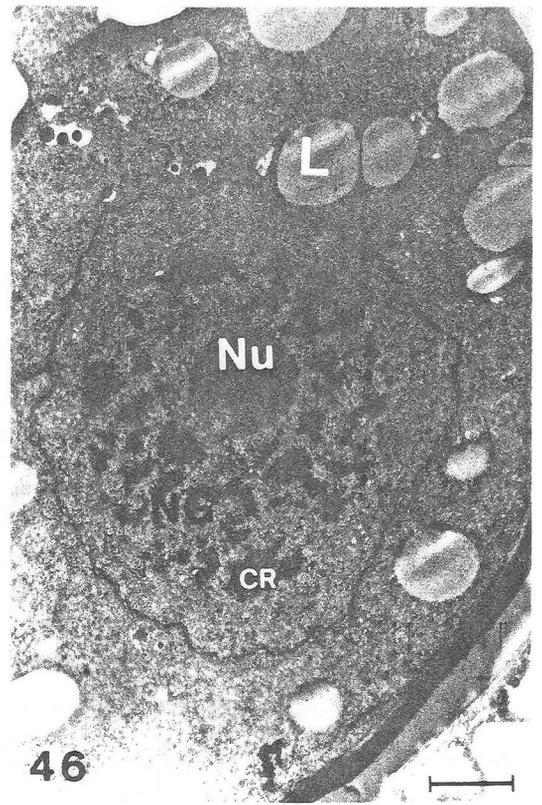
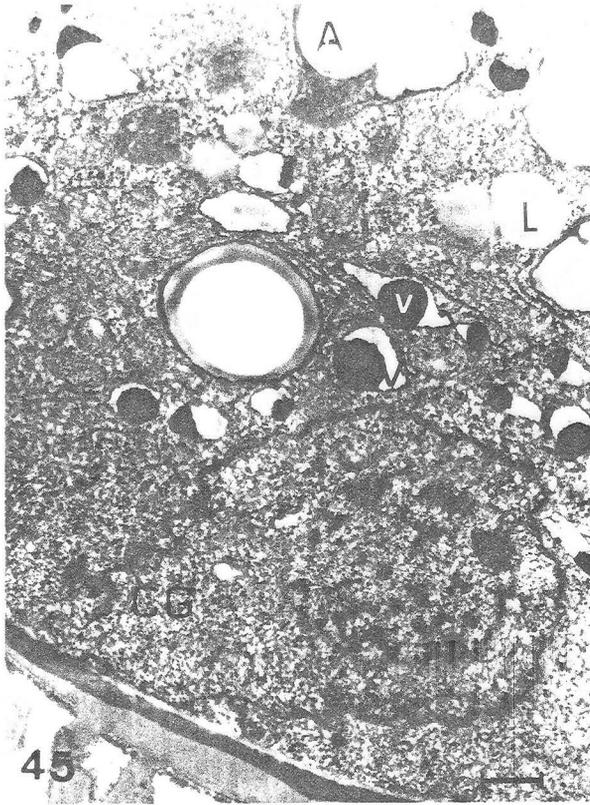
LAMINA XVI

Grano de polen joven

Fig. 45. Estrangulamiento de la célula generativa para independizarse de la pared celular del grano de polen. Las vacuolas de la célula vegetativa presentan inclusiones muy densas (x8.200).

Fig. 46. La célula generativa ya desprendida de la pared del polen, se mantiene todavía cerca de la pared. El núcleo ocupa la mayor parte de la célula y su cromatina presenta un alto grado de condensación. Obsérvese la gran cantidad de lípidos que aparecen en el citoplasma de la célula generativa en este estadio (x10.500).

Fig. 47. Detalle de citoplasma del grano joven. Almidón, lípidos y cisternas de retículo endoplasmático rugoso en las proximidades de las vacuolas. Las mitocondrias, todavía algunas son de forma alargada. Se observan vacuolas con inclusiones densas y un precipitado de análoga densidad en la periferia (x21.500).



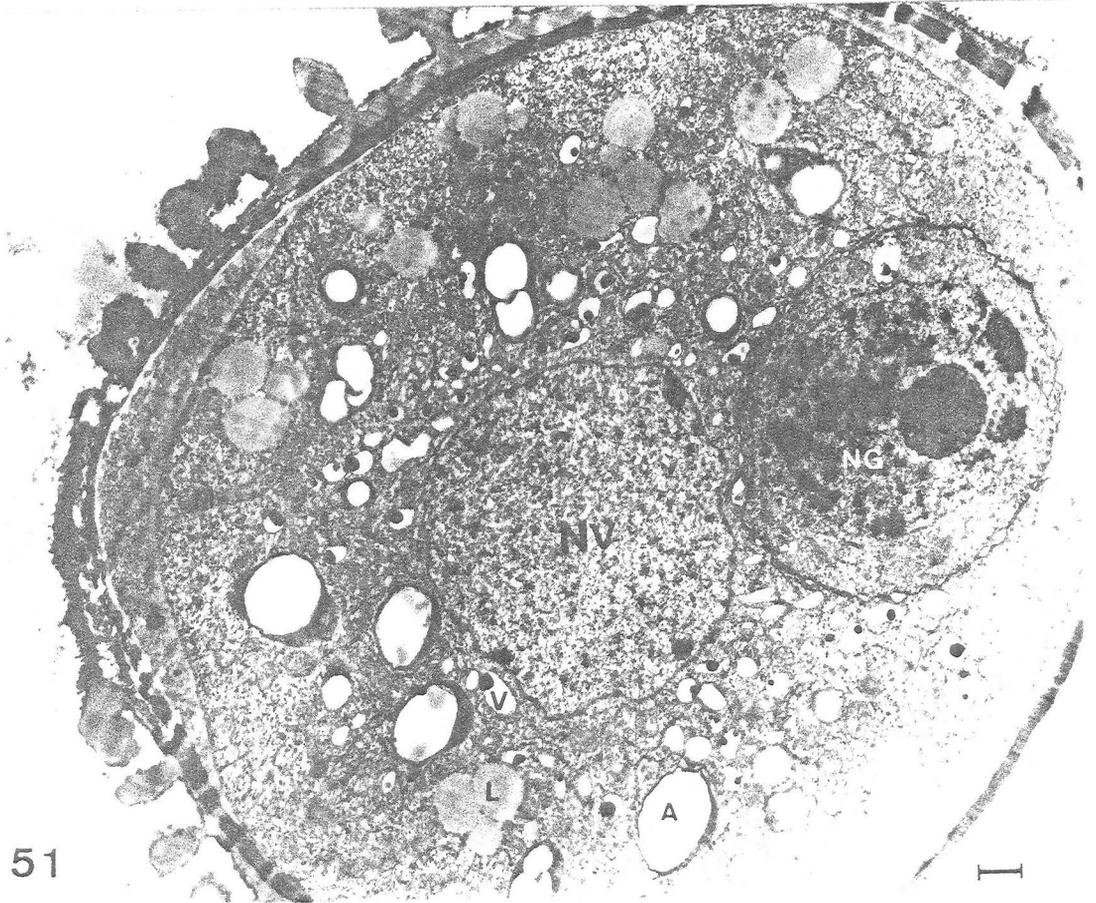
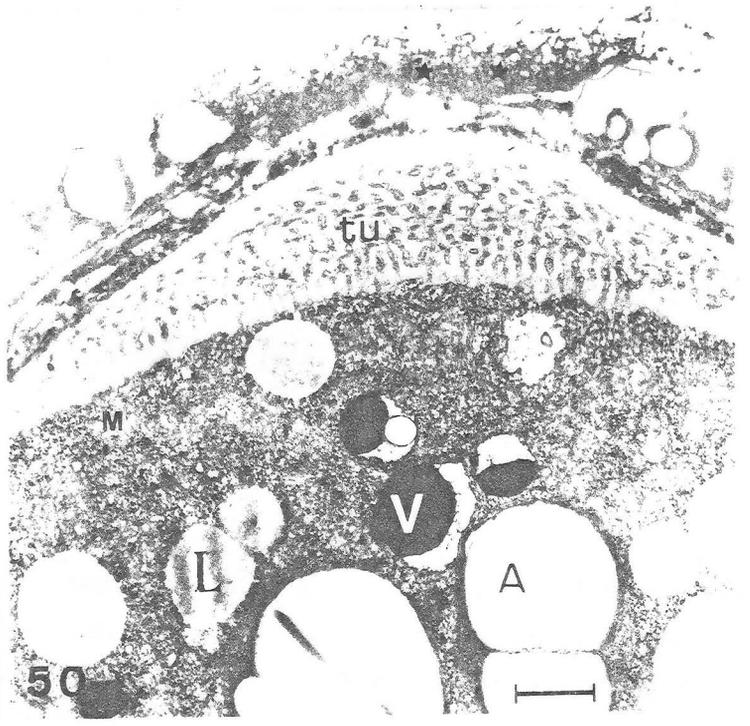
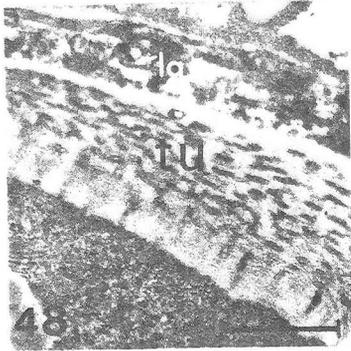
LAMINA XVII

Grano de polen médio

Figs. 48. 49. Detalle de la intina poral y las tubulaciones que presentan en su interior. En la figura 49 se puede observar como el plasmalema aún emite tubulaciones y éstas son de contenido claro. La figura 48 presenta un poro más avanzado donde las tubulaciones de la intina se alejan del plasmalema formándose un estrato de intina sin ellas, a la vez que estas comienzan a aparecer con un contenido más denso (x16.000) (x20.000).

Fig. 50. Corte central de una región apertural. La intina poral llena de tubulaciones que se van alejando del plasmalema para acercarse al ápice del poro. Encima de la intina carente de exina se puede observar un material fibrilar denso (★), y a ambos lados del mismo se encuentra la exina estructurada (báculas) (x11.500).

Fig. 51. Se puede observar junto a la célula generativa el núcleo vegetativo ocupando una posición central en el grano de polen. El núcleo vegetativo con la mayoría de la cromatina descondensada mostrando sólo algunas masas muy densas, mientras que el núcleo generativo todavía redondeado, presenta la cromatina muy descondensada. Obsérvese la riqueza de citoplasma de la célula vegetativa en estructuras citoplasmáticas: almidón, lípidos, pequeñas vacuolas y R.E. (x6.300).

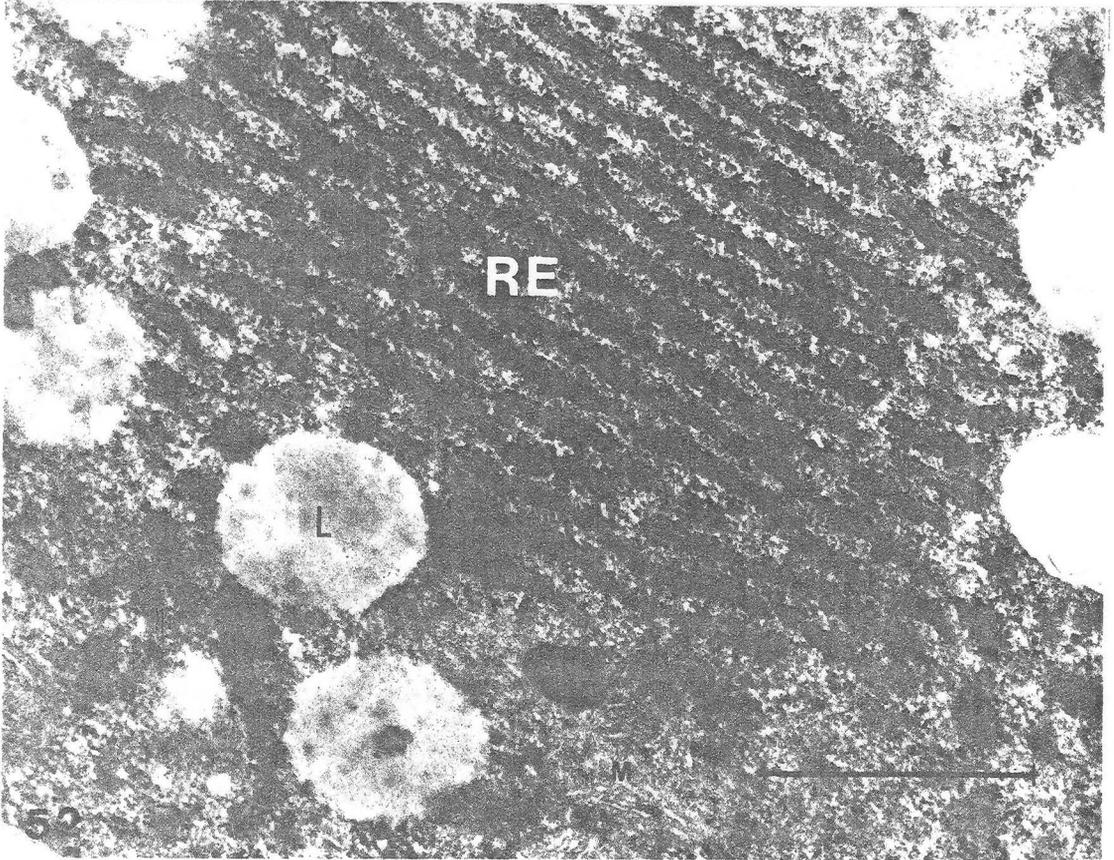


LAMINA XVIII

Grano de polen medio

Fig. 52. Detalle del citoplasma del grano de polen medio con gran cantidad de cisternas de R.E. rugoso todavía alargadas y paralelas. Estas cisternas están dilatadas y contienen material denso en su interior (x36.000).

Fig. 53. Detalle de la pared del grano de polen medio constituido por exina e intina. En la exina se distingue una parte más densa o endexina y la parte externa más clara o ectexina con su capa basal y las columnas que se engruesan en sus ápices pudiendo llegar a fundir entre sí. La capa del material fibrilar condensado en la base de las arcadas de la exina se extiende hacia las columnas (flechas), formando una cubierta de la ectexina, salvo en la superficie externa de la misma. La intina es una delgada pared con respecto a la exina. (x56.000).

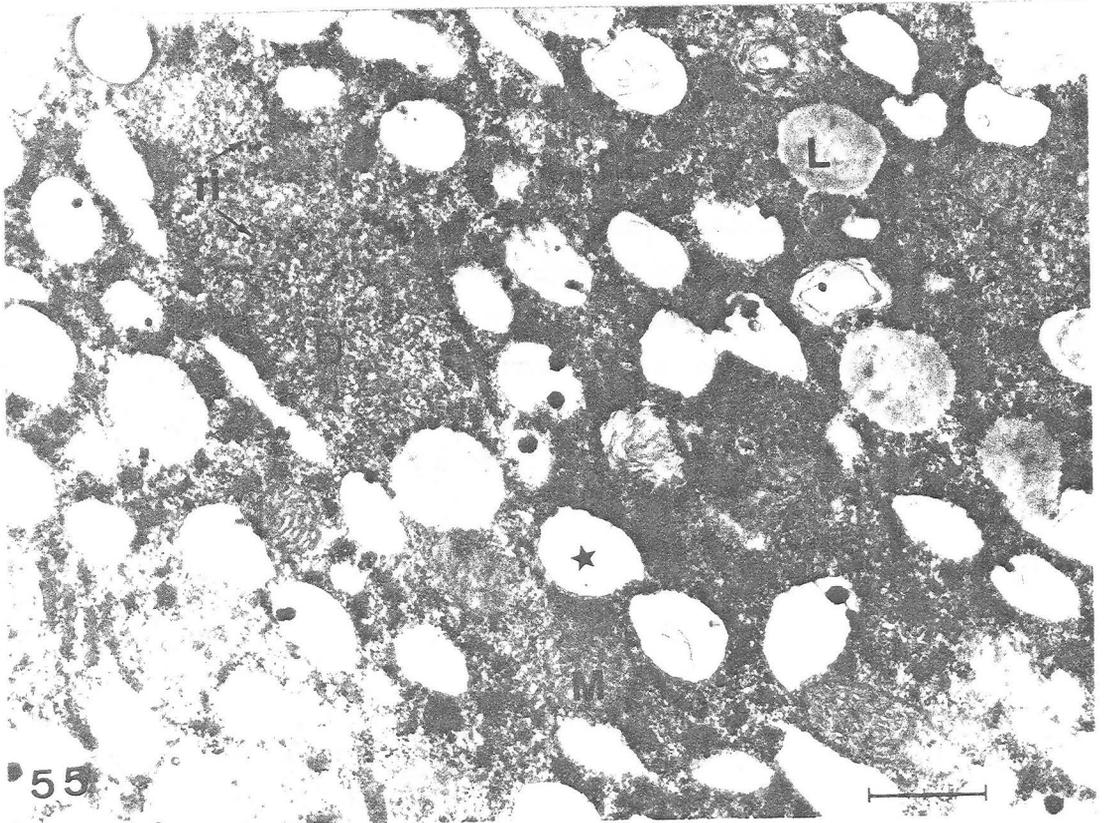
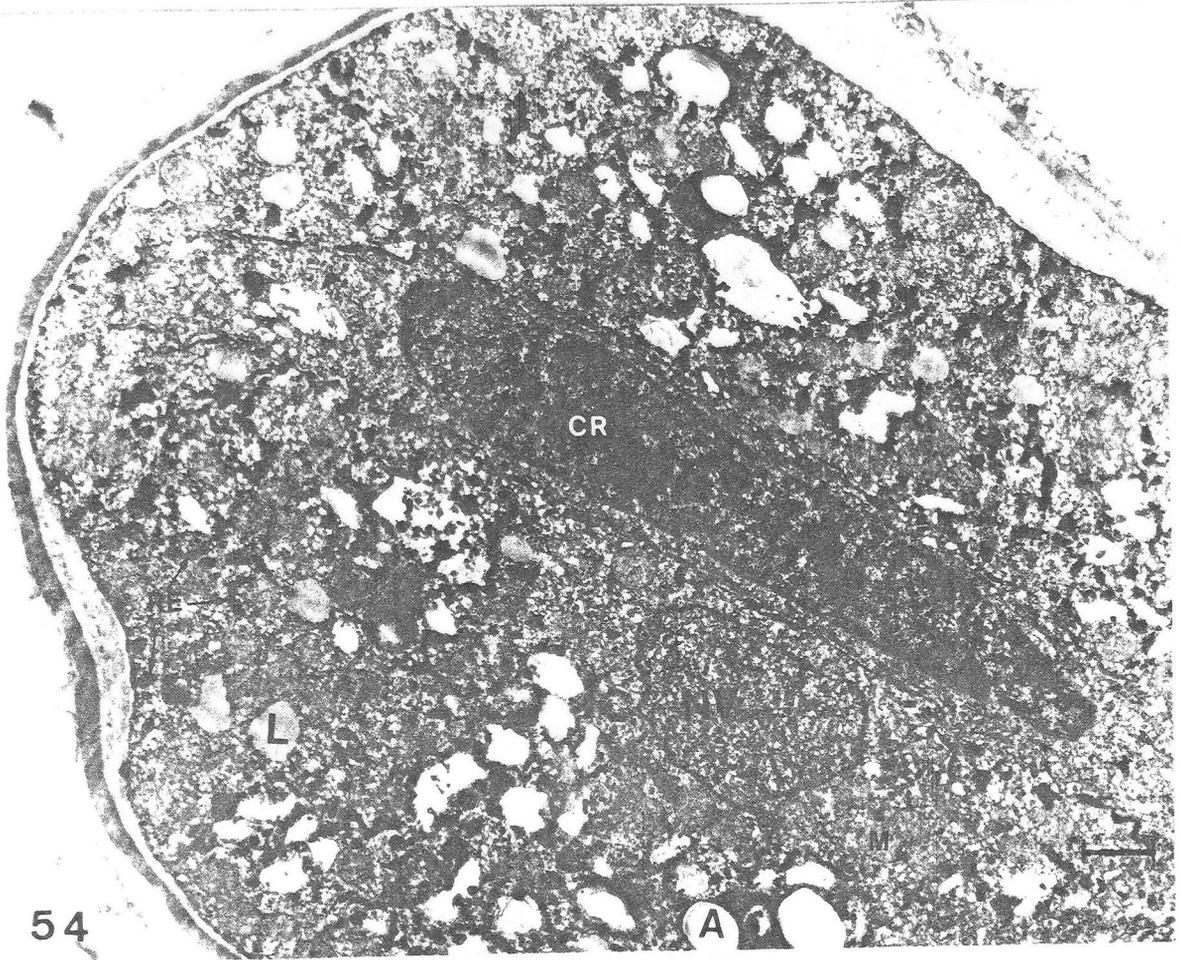


LAMINA XIX

Grano de polen maduro

Fig. 54. Vista general del grano de polen maduro. El núcleo vegetativo ocupa una posición central en el grano, su cromatina se mantiene semidescondensada. Junto a él, está la célula generativa muy alargada cuyo núcleo ocupa prácticamente toda la célula, con la cromatina muy condensada. (x9.500).

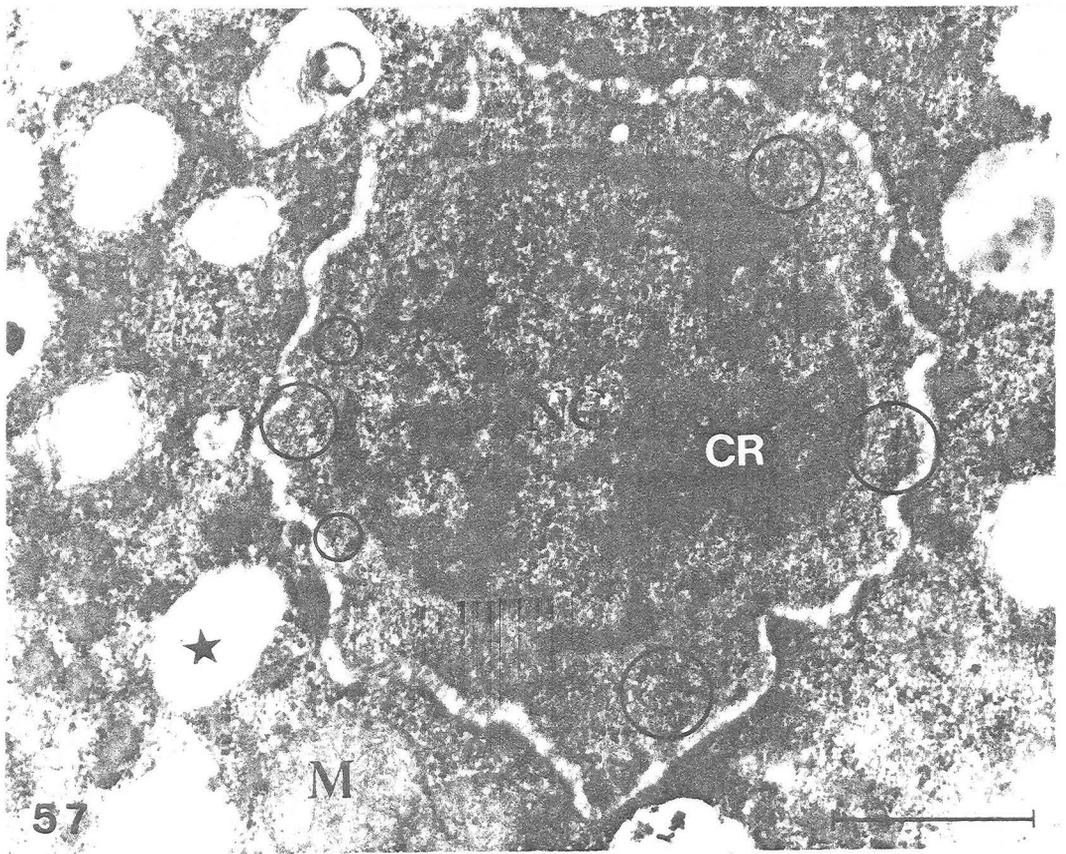
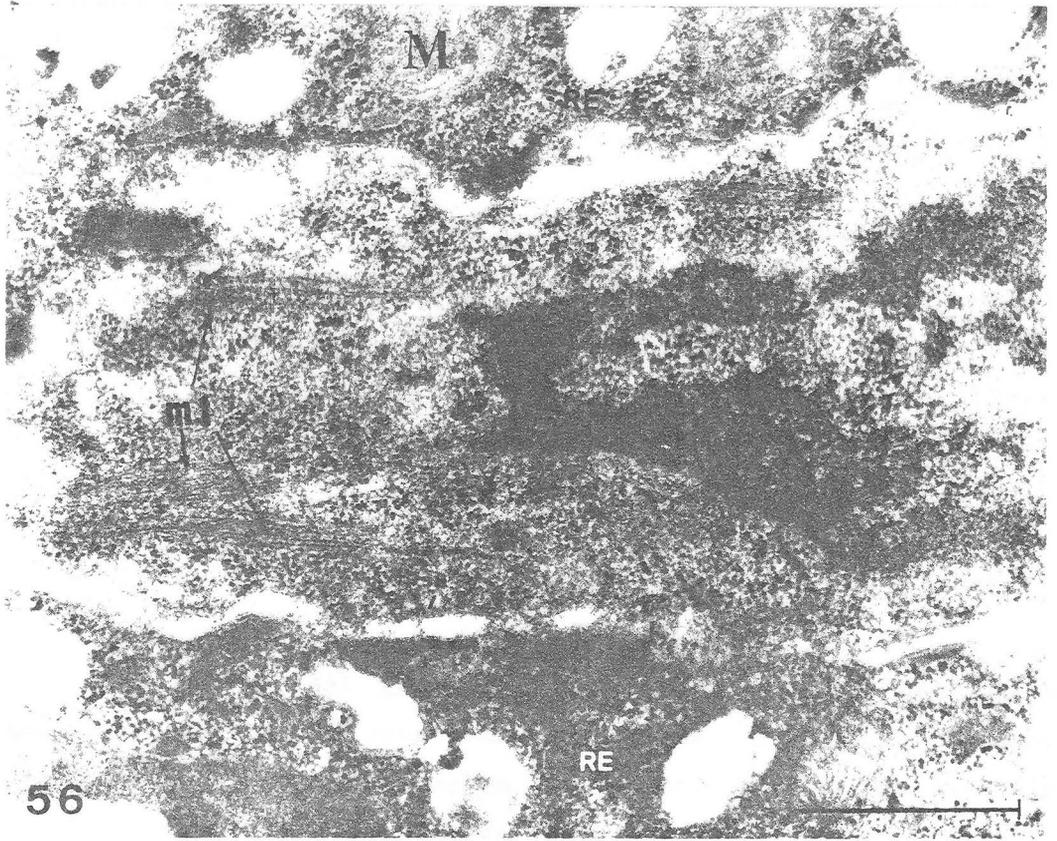
Fig. 55. Detalle del citoplasma de la célula vegetativa del grano de polen maduro. El retículo endoplasmático rugoso se ha fragmentado en cortas vesículas dilatadas y de contenido denso en estrecha relación con cuerpos lipídicos, que en este estadio se encuentran en gran número. El citoplasma fundamental es rico en ribosomas. Las mitocondrias presentan forma redondeada. No se observa almidón ni plastidios, que en este estadio disminuye notablemente y en cambio aparecen unas vacuolas de contenido muy claro, homogéneas en cuanto a su forma y de tamaño análogo al de los cuerpos lipídicos (★) (x16.000).



LAMINA XX

Grano de polen maduro

Figs. 56. 57. Detalle de la célula vegetativa. En el escaso citoplasma que posee esta célula se pueden observar paquetes de microtúbulos (círculos). El núcleo generativo presenta gran cantidad de cromatina condensada y las zonas intercromatínicas con algunos gránulos pericromatínicos. La pared externa de la célula generativa está rodeada de vesículas de R.E. rugoso adosadas a la pared. Fig 56 corte longitudinal y fig. 57 corte transversal. (x31.000) (x27.000).

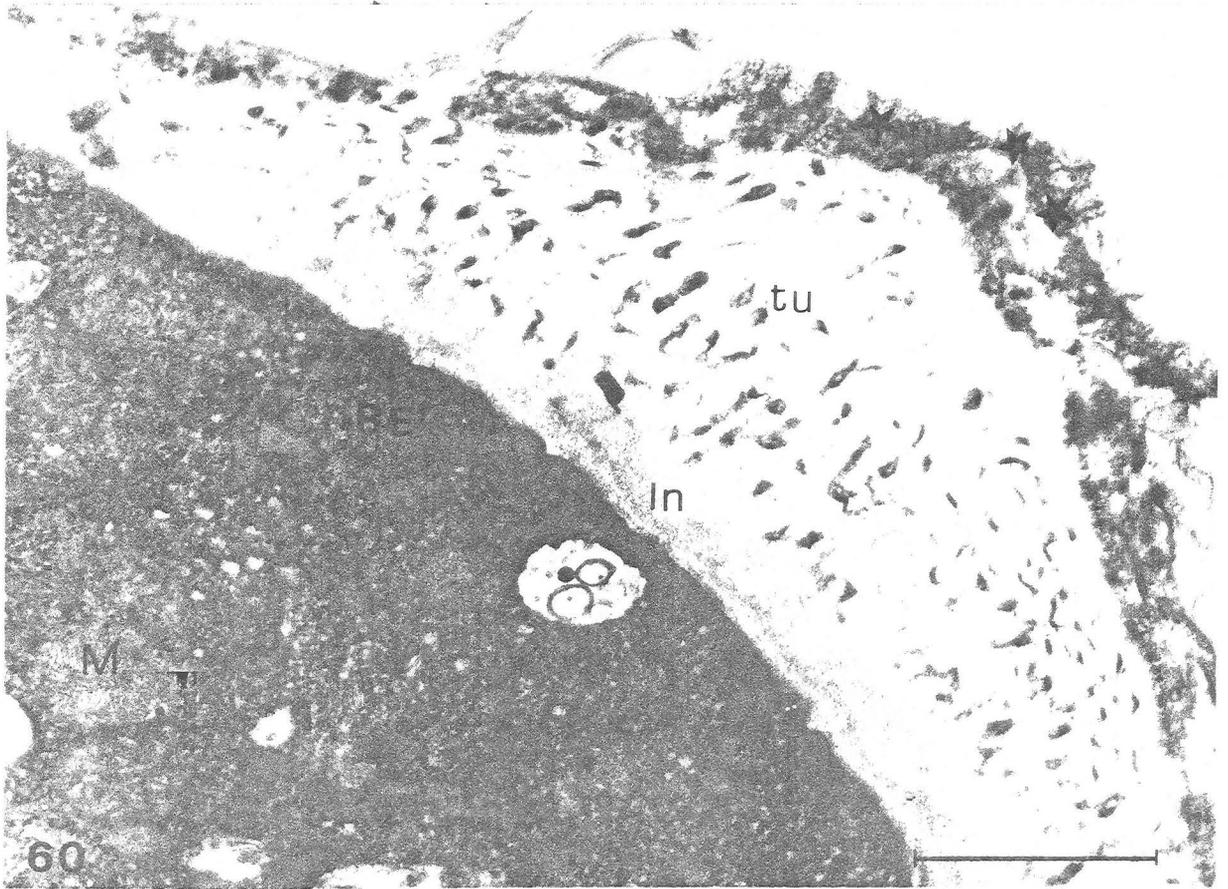
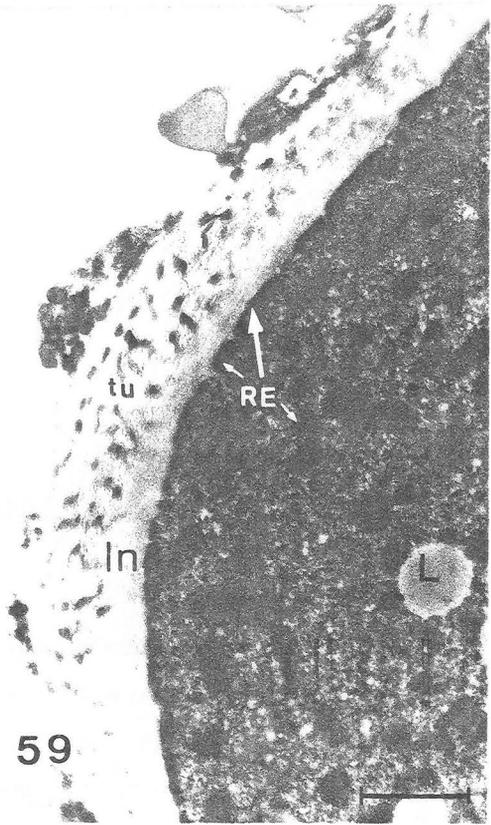


LAMINA XXI

Grano de polen maduro

Fig. 58. Detalle del grano de polen maduro con la apertura muy abultada. La intina apertural está llena de túbulos engrosados de contenido muy denso salvo un estrato próximo al plasmalema que carece de ellos. No hay ninguna capa externa que proteja la intina poral. Se puede observar la célula generativa junto al núcleo vegetativo lobulado en las cercanías de la apertura (x12.300).

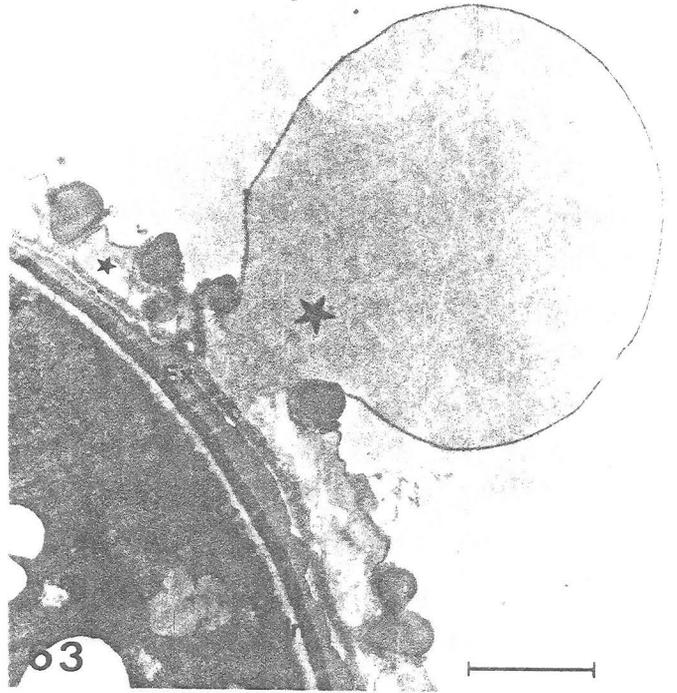
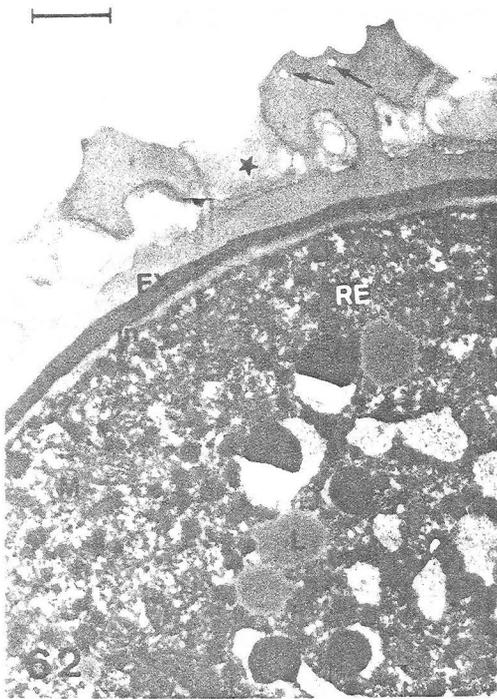
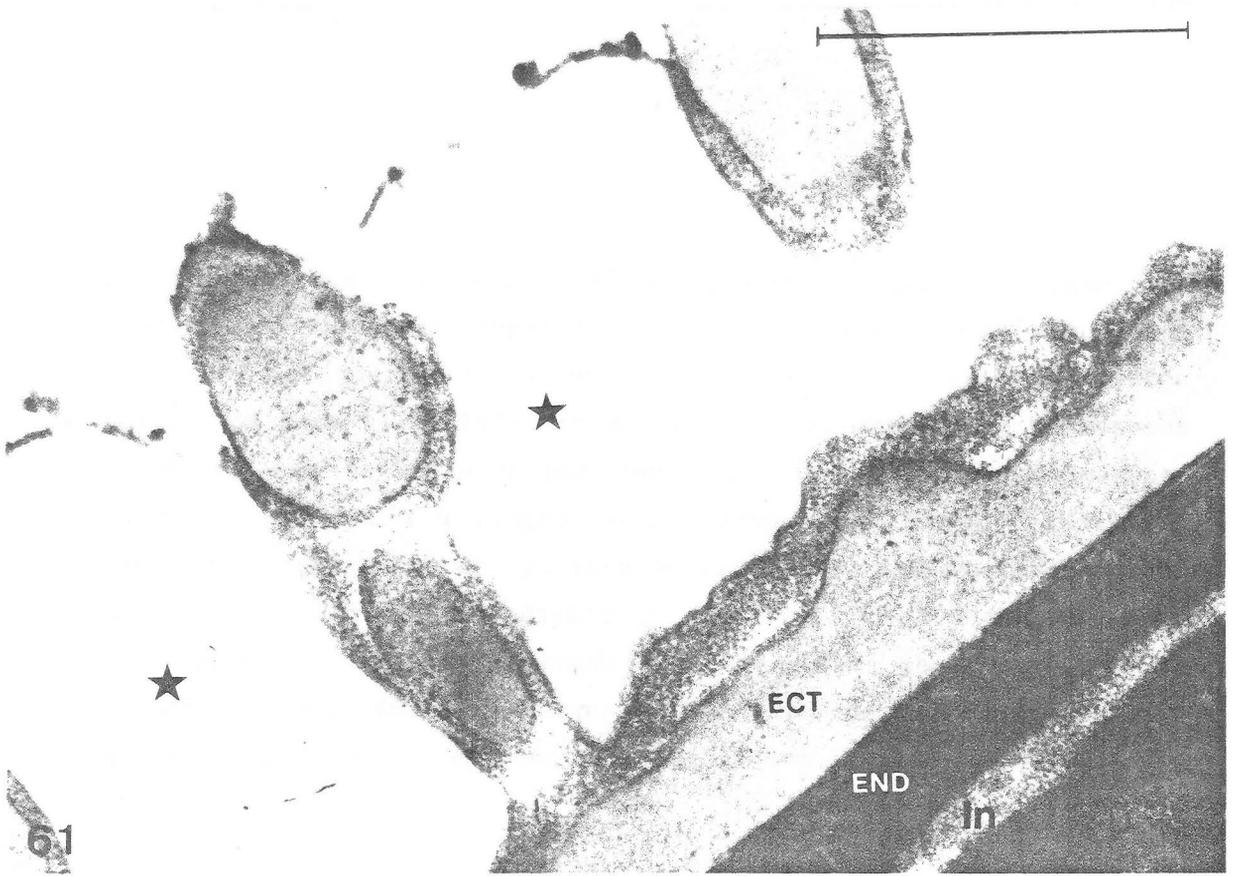
Fig. 59. 60. Detalles de distintas aperturas del grano de polen maduro con las tubulaciones de la intina poral engrosadas, cargadas de material denso y desplazadas hacia el ápice del poro. Inmediatamente debajo hay un estrato de intina carente de túbulos. Adosadas al plasmalema se encuentran cisternas de R.E. denso paralelas a él. En la fig. 60 se puede observar como la superficie externa de la apertura está coronada por material fibrilar denso (★) (x14.500) (x33.000).



LAMINA XXII

Grano de polen maduro

Figs. 61. 62. 63. Detalle de la pared del grano de polen maduro. La pared celular ya está terminada. La intina ha engrosado con respecto a estadios anteriores aunque sigue siendo el estrato más delgado de la pared. Las arcadas de la exina se encuentran rellenas con un material gris osmiófilo (★). En la figura 63 se puede observar la procedencia externa al grano de este material, por deposición en la superficie del polen de gotas de aspecto lipíco procedentes del lóculo de la antera. En la figura 62 se pueden observar en las báculas orificios blancos o microcanales ya observados en otras fases (flechas) (x50.000) (x10.000) (x17.000).



5. CITOQUIMICA

Se fijaron muestras sólo con glutaraldehído para realizar las posteriores tinciones específicas, obteniéndose buenos resultados excepto en la microspora joven a pesar de los múltiples intentos realizados para ello. Esto nos sugiere que el estadio de microspora joven es más sensible y por tanto difícil de fijar optimamente cuando no se utiliza ningún post-fijador, también se modificaron las concentraciones de glutaraldehído y formaldehído así como el tampón utilizado (cacodilato y fosfato). Sin embargo en todos los casos la fijación obtenida fué deficiente por lo que en el estadio de microspora joven no se han obtenido resultados optimos en las tinciones preferenciales realizadas, que se detallan a continuación.

5.1. RIBONUCLEOPROTEINAS: EDTA

Para identificar la naturaleza química de los cuerpos semejantes a nucleolos y masas fibrilares de posible procedencia nuclear encontrados en el citoplasma de tetraday joven microspora, se realizó la tinción preferencial de EDTA para ribonucleoproteinas según Bernhard (1.969).

Con esta tinción el núcleo presenta en todos los estadios un aspecto característico con el nucleolo fuertemente teñido que contrasta con la cromatina condensada que aparece como masas irregulares decoloradas. Estas masas de cromatina están rodeadas por un material fibrilar que también se tiñe y corresponde a las fibrillas pericromatínicas (figs. 64, 66). En un estadio

posterior estas fibrillas pasan a observarse en las regiones intercro-
matínicas (fig. 67). Con esta técnica se aprecian mejor que con
tinciones normales los gránulos pericromatínicos (50 - 80 nm).

En el citoplasma, nucleoloides y masas fibrilares también se
tiñen, aunque los nucleoloides debido a tener una estructura
más compacta presentan aparentemente un mayor grado de tinción
(figs. 65, 67). Esporadicamente se ha encontrado en el interior
de las masas fibrilares, algunas zonas muy pequeñas de material
decolorado o blanquecino de características semejantes a las
que presenta la cromatina condensada con la tinción del EDTA
(fig. 66).

5.2. POLISACARIDOS: ACIDO PERIODICO - TIOSEMICARBAZIDA - PROTEINATO DE PLATA

Para identificar los polisacaridos de la pared del polen se utilizó
la técnica utilizada por Thiery (1.967), que pone en evidencia
los grupos aldehidos después de su oxidación con el ácido periodico.

En el periodo de tetradas donde los plastidios son pequeños y
con poco contenido en almidón se puede observar en el estroma
un fino retículo punteado que desaparece al ir llenándose estos
cada vez más de almidón (fig. 68) el cual aparece teñido de un
negro intenso (fig. 72). En los dictiosomas del aparato de Golgi
aparece un fino precipitado (fig. 68). Igualmente la reacción
es positiva en el plasmalema pero no de una forma contínua (fig.
69). La pared especial de calosa de la tetradada también aparece
con un precipitado muy fino esparcido muy homogéneamente y localizado
solo en una de sus capas. Bordeando a la calosa se encuentra
la primitiva pared celular de la célula madre del polen que también

es altamente positiva a esta reacción dando la imagen de una línea muy densa con precipitado (fig. 68).

En microsporas y grano de polen donde los granos de almidón son de mayor tamaño que en tetradas, se pueden observar frecuentemente rodeados por un halo radial menos denso, en el que se aprecia un fino precipitado, prolongándose a veces la tinción de los granos hacia el citoplasma como si se produjera una difusión de hidratos de carbono (fig. 72). En la exina se observa un fino precipitado que destaca en el borde externo de la misma, en donde la elevada concentración de precipitado le confiere una mayor densidad electrónica formando una línea entre la capa basal y el material fibrilar de las arcadas (figs. 71, 72). Desde el inicio en la formación de la intina se observa un fino precipitado en ella, que se va haciendo progresivamente más concentrado al ir progresando el desarrollo de la intina (figs. 71, 72). En la intina apertural aparece una imagen reticulada teñida en una matriz carente de tinción. Por encima de la intina se aprecian las estructuras lamelares de la endexina sin contrastar, desapareciendo por tanto su típica estructura de membrana (fig. 70). La pared celular de la célula generativa presenta un aspecto semejante a la intina en la presencia de precipitados (fig. 71).

5.3. CATIONES: PIROANTIMONIATO

La presencia de cationes en el grano de polen se ha detectado mediante la localización del producto de la reacción piroantimoniato - osmio (Hardin y Spicer, 1.970).

En el grano de polen, es evidente la presencia de cationes ya que aparece frecuentemente precipitado localizado en determinadas regiones celulares. Este precipitado es de dos tipos: uno en forma de anillo o pequeños círculos y el otro en forma de punteado más fino.

El precipitado fino se localiza en vacuolas (fig. 76) mientras que el precipitado circular se encuentra esparcido por el citoplasma fundamental (fig. 73). Los lípidos presentan un aspecto característico con forma irregular "ameboidea" perdiendo su habitual forma esférica (figs. 73, 75).

En la pared del grano la reacción dá siempre positiva. El precipitado observado bordea a la ectexina y puede ser también de los dos tipos antes indicados: bién precipitado fino semejante al que se encuentra en el mismo tiempo localizado en las vacuolas (fig. 76) o bién precipitado en forma de anillos, igual al que aparece en el citoplasma fundamental (fig. 73).

En el grano maduro sólo se ha detectado en la ectexina el precipitado en anillo o circular de forma que estos se hacen grandes y se abren hasta formar una línea densa discontinua en la parte externa de la ectexina (fig. 74). En este caso no se encontró ningún tipo de precipitado en el citoplasma.

5.4 SUPERFICIES CELULARES: NITRATO DE LANTANO

Esta técnica fué utilizada para estudiar la posible funcionalidad de la pared del polen como barrera a la penetración de solutos (Rowley y Flynn, 1.971).

En la microspora no se observan depósitos de lantano en el citoplasma y solo se hacen más patentes las membranas celulares que destacan por un mayor contraste, especialmente el tonoplasto. Esporádicamente se observa un grueso precipitado o grumos en la pared celular localizándose aisladamente en la intina o a través de la exina (fig. 77, 78). Sin embargo, es normal encontrarse unos depósitos densos de 0.1 μ m. de diametro localizados por la exina ocupando el lugar de los espacios lacunares transparentes a los electrones que previamente ha sido descritos en la exina (fig. 79).

En el grano bicelular joven, continúa la presencia de los depósitos densos en la exina. En el grano bicelular medio además se observan los depósitos densos de lantano tanto en la intina poral como en el citoplasma fundamental, en el interior de pequeñas vacuolas y en el núcleo de la célula generativa y vegetativa (fig. 81, 83). La pared celular de la célula generativa aparece con un fino precipitado que le confiere un mayor contraste (fig. 83). Por último en el grano maduro, cuando en la intina poral los túbulos dejan de estar en contacto con el plasmalema y estos se encuentran cargados de material denso dejan de localizarse los depósitos de lantano en la misma y disminuye considerablemente su presencia en el citoplasma (fig. 82). En cambio los depósitos densos de lantano se almacenan y van aumentando progresivamente en la intina de las zonas no apeturales y en los bordes externos de la exina (fig. 84).

LAMINA XXIII

Ribonucleoproteinas: EDTA

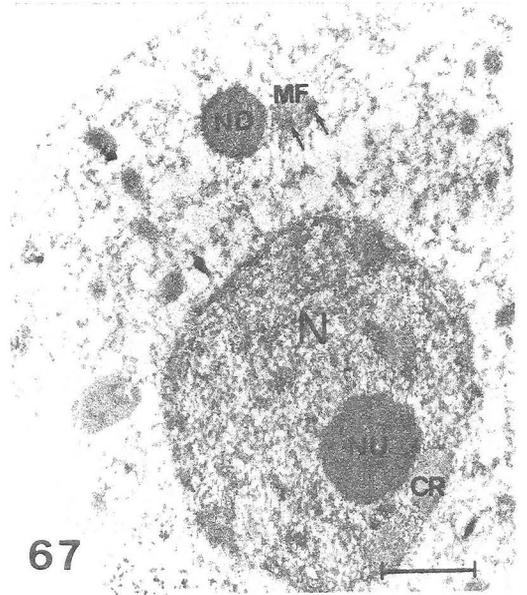
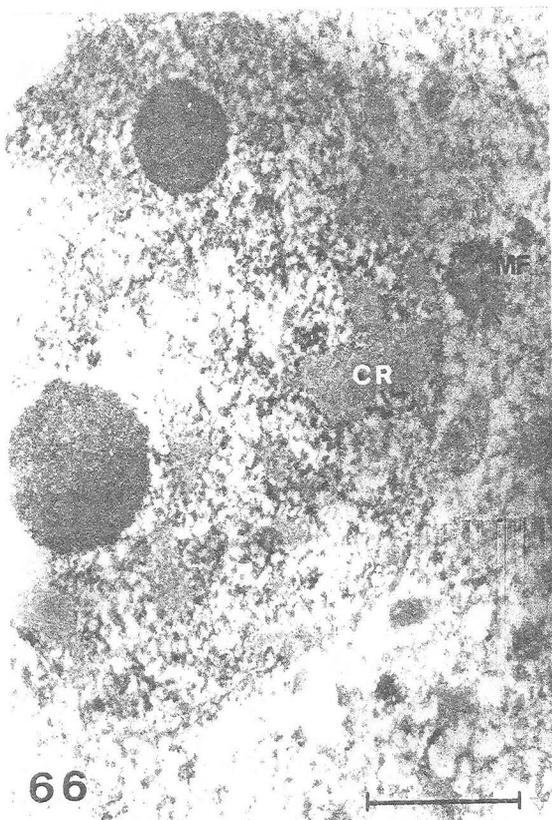
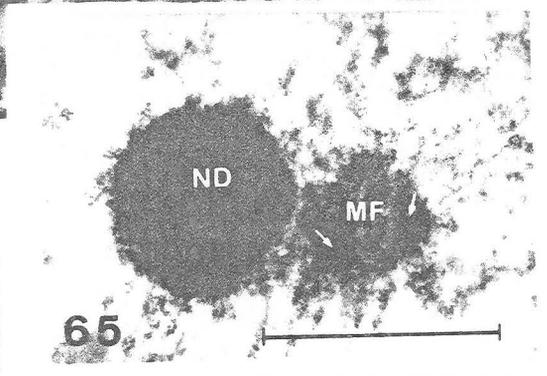
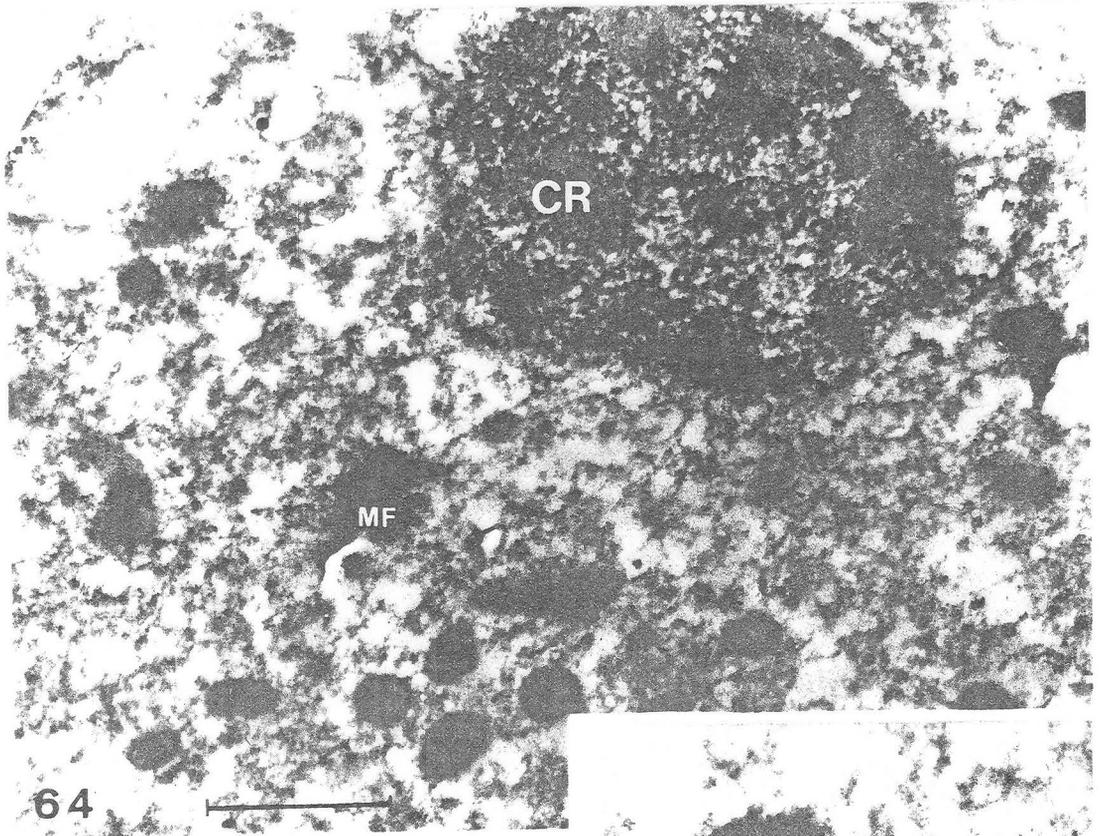
Nucleoloides y masas fibrilares

Fig. 64. Telofase-Interfase temprana. El núcleo presenta la cromatina condensada no coloreada rodeada de material fibrilar pericromatínico fuertemente teñido. La masa fibrilar citoplasmática presenta una tinción intensa (x25.000).

Fig. 65. Detalle de un nucleoloide y una masa fibrilar en el citoplasma de una microspora en tetrada, ambas positivas al EDTA. Se pone de manifiesto sus diferentes estructuras. La masa fibrilar presenta en su interior dos glóbulos más compactos análogos al nucleoloide.

Fig. 66. Aspecto que presenta el núcleo de una tetrada después de la tinción con el EDTA. Los nucleolos se tiñen intensamente. En el citoplasma una masa fibrilar en cuyo interior se puede observar una zona de menor tinción similar a la de la cromatina condensada (flechas) (x20.000).

Fig. 67. Aspecto del núcleo, masa fibrilar y nucleoloide de una microspora en fase de tetradas después de la tinción con EDTA (x12.500).



LAMINA XXIV

Polisacáridos: Thiery

Paredes celulares

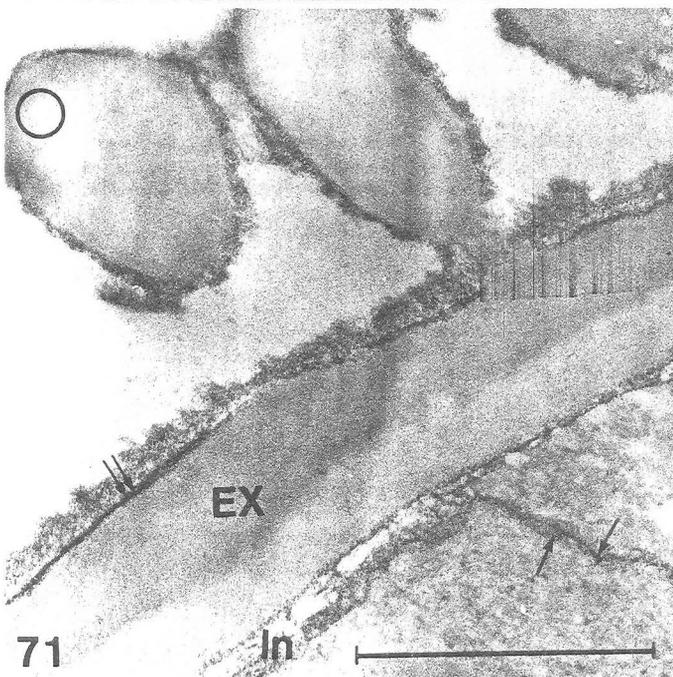
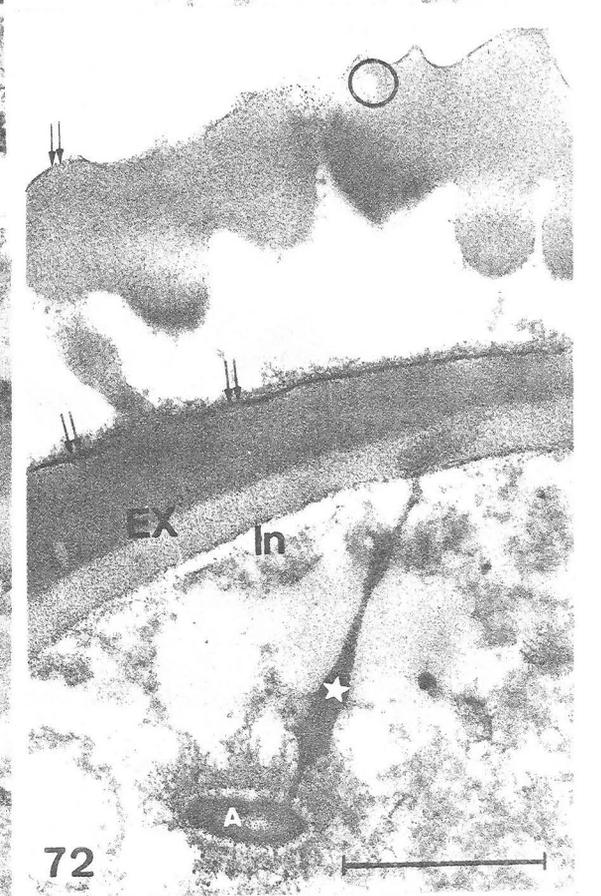
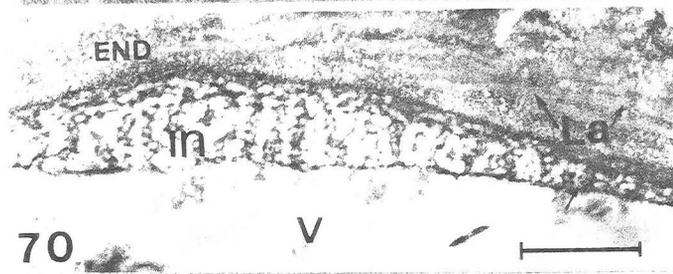
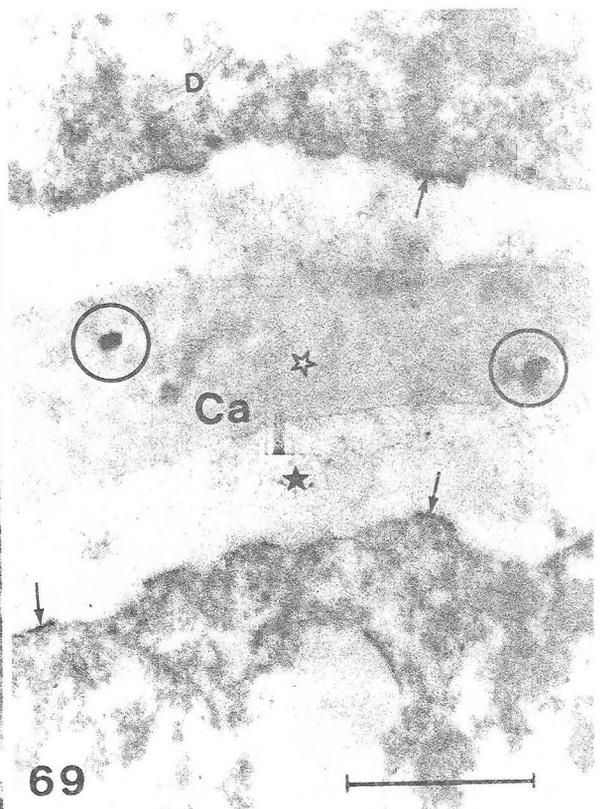
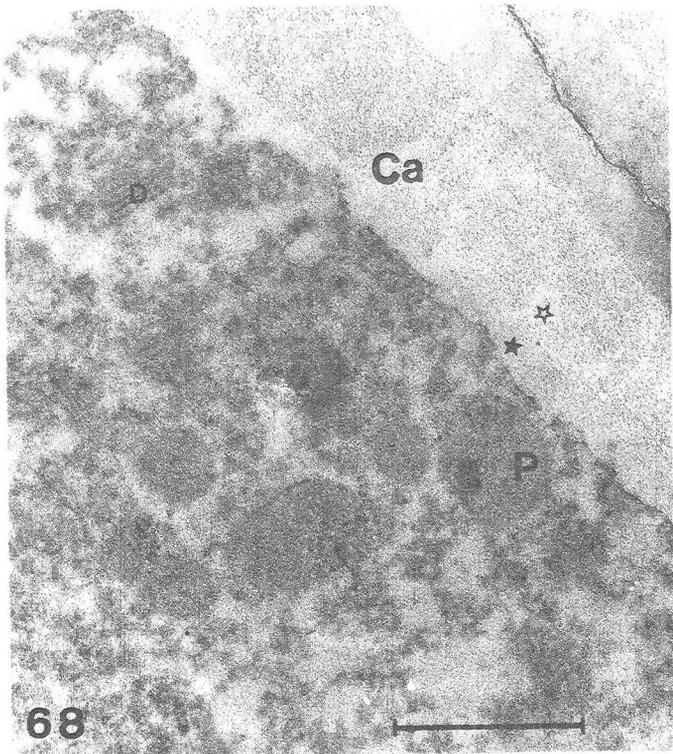
Fig. 68. Microspora de una tetrada. Aparece precipitado propio de la reacción en plastidios, dictiosomas y en el estrato externo de la pared especial de calosa (★, ☆) (x25.000).

Fig. 69. Microsporas de una tetrada. Aparece un precipitado denso en algunas zonas del plasmalema (flechas) (x25.000).

Fig. 70. Zona apertural de una microspora vacuolada. La intina apertural presenta una malla teñida positivamente con esta reacción. Obsérvense las lamelas de la endexina sin teñir (x16.000).

Fig. 71. Grano bicelular joven. La intina aparece teñida y la pared de separación de ambas células (flechas). En la exina la reacción dió positiva en la parte superficial de la capa basal, entre ella y el material fibrilar de las arcadas (doble flecha) (x40.000).

Fig. 72. Microspora vacuolada. Obsérvense el denso precipitado del almidón así como el fino punteado del halo exterior y la prolongación que sale desde éste (★). En la intina sólo se encuentra precipitado en los bordes, ya que se trata de un estadio más joven que el anterior en el desarrollo de la intina (x27.000).



LAMINA XXV

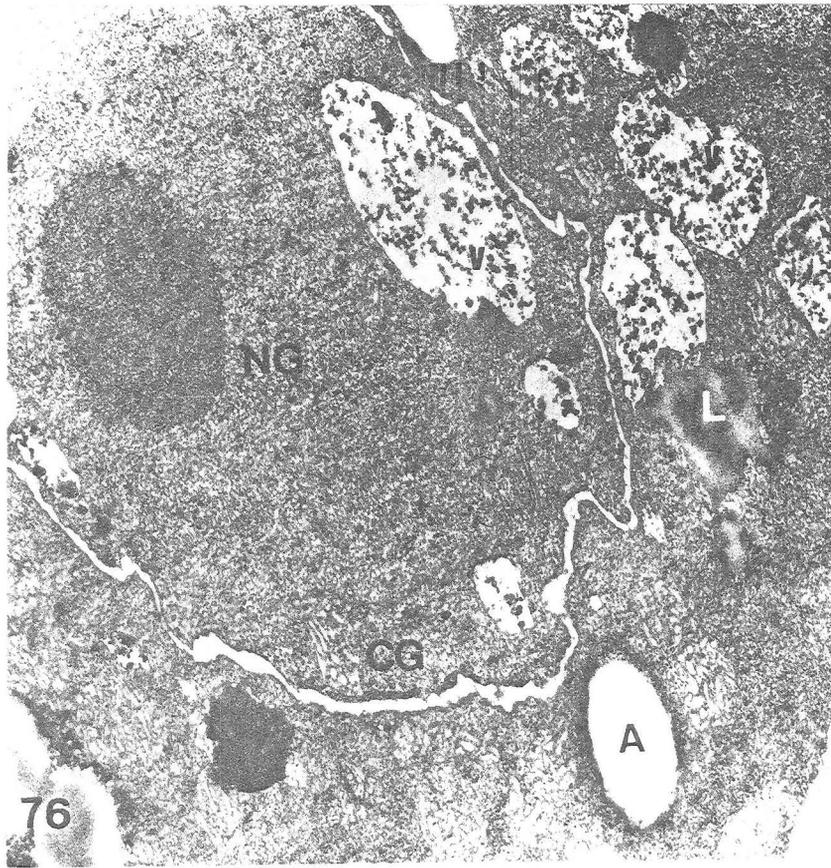
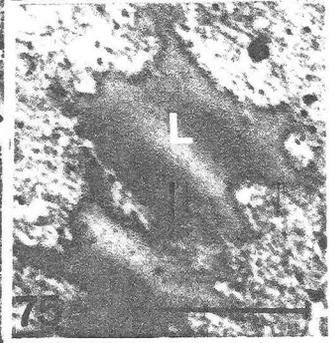
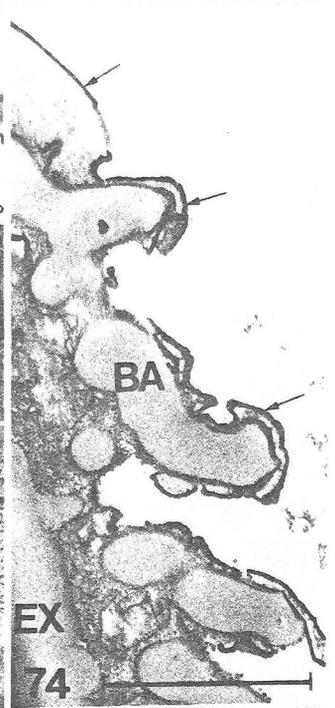
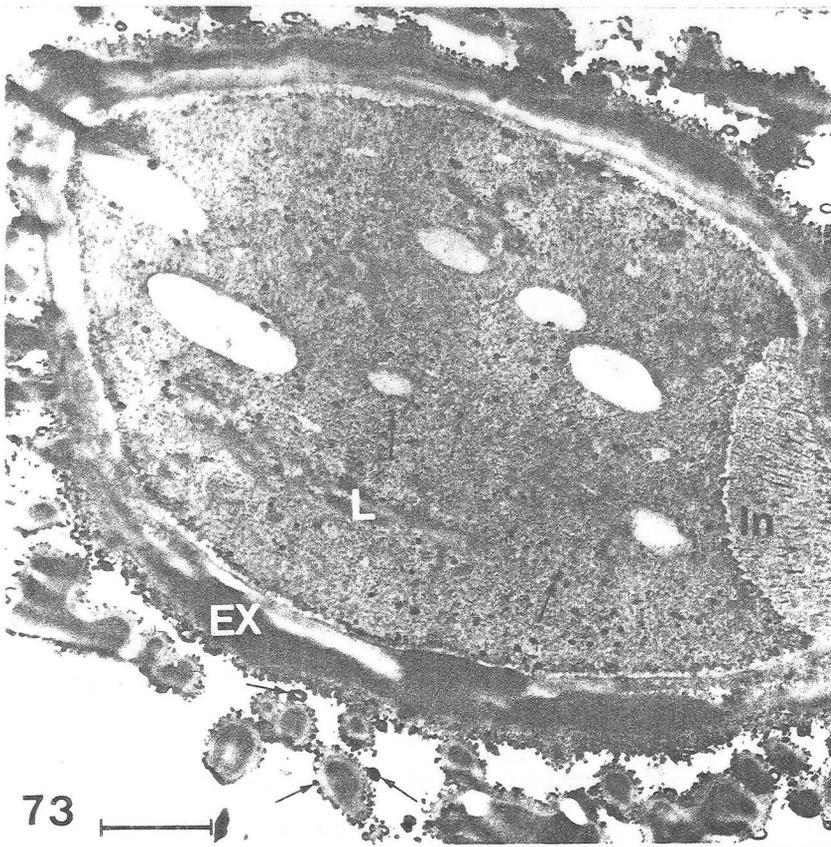
Cationes: Piroantimoniato potásico

Fig. 73. Grano bicelular joven. Todo el citoplasma así como la superficie externa de la exina presenta un precipitado grueso en forma de pequeños círculos. Obsérvese la forma "ameboidea" que presentan los lípidos (x11.500).

Fig. 74. Detalle de la exina de un grano de polen maduro. Se observan cubriendo la superficie externa de la exina unos precipitados en forma de grandes gotas comprimidas (flechas) (x28.000).

Fig. 75. Detalle de un lípido en forma "ameboidea" de un grano de polen (x25.000).

Fig. 76. Grano bicelular medio con precipitado grueso en el interior de sus vacuolas así como en la superficie externa de la exina (flechas) (x20.000).



LAMINA XXVI

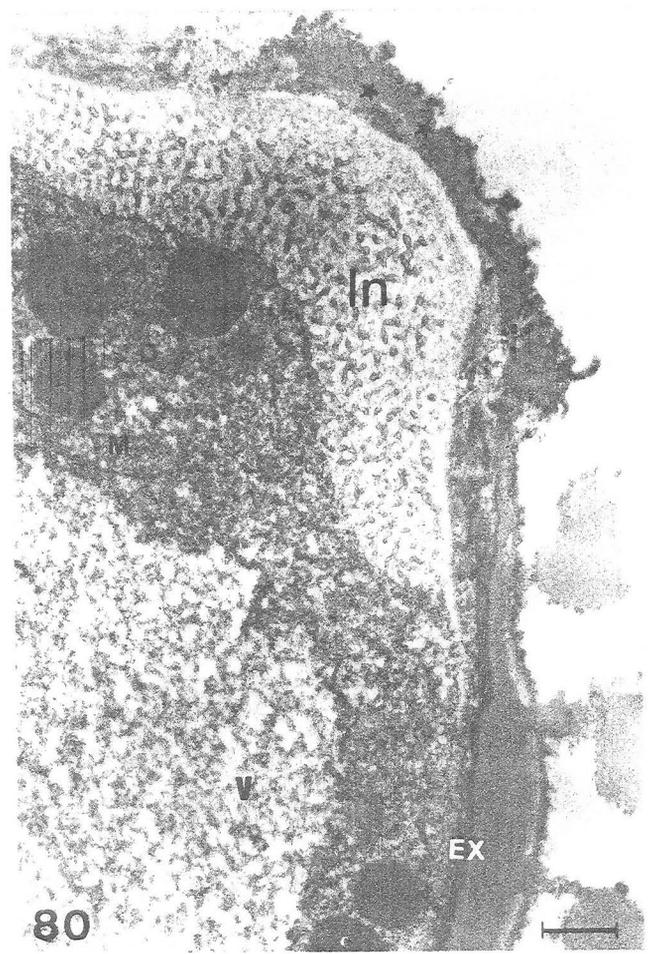
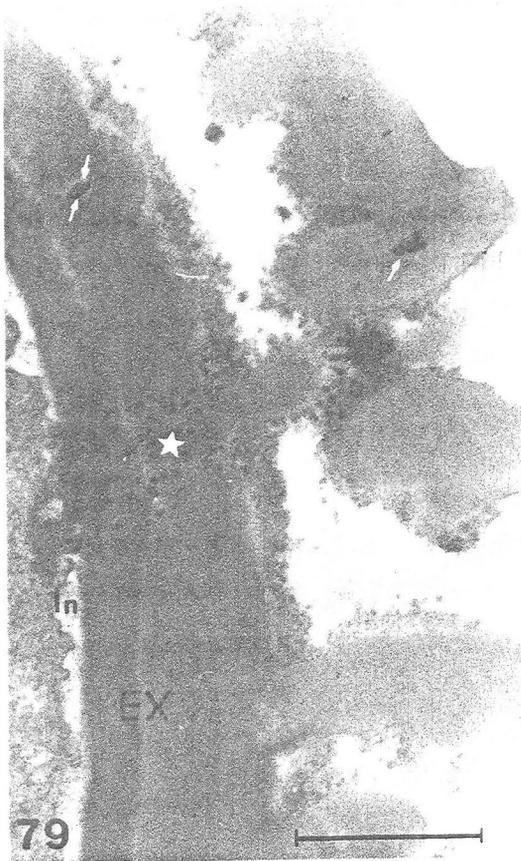
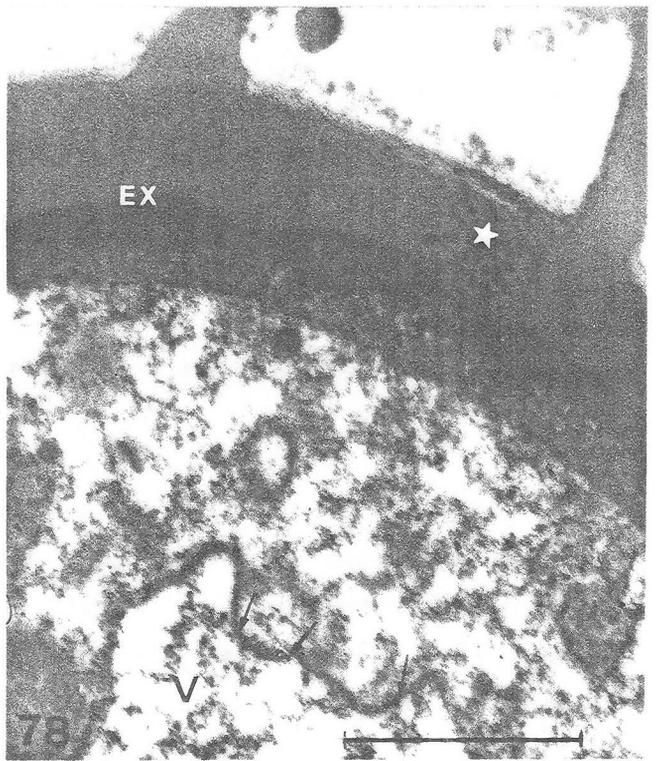
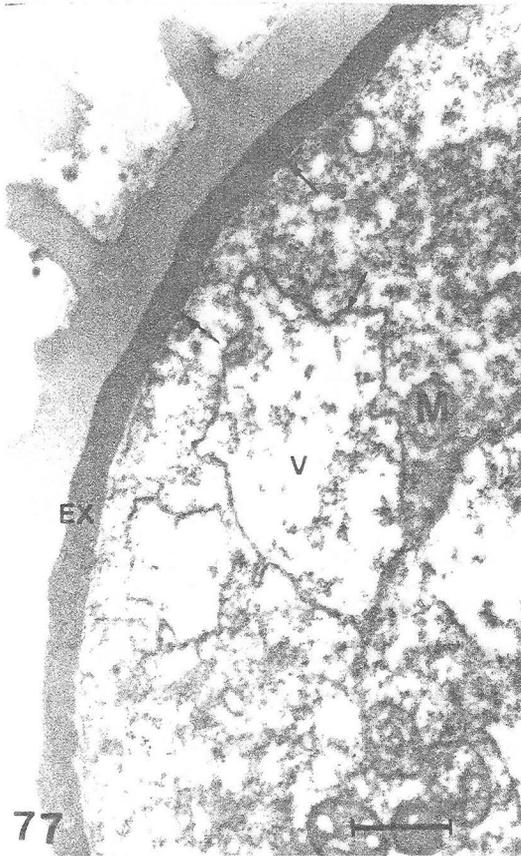
Superficies celulares: nitrato de lantano

Fig. 77. Microspora vacuolada. Se puede observar un ligero precipitado por la intina así como un mayor contraste del tonoplasto (flechas) (x13.000).

Fig. 78. Microspora vacuolada. Se observa un grueso precipitado a través de la exina (★) (x32.000).

Fig. 79. Grano bicelular reciente. Se puede observar igual que en la foto anterior un grueso precipitado a través de la exina, (★) así como en los orificios o microcanales de la ectexina (flechas) que en tinciones normales hemos observado blancos. (25.000).

Fig. 80. Aspecto de la zona apertural de un grano bicelular reciente donde no se observa ningún indicio de paso de lantano a través de ella. Obsérvese que las tubulaciones de la intina poral no están en contacto con la superficie externa del poro (10.000).



LAMINA XXVII

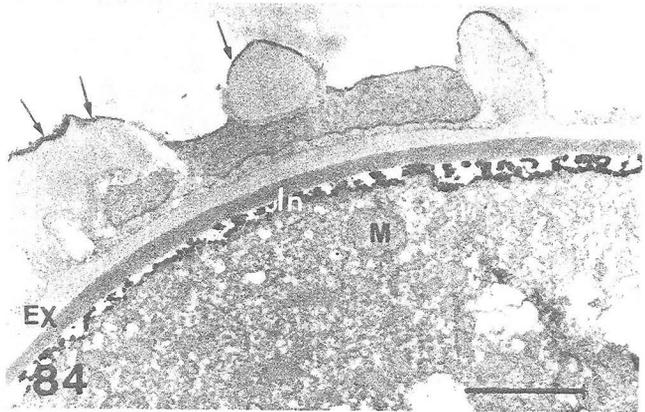
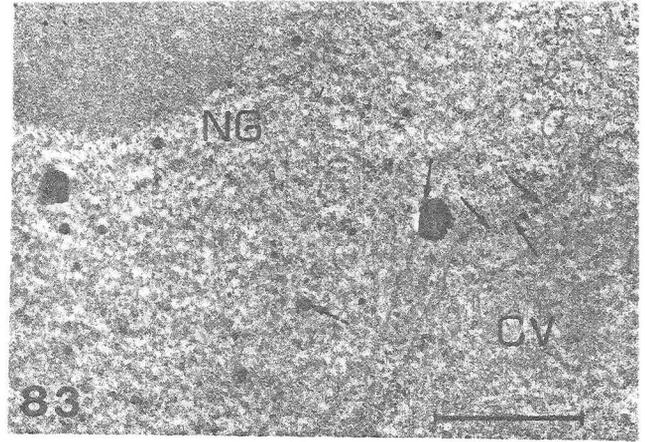
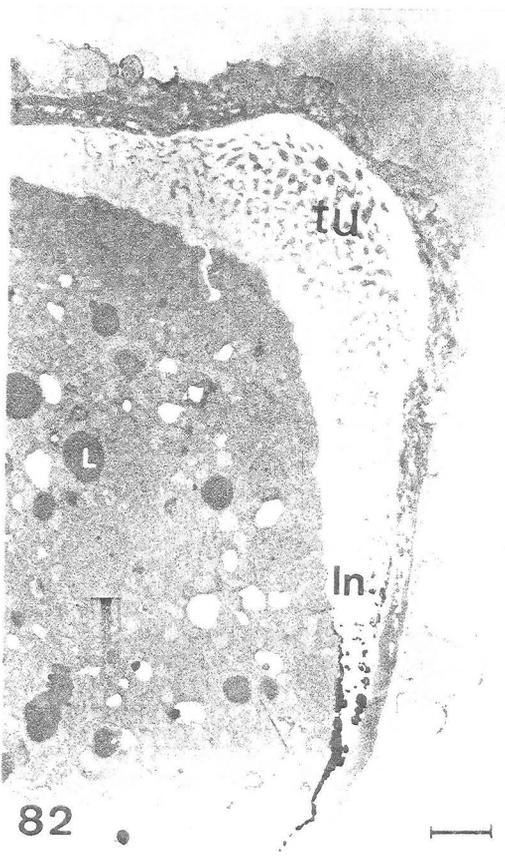
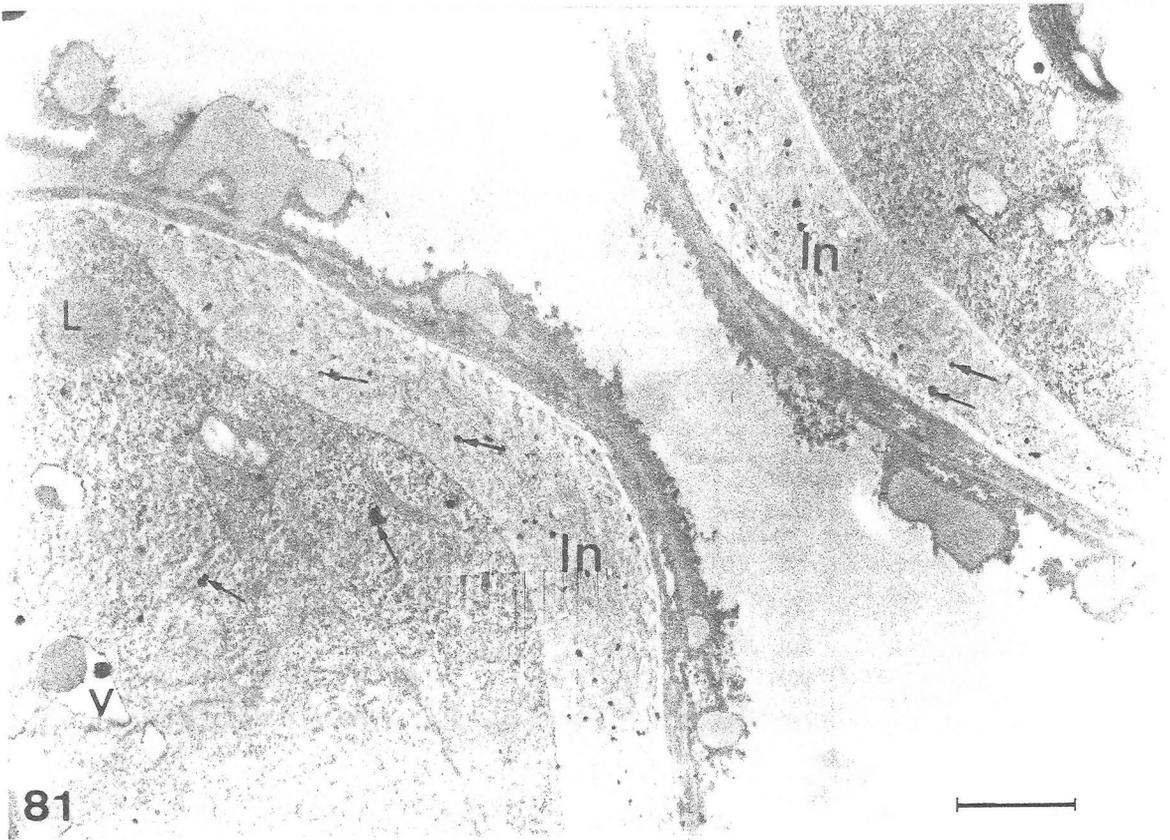
Superficies celulares: Nitrato de lantano

Fig. 81 Zonas aperturales del grano bicelular medio. Se localiza un precipitado grueso en el interior de los túbulos de la intina apertural. Este precipitado se localiza también por el citoplasma (flechas). Obsérvese como los túbulos porales están en contacto con la superficie externa del poro y con el plasmalema (x16.000).

Fig. 82. Zona apertural del grano de polen maduro en cuyas tubulaciones se localiza el contenido denso característico de este estadio. El precipitado no se localiza en la intina apertural pero sí en la intina a partir de las aperturas (x 8.200).

Fig. 83. Detalle del citoplasma del grano bicelular medio correspondiente al mismo estadio de la fig. 81. Se puede observar un precipitado grueso por todo el citoplasma así como un fino precipitado en la pared que separa las dos células del grano de polen (flechas) (x 20.000).

Fig. 84. Pared del grano de polen maduro correspondiente al mismo estadio de la fig. 82. Se observa un precipitado grueso en la intina así como en la superficie de la exina (flechas) (x 16.000).



6. MORFOMETRIA

Para realizar el estudio morfométrico durante el desarrollo del grano de polen se han utilizado los siguientes estadios:

1. tetradas (tetr.)
2. Microspora joven (M. J.)
3. Microspora vacuolada (M. V.)
4. Grano bicelular joven (G. B. J.)
5. Grano bicelular medio (G. B. med.)
6. Grano bicelular maduro (G. B. mad.)

6.1. MICROSPORA Y GRANO DE POLEN: CELULA VEGETATIVA

6.1.1. Area celular, vacuolar, nuclear, nucleolar, lipídica, de plastidios y de almidón.

Estas áreas han sido medidas sobre distintas fotografías realizadas con el microscopio de transmisión sobre un analizador semiautomático de "IBAS 1, de Kontron".

Las áreas lipídicas presentaban dificultad de medida en este aparato, ya que su área pequeña nos podría inducir a grandes errores por lo que solo en este caso y aprovechando la forma circular que presentan en los cortes se midieron sus diámetros con una lupa graduada, y así se obtuvieron los diámetros medios de los lípidos por fotografía y por estadio, lo que nos permitió hallar el área media de ellos por estadio.

Sobre los valores obtenidos en todas las áreas citadas en cada estadio se realizó, la media aritmética y su error típico (tabla 1) y la desviación típica (tabla 6). Posteriormente se calculó

el porcentaje que las distintas áreas ocupan en relación con el área celular total en cada estadio (tabla 3). Así como el porcentaje de área que ocupa el nucleolo respecto al núcleo en cada estadio (tabla 4).

El área celular aumenta en todos los estadios, sin embargo el aumento mayor se presenta entre la microspora joven (estadio 2) y la microspora vacuolada (estadio 3) de forma que esta última tiene un área algo más del doble que la primera. El aumento menor se observa entre el grano bicelular medio (estadio 5) y el grano bicelular maduro (estadio 6), es decir, en la última etapa de su desarrollo en el interior de la antera (tabla 1, gráfica 1).

El área vacuolar sufre un gran aumento en el estadio de microspora vacuolada (estadio 3) para a partir de aquí disminuir en los estadios posteriores (tabla 1, gráfica 2). El porcentaje del área vacuolar sigue la misma inflexiones (tabla 3, gráfica 3).

El área nuclear y el área nucleolar aumentan desde tetradas hasta la microspora vacuolada (estadio 3), haciéndose este aumento bastante mayor en el paso de microspora joven (estadio 2) a vacuolada (estadio 3) (tabla 1, gráfica 4). Una vez producida la división mitótica asimétrica la suma del área de los dos núcleos y nucleolos hijos (vegetativo y generativo) aumentan con respecto a la microspora vacuolada (estadio 3) en el grano bicelular joven (estadio 4), para disminuir progresivamente en los estadios posteriores (gráfica 4). En la célula vegetativa el área nuclear se mantiene constante entre el estadio de grano bicelular joven (estadio 4) y el grano bicelular medio (estadio 5) y disminuye al llegar el grano maduro (estadio 6) (tabla 1, gráfica 6). El área nucleolar de la célula vegetativa en el grano de polen disminuye desde su formación en el grano bicelular joven

(estadio 4) hasta el medio (estadio 5) llegando prácticamente a desaparecer el nucleolo en el grano maduro por lo que en este periodo no se han realizado medidas (tabla 1, grafica 5). El porcentaje del núcleo respecto al área celular en la microspora presenta un máximo en el periodo vacuolado (estadio 3) (tabla 3, gráfica 7). El porcentaje que ocupa la suma de los dos núcleos (vegetativo y generativo) en el grano de polen disminuye progresivamente (gráfica 7). El porcentaje que ocupa el área nuclear de la vegetativa en el citoplasma de ésta sigue unas inflexiones similares a las observadas teniendo en cuenta los dos núcleos (gráfica 8). El porcentaje que ocupa el nucleolo respecto al núcleo va aumentando hasta un máximo en el grano bicelular reciente (estadio 4) disminuyendo posteriormente al llegar al grano bicelular medio (estadio 5) (tabla 4, gráfica 9).

Las áreas de plastidios y almidón siguen cambios paralelos, observándose un incremento rápido a partir de la microspora joven (estadio 2) hasta el grano bicelular medio (estadio 5) para descender rápidamente en el grano bicelular maduro (estadio 6) (tabla 1, gráfica 10). El porcentaje de estas áreas respecto al área celular total sigue una trayectoria similar (tabla 3, gráfica 12).

El área lipídica aumenta en todos los estadios pero el incremento mayor se alcanza entre el grano bicelular joven (estadio 4) y el grano bicelular medio (estadio 5). Igual ocurre en sus porcentajes (tablas 1,3; gráficas 10, 12).

6.1.2. Densidad de plastidios, almidón y lípidos.

Sobre los plastidios, almidón y lípidos además de medir el área se realizó el conteo de ellos por fotografía y estadio lo que nos permitió obtener la media y el error típico de la media (tabla 2) así como su desviación típica (tabla 8) para así calcular

la densidad media de cada uno de estos parámetros por estadio y unidad de área (tabla 5).

La densidad de plastidios por unidad de área (u. a) disminuye bruscamente desde la microspora joven (estadio 2) a la microspora vacuolada (estadio 3), para continuar prácticamente constante hasta el grano bicelular medio (estadio 5) y desde aquí **descender** en el grano maduro (estadio 6) (tabla 5, gráfica 11).

La densidad de almidón por u. a. aumenta progresivamente hasta un máximo en el grano bicelular medio (estadio 5), desde donde cae bruscamente hasta el grano bicelular maduro (estadio 6) (tabla 5, gráfica 11).

La densidad de lípidos por u. a. se mantiene prácticamente constante hasta el grano bicelular recién formado (estadio 4), para realizar un aumento brusco en el grano bicelular medio (estadio 5) y seguir aumentando en el grano maduro (estadio 6) (tabla 5, gráfica 11).

Las densidades por estadio (tabla 5) como se puede observar presentan unos datos muy similares al ser comparados con los obtenidos por u. a.

6.2. GRANO DE POLEN: CELULA GENERATIVA

6.2.1. Area celular, nuclear y nucleolar.

De la misma forma que se ha descrito para la microspora y la célula vegetativa del grano de polen se realizaron medidas para el área celular, nuclear y nucleolar en la célula generativa. Sobre los valores obtenidos se realizó la media aritmética y

y el error típico de la media (tabla 1), la desviación típica (tabla 6) y el porcentaje de área que ocupa el núcleo respecto al área de la célula vegetativa (tabla 3).

Las áreas celular, nuclear y nucleolar en la célula generativa descienden progresivamente (tabla 1, gráficas 5, 6).

El porcentaje de área que ocupa el núcleo se mantiene más o menos constante (tabla 3, gráfica 8), mientras que, el porcentaje del área nucleolar respecto al núcleo desciende rápidamente desde el grano bicelular recién formado (estadio 4) hasta el grano bicelular medio (estadio 5), haciéndose nulo en el grano bicelular maduro (estadio 6) ya que el nucleolo en este estadio prácticamente desaparece por lo que no se han hecho medidas (tabla 4, gráfica 9).

6.3. ANALISIS ESTADISTICO

Una vez realizados los contraste ya indicados en el correspondiente apartado de material y métodos, para relacionar los distintos estadios con respecto a cada uno de los parámetros estudiados, los resultados obtenidos del análisis estadístico se pueden resumir de la siguiente forma:

Para el área celular total del grano de polen a lo largo de su desarrollo se han observado diferencias significativas de los valores obtenidos salvo entre el grano bicelular medio (estadio 5) y el grano bicelular maduro (estadio 6), que por tanto se consideran la misma población respecto a este parámetro.

Para el área vacuolar se han observado diferencias significativas entre los distintos estadios una vez realizado el estudio estadístico salvo entre el grano bicelular joven (estadio 4) y el grano bicelular

medio (estadío 5) que igual que en el caso anterior se comportan como una misma población para este parámetro.

El área nuclear durante los periodos de tetrada y microsporas (estadíos 1, 2, 3,) , presenta diferencias significativas. Una vez realizada la división mitótica asimétrica, inicialmente el núcleo de la célula vegetativa, entre grano bicelular joven (estadío 4) y grano bicelular medio (estadío 5), se considera que mantiene su tamaño, mientras que se observan diferencias significativas en los últimos periodos de su desarrollo (estadíos 5 y 6). Por el contrario, para el núcleo de la célula generativa, se han encontrado diferencias significativas entre el grano bicelular joven (estadío 4) y el grano bicelular medio (estadío 5), mientras que no se encuentran diferencias significativas entre este último y el polén maduro (estadío 6).

El área nucleolar durante los periodos de tetrada y microspora (estadíos 1, 2, 3,) , igual que ocurrió con el núcleo para estos estadíos, presenta diferencias significativas. Sin embargo, después de la división mitótica asimétrica, el nucleolo en la célula vegetativa se mantiene, mientras que en la célula generativa disminuye realmente ya que sus datos son significativamente diferentes.

En las áreas de plastidios, almidón y lípidos, así como para el número de ellos, se han observado diferencias significativas entre todos los estadíos.

Para el área celular de la célula generativa no se han observado diferencias significativas en ninguno de los estadíos, por lo que se puede considerar que este área se mantiene a lo largo del desarrollo del polén.

TABLA 1.

VALORES MEDIOS DE LAS AREAS EN μm^2

ESTADIOS		TETRADAS	M. JOVEN	M. VACUOLADA	G. B. JOVEN	G. B. MEDIO	G. B. MADURO
		1	2	3	4	5	6
MICROSPORA Y CELULA VEGETATIVA	área celular	68.3 \pm 7.3	101.5 \pm 4.6	227.6 \pm 17.3	289.8 \pm 10.3	344.4 \pm 13.6	362.9 \pm 11.3
	área vacuolar	---	5.8 \pm 0.6	46.7 \pm 5.4	25.3 \pm 2.8	20.9 \pm 2.2	---
	área nuclear	15.3 \pm 1.6	20.6 \pm 1.2	56.3 \pm 2.4	42.8 \pm 3.4	42.7 \pm 2.9	26.8 \pm 2.3
	área nucleolar	1.4 \pm 0.2	2.1 \pm 0.2	7.9 \pm 0.7	8.2 \pm 0.7	6.7 \pm 0.6	---
	área de plastidios	---	2.2 \pm 0.3	5.0 \pm 0.4	15.3 \pm 1.3	27.7 \pm 1.9	6.3 \pm 0.9
	área de almidón	---	0.1 \pm 0.02	2.04 \pm 0.3	11.0 \pm 0.9	22.5 \pm 1.9	2.4 \pm 0.6
	área de lípidos	---	0.8 \pm 0.3	2.9 \pm 0.2	4.9 \pm 0.2	10.9 \pm 0.2	12.6 \pm 0.2
CELULA GENERATIVA	área celular	---	---	---	31.7 \pm 2.9	29.8 \pm 2.2	25.2 \pm 2.5
	área nuclear	---	---	---	16.6 \pm 1.4	14.4 \pm 0.9	13.3 \pm 1.2
	área nucleolar	---	---	---	3.9 \pm 0.5	1.6 \pm 0.2	---

TABLA 2.

VALORES MEDIOS DEL N° DE PLASTIDIOS, ALMIDON Y LIPIDOS

ESTADIOS		M. JOVEN 2	M. VACUOLADA 3	G.B. JOVEN 4	G.B. MEDIO 5	G.B. MADURO 6
MICROSPORA Y CELULA VEGETATIVA	n° de plastidios	6.9 ± 0.8	7.2 ± 0.6	9.2 ± 0.5	11.2 ± 0.8	5.2 ± 0.8
	n° de almidón	0.2 ± 0.1	2.6 ± 0.4	9.4 ± 0.8	14.4 ± 0.8	2.9 ± 0.8
	n° de lípidos	1.9 ± 0.6	5.3 ± 0.5	5.8 ± 0.5	15.2 ± 2.6	25.3 ± 4.0

TABLA 3.

Porcentajes de valores de áreas medidas en elementos intracelulares en relación con el área celular total.

ESTADIOS	TETR,	M.J.	M.V.	G.B.J.	G.B. Med.	G.B. Mad.	
	1	2	3	4	5	6	
MICROSPORA Y CELULA VEGETATIVA	NUCLEO	22.4	20.3	24.7	16.6 14.8	13.6 12.4	7.6 7.4
	VACUOLAS	----	5.7	20.5	9.8 8.7	6.6 6.1	---
	LIPIDOS	----	0.8	1.3	1.9 1.7	3.5 3.2	3.6 3.5
	PLASTIDIOS	----	2.2	2.2	5.9 5.3	8.8 8.0	1.8 1.7
	ALMIDON	----	0.09	0.9	4.2 3.8	7.1 6.5	0.7 0.7
CELULA GENERATIVA	NUCLEO	----	---	---	52.4	48.6	52.2

En negrilla - Porcentajes sin tener en cuenta el área de la célula generativa.



TABLA. 4

Porcentajes de los valores del área nucleolar en relación con el área nuclear

ESTADIOS	TETR. 1	M.J. 2	M.V. 3	G.B.J. 4	G.B. Med. 5	G.B. Mad. 6
CELULA VEGETATIVA	9.1	10	14	19.3	15.7	---
CELULA GENERATIVA	---	--	--	23	11.1	---

TABLA 5.

Densidad de plastidios, almidón y lípidos.

ESTADIOS	M.J. 2	M.V. 3	G.B.J. 4	G.B. Med. 5	G.B. Mad. 6	
PLASTIDIOS	Densidad por estadio	0.07	0.03	0.03	0.03	0.01
	Densidad por unidad de área	6.95	3.24	3.24	3.39	1.46
ALMIDON	Densidad por estadio	0.0025	0.011	0.032	0.041	0.008
	Densidad por unidad de área	0.25	1.16	3.3	4.25	0.8
LIPIDOS	Densidad por estadio	0.02	0.02	0.02	0.04	0.07
	Densidad por unidad de área	1.95	2.39	2.05	4.5	7.07

TABLA 6.

Desviación típica de las áreas. .

ESTADIOS		TETR.	M.J.	M.V.	G.B.J.	G.B. Med.	G.B. Mad.
		1	2	3	4	5	6
Microspora y Célula vegetativa	área celular	33.7	22.4	85.0	46.1	61.0	52.1
	área nuclear	7.75	6.94	12.9	12.6	11.8	9.05
	área nucleolar	0.79	0.84	3.24	2.56	2.39	---
	área vacuolar	---	2.77	24.4	12.7	10.0	---
	área de plastidios	---	1.50	1.78	5.60	9.00	4.40
	área de almidón	---	0.10	1.50	4.10	8.90	2.83
	área de lípidos	---	1.30	1.40	0.90	1.02	0.24
Célula generativa	área celular	---	---	---	14.0	10.2	12.2
	área nuclear	---	---	---	6.80	4.04	5.87
	área nucleolar	---	---	---	1.90	0.50	---

TABLA 7.

Medidas realizadas para el nº de plastidios, almidón y lípidos

ESTADIOS	TETR. 1	M.J. 2	M.V. 3	G.B.J. 4	G.B.Med. 5	G.B.Mad 6
nº de plastidios	--	20	20	20	20	18
nº de almidón	--	20	20	20	20	19
nº de lípidos	--	20	20	20	20	19

TABLA 8.

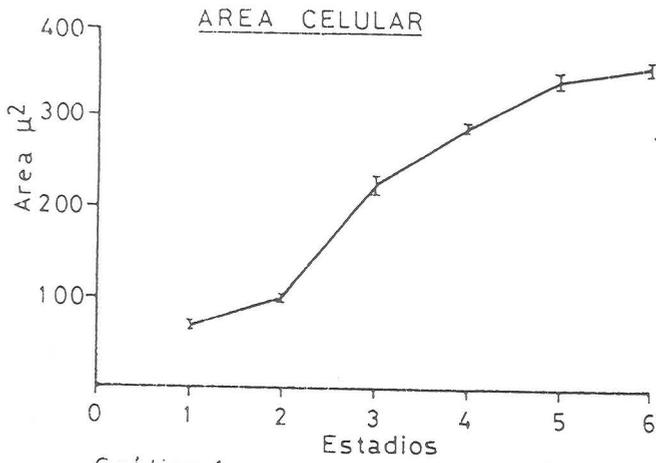
Desviación típica para el nº de plastidios, almidón y lípidos

ESTADIOS	TETR. 1	M.J. 2	M.V. 3	G.B.J. 4	G.B.Med. 5	G.B.Mad 6
nº de plastidios	--	3.41	2.7	2.47	3.65	3.54
nº de almidón	--	0.60	1.83	3.77	3.90	3.57
nº de Lípidos	--	2.85	2.30	2.35	11.50	17.60

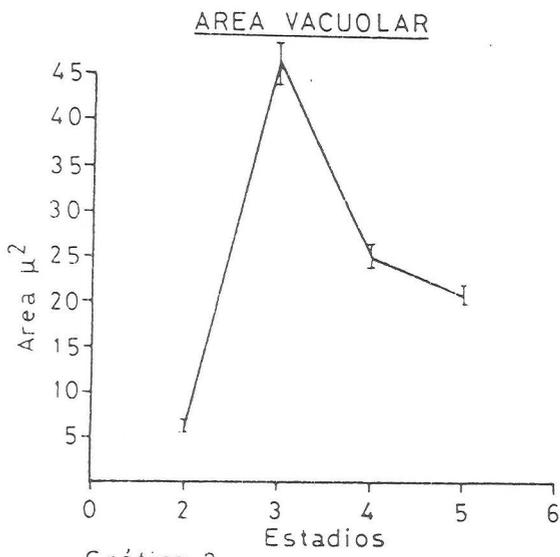
TABLA 9.

Nº de Medidas realizadas para las áreas

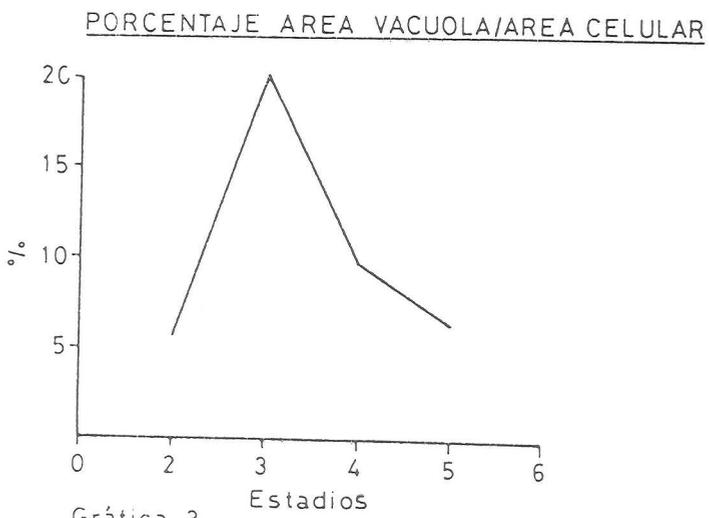
ESTADIOS	TETR.	M.J.	M.V.	G.B.J.	G.B. Med.	G.B. Mad.	
	1	2	3	4	5	6	
MICROSPORA Y CELULA VEGETATIVA	área celular	21	24	24	20	20	21
	área nuclear	22	33	28	14	17	15
	área nucleolar	22	17	23	14	15	--
	área vacuolar	--	20	20	20	20	20
	área de plastidios	--	20	20	20	22	21
	área de almidón	--	20	20	20	22	21
	área de lípidos	--	20	50	72	76	94
CELULA GENERATIVA	área celular	--	--	--	22	22	24
	área nuclear	--	--	--	22	22	23
	área nucleolar	--	--	--	15	9	--



Gráfica.1

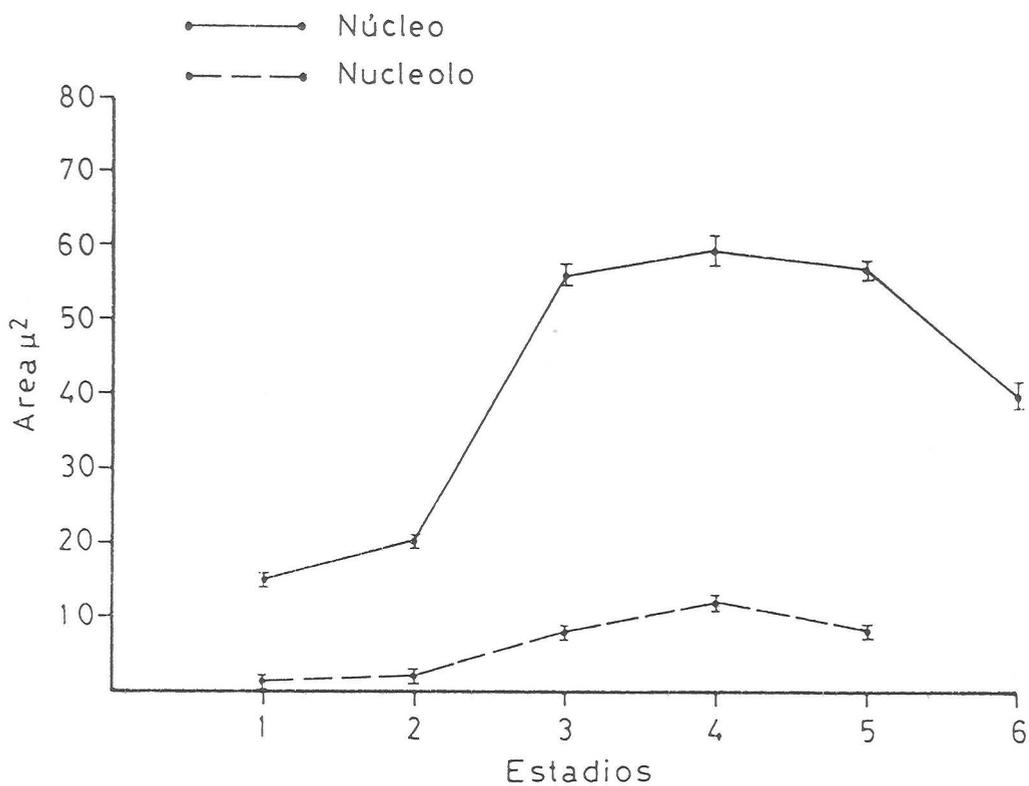


Gráfica.2



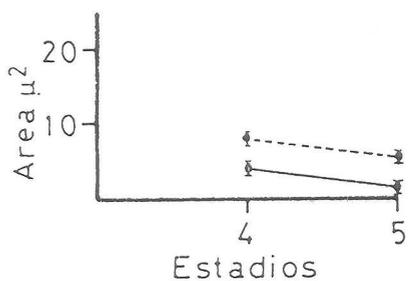
Gráfica.3

AREA NUCLEAR Y NUCLEOLAR (Grano de polen)



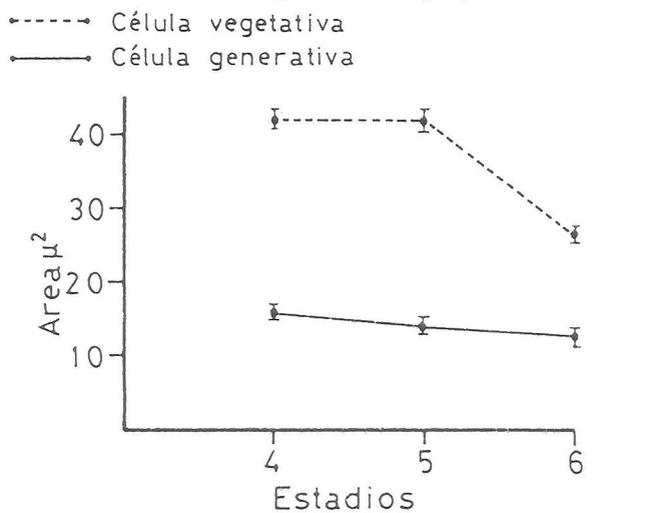
Gráfica. 4

AREA NUCLEOLAR
(Célula vegetativa y generativa)

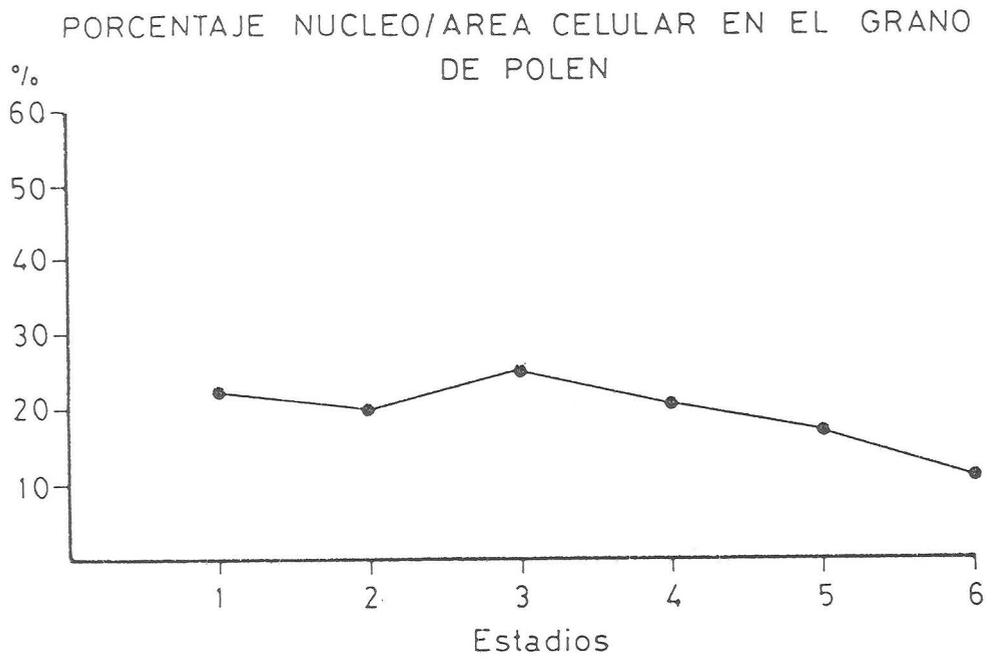


Gráfica. 5

AREA NUCLEAR
(Célula vegetativa y generativa)

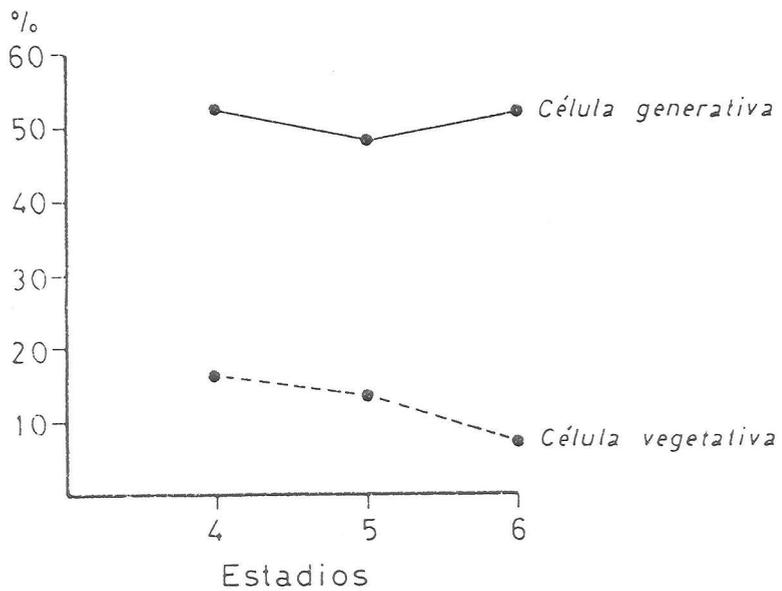


Gráfica. 6



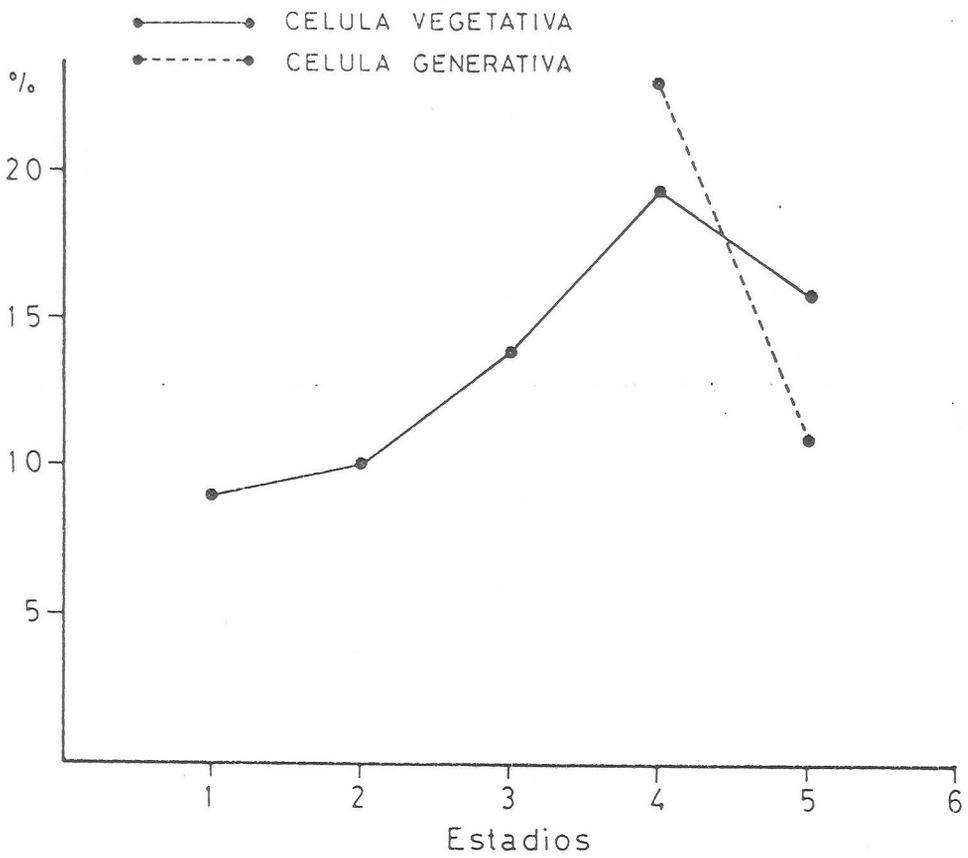
Grafica. 7

PORCENTAJES NUCLEO/AREA CELULAR EN LAS CELULAS VEGETATIVA Y GENERATIVA RESPECTIVAMENTE



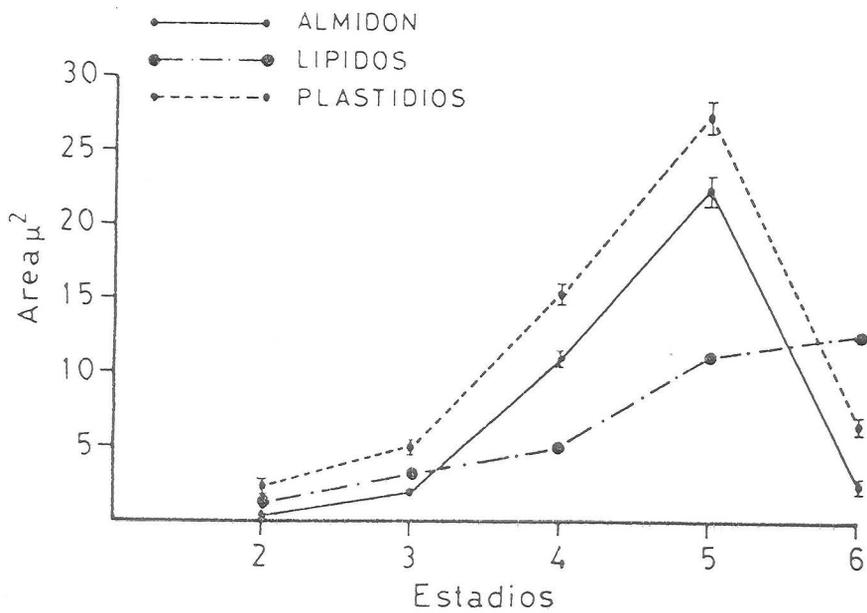
Grafica. 8

PORCENTAJE NUCLEOLO / NUCLEO



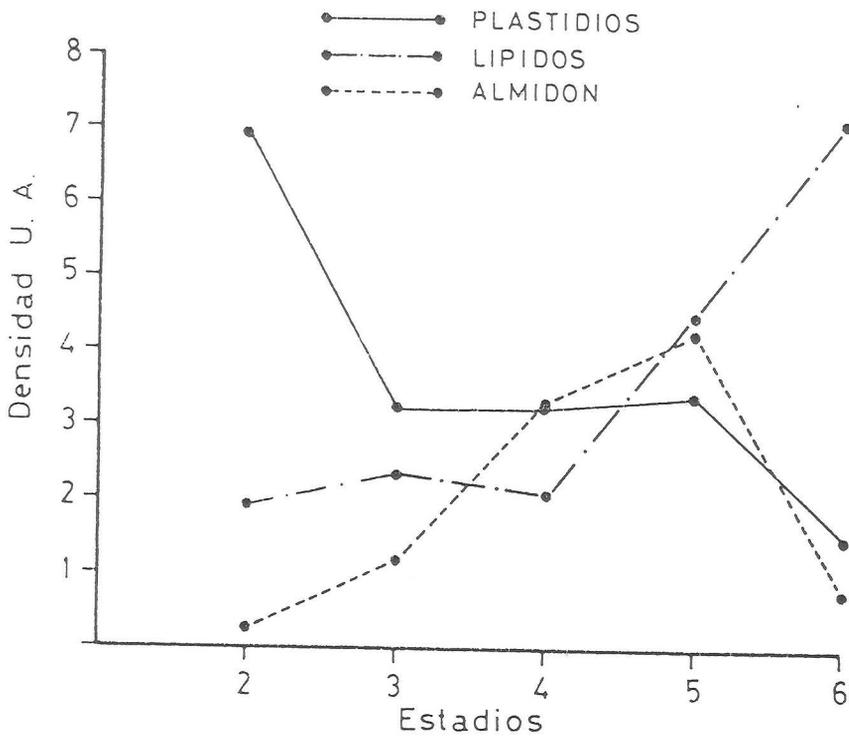
Gráfica. 9

AREA DE PLASTIDIOS ALMIDON (celula vegetativa) Y LIPIDOS



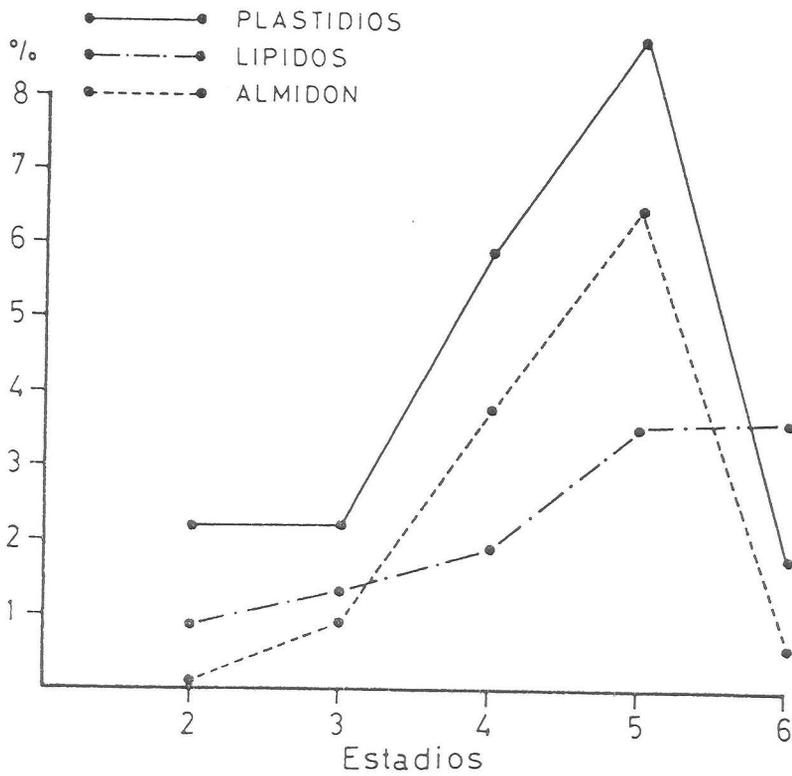
Gráfica.10

DENSIDADES DE PLASTIDIOS, ALMIDON Y
LIPIDOS POR U.A.



Grafica. 11

PORCENTAJE AREA LIPIDOS PLASTIDIOS Y
ALMIDON/AREA CELULAR



Grafica. 12

D I S C U S I O N

1. ESTADIOS DE DESARROLLO EN EL POLEN

Los periodos de desarrollo del polen representan un t3pico que ha sido ignorado por la mayor3a de los autores, as3 Stanley y Linskens (1.974) en su principal trabajo sobre la biolog3a del polen, dividi3 el desarrollo del polen en dos estadios b3sicos: tetradas y microspora libre, subdividiendo estos en subperiodos bien definidos de acuerdo con la deposici3n de las distintas capas de la pared. Otros autores han dividido las etapas refiri3ndose a la formaci3n de la exina, junto a la mitosis del polen y formaci3n de la c3lula generativa (Dickison 1.982).

Para que el desarrollo y diferenciaci3n de la microspora y grano de polen pueda ser estudiado con el m3ximo rigor y as3 evitar malas interpretaciones se hace necesario la utilizaci3n de unos par3metros marcadores que definan los diferentes estadios. Nosotros hemos utilizado los propuestos recientemente por Knox (1.984) simplificando los 8 estadios propuestos por 3l a 7.

- telofase - interfase temprana
- tetradas
- Microspora joven
- Microspora vacuolada
- Grano bicelular joven
- Grano bicelular medio
- Grano bicelular maduro

2. INCREMENTO DEL AREA CELULAR Y EVOLUCION DEL AREA VACUOLAR

El aumento de tamaño observado durante el desarrollo del polen de Olea europaea parece ser en líneas generales semejante al estudiado por otros autores (Mephan y Lane, 1.970 en Tradescantia bracteata y Mascarenhas, 1.975 en Lillium), consistente en un gran incremento nada mas liberarse la microspora de la pared de calosa, seguido de un incremento progresivo hasta la dehiscencia de la antera.

En nuestro material la microspora de unos $68.3 \mu\text{m}^2$ de área llega a hacerse cinco veces mayor en el grano bicelular medio ($344.4 \mu\text{m}^2$). A partir de este momento se puede considerar que el tamaño del grano se estabiliza ya que el ligero aumento obtenido en nuestros resultados no es significativo ($362.9 \mu\text{m}^2$). En cualquier caso nunca hemos encontrado una disminución en el tamaño del grano maduro como indican algunos autores (Banerjee y col. 1.965). En el caso de que esto ocurra en el olivo, esta disminución tendría lugar después de la dehiscencia de la antera que es cuando el grano tiene más probabilidades de deshidratarse pero en este trabajo no ha sido objeto de estudio el grano después de la dehiscencia.

El mayor incremento de tamaño tiene lugar durante el desarrollo de la microspora, coincidiendo con el periodo de vacuolización de la misma. En este tiempo (relativamente corto en relacion con todo el proceso), el área total de la microspora llega a hacerse más del doble (de $101.5 \mu\text{m}^2$ en la microspora joven a $227.6 \mu\text{m}^2$ en la vacuolada). El área de la microspora vacuolada también pasa de ser $5.8 \mu\text{m}^2$ en la microspora joven a $46.7 \mu\text{m}^2$ en la microspora vacuolada, llegando en este momento a ocupar la vacuola el 20.5% del área celular total.

La formación de esta gran vacuola central es un proceso general durante la microsporogénesis, que mantiene una estrecha relación con la polarización de los organulos celulares originada antes de la división, si bien no parece probable que sea la vacuola la causa directa que desplace al citoplasma hacia un extremo, ya que se sabe que existe un equilibrio osmótico entre vacuola-citoplasma, por lo que debe ser el citoesqueleto de la célula el responsable de esta polarización. También debe jugar un papel en la división asimétrica que da lugar al grano de polen bicelular y en el reparto desigual de las organelas entre las dos nuevas células formadas. Se conocen otros casos muy concretos en plantas como es la formación de los estomas y los pelos radicales, en que la división asimétrica va precedida de la presencia de una gran vacuola que luego se reabsorbe. Mephram y Lane (1.970), han encontrado enzimas hidrolíticas en esta vacuola por lo que ellos postulan la hipótesis de que la vacuolización esta relacionada con la diferenciación citoplasmática del polen y por tanto le atribuyen una función lítica. Sin embargo, inicialmente más que diferenciación se puede considerar que lo que se produce es una formación "de novo" de citoplasma bien a partir de sustancias procedentes del tapetum (vacuolas) o bien a partir de la síntesis propia nuclear. Por tanto la función de esta vacuola no parece ser de degradación citoplasmática o lisis, sino más bien como lugar de reserva de sustancias y para equilibrar el diferente reparto citoplasmático que se produce entre las dos células hijas.

Esta gran vacuola se forma por fusión de otras más pequeñas que van apareciendo en diferentes estadios del desarrollo de la microspora según las especies, así en tetrada madura en Begonia sempreflorens (Abreu y Dexheimer, 1.973). O a partir de microspora joven en Saintpaulia ionantha (Mephram y Lane 1.970) y Tradescantia bracteata (Abreu y Dexheimer, 1.973).



Es generalmente admitida la formación de vacuolas en plantas a partir de una hipertrofia del retículo endoplasmático (Mezquita, 1.969; Risueño y col., 1.970). Nosotros no hemos encontrado este mecanismo en la formación de la vacuola de la microspora, sin embargo, hemos observado como cisternas de retículo endoplasmático rugoso rodean zonas de citoplasma el cual termina transformándose en el contenido de la vacuola por dilución al entrar disolvente (agua, etc.) procedente del lóculo de la antera al interior de la microspora. Finalmente una de las membranas del retículo y los ribosomas adosados a ella queda en el interior de la vacuola y termina degradándose y la membrana externa pasa a ser el tonoplasto. Un mecanismo parecido ocurre en la formación de las vacuolas estatolíticas de rizoides de Chara (Schröter y col. 1.973).

En Olea europaea en el estadio de grano bicelular medio cuando la gran vacuola está muy fragmentada y en la fase final de reabsorción, se puede observar un material muy denso en todas ellas que ocupa prácticamente todo el contenido vacuolar. Este material, presumiblemente de naturaleza proteínica podría proceder de la condensación del soluto de la vacuola por salida al citoplasma de su parte líquida, y que más tarde también será utilizado por el citoplasma del grano como sustancia de reserva al reabsorberse totalmente el sistema vacuolar.

Posteriormente en el grano maduro aparecen pequeñas vacuolas de contenido claro y que en nuestra opinión no tienen nada que ver en este momento con el sistema vacuolar de la microspora ya desaparecido y que probablemente tiene una relación con la elongación del tubo polínico ya que aparecen inmediatamente antes de la germinación en gran cantidad. El alto grado de metabolismo que se encuentra en el grano de polen bicelular tiene como finalidad dotar al grano maduro de una gran reserva de productos que el grano de polen ya maduro necesita tener disponibles para llevar a cabo el rápido proceso de la germinación.

3. EVOLUCION DEL NUCLEO

A lo largo del proceso de formación del polen de Olea europaea la cromatina sufre varios procesos de condensación y descondensación sucesivas así como el nucleolo pasa desde periodos de inactividad a muy activos como puede observarse en el esquema II.

Existe evidencia de que la cromatina descondensada representa el periodo activo en síntesis de DNA y RNA (Derenzini y col., 1.977; Tokuyasu y col., 1.968). El grado de descondensación, sería en parte la expresión morfológica de un alto grado de transcripción ya que se ha demostrado que, en la interfase, las áreas de cromatina difusa estarían asociadas a actividad en síntesis de RNA y las áreas de cromatina condensada a inactivación de esta síntesis (Frenster, 1.969; Kuroiwa y Tanaka, 1.971). Otro dato morfológico que corrobora este hecho es que el contenido de material fibrilar y granular en las zonas intercromatínicas pasa de ser escaso después de la división meiótica a ser muy alto en los estadios siguientes, estando constituido este material, por una gran cantidad de gránulos inter y pericromatínicos y numerosas fibrillas que se corresponderían a fibras de ribonucleoproteínas y a fibras de cromatina descondensada, puesto que existe una proporcionalidad respecto a la cantidad de ambos tipos de fibrillas en los espacios peri e intercromatínicos (Derenzini y col.1977; Risueño y Moreno Díaz de la Espina, 1.979). Es decir, por un lado se produciría síntesis de RNA cuya expresión morfológica son las fibrillas (Fakan y Bernhard, 1971; Nash y col., 1.975) y por otro lado procesamiento y almacenamiento de este RNA, lo que vendría representado por los gránulos inter y pericromatínicos (Puvi6n y Moyne, 1.981).

Durante el periodo de telofase - interfase temprana la cromatina

está muy condensada y en los espacios intercromatínicos que están muy vacíos solo encontramos fibrillas pericromatínicas que se podrían corresponder probablemente a fibras de cromatina descondensada, las cuales representarían en este momento la única forma activa en el núcleo de la síntesis de DNA y RNA (Derenzini y col., 1.977). Durante este periodo el nucleolo, está en plena fase de reorganización en la que los cuerpos prenucleolares se fusionan a la vez que se da síntesis de novo de RNA nucleolar (Das y Alfert, 1.963; Moreno Díaz de la Espina y col., 1.976) que parece ser necesaria para que se complete la nucleologénesis (Stodker y col., 1.970; Morcillo y de la Torre, 1.979).

El periodo denominado como tetradas viene representado morfológicamente por una disminución progresiva del tamaño de las masas de cromatina condensada, así como por un incremento de material fibro-granular localizado en los espacios intercromatínicos donde son muy abundantes y aparentes los gránulos pericromatínicos y los tipos de fibrillas encontrados son tanto peri como intercromatínicas lo que indicaría una alta síntesis de RNA. En estos estadios en que aumenta el material fibrilo-granular en los espacios intercromatínicos, el nucleolo aparece únicamente con componente fibrilar lo que indica una ausencia de actividad transcripcional nucleolar (Medina y col., 1.978, Risueño y col., 1.982; Medina y col., 1.983).

Durante el periodo de liberación de la pared de calosa, la cromatina nuclear se puede encontrar en distintos grados de condensación, hasta que al llegar al estadio de microspora vacuolada próxima a la división mitótica no se observan las masas de cromatina condensada típicas del núcleo reticulado de plantas (Jordan 1.984) ofreciendo un aspecto muy semejante al de las células animales. En las zonas intercromatínicas, los gránulos pericromatínicos se mantienen al igual que las fibrillas intercromatínicas sin

embargo lo más característico de estas zonas es la aparición progresiva de gránulos intercromatínicos que ya son muy abundantes en la microspora vacuolada. Por todo ello la microspora presenta diferentes momentos en cuanto a la actividad transcripcional, ya observada por Mitchell, 1.969; Jacob, 1.972; los cuales observan en sus trabajos como el patrón de síntesis de RNA en el ciclo celular, varía según las especies y para cada especie existen momentos de máxima y mínima actividad transcripcional.

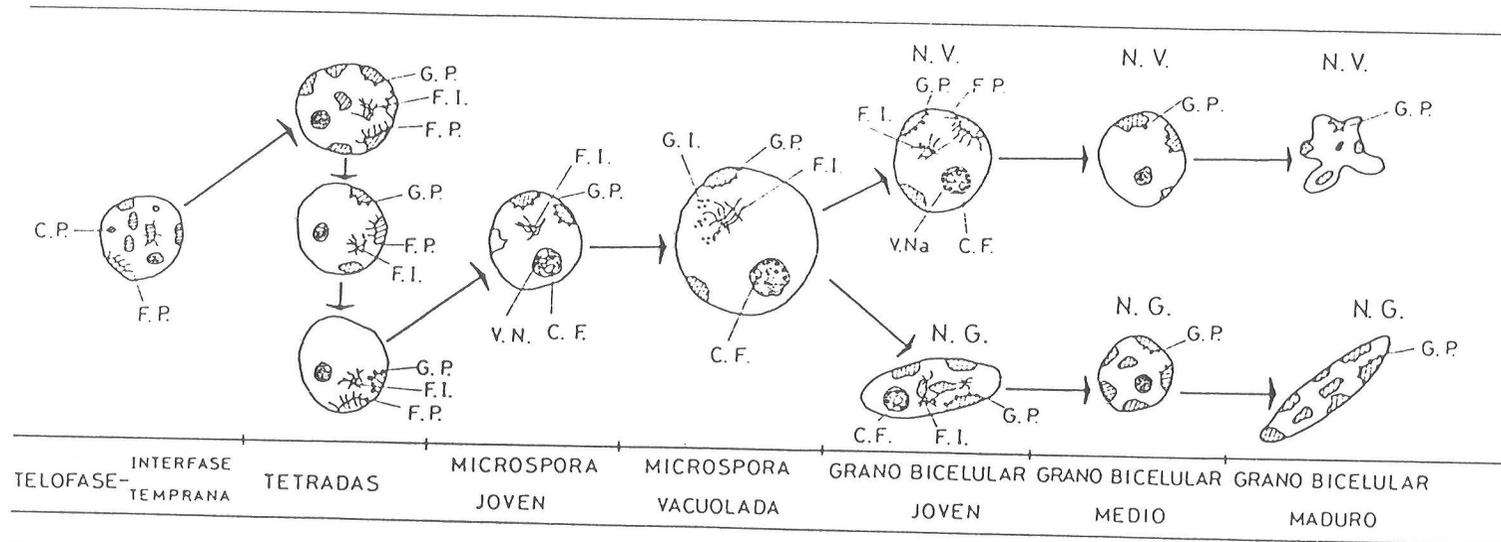
En este periodo el RNA que se sintetiza debe ser al menos en parte de origen extranuclear lo que vendría demostrado por la evolución del nucleolo. A medida que nos acercamos a la división mitótica se puede ver como este va siguiendo el modelo de actividad establecido por Medina y col., (1.983) ya que inicialmente se observan centros fibrilares homogéneos que se van ramificando, es decir, que la actividad nucleolar, y por tanto la síntesis de RNA en la microspora se incrementa progresivamente durante la interfase, hasta llegar a un pico máximo justo antes de la mitosis. Los centros fibrilares pueden aparecer conectados con espacios claros o grises que aparecen en estados todavía de baja actividad nucleolar y no deben confundirse con las vacuolas nucleolares (procedentes de la reactivación de los anteriores) que aparecen cuando el nucleolo se hace transcripcionalmente muy activo posteriormente (Moreno Diaz de la Espina y col., 1.980).

Antes de la división mitótica la cromatina se condensa rápidamente para entrar en mitosis. Ello estaría de acuerdo con los resultados de Kuroiwa y Tanaka (1.971) y Kuroiwa (1.974) que indican que el último DNA que se replica es el que se condensa más rápidamente. El nucleolo denota en estos momentos una intensa actividad consistente en la presencia de componente granular, de una gran vacuola central y centros fibrilares homogéneos. La función fisiológica

de esta vacuola no se ha determinado, pero se ha pensado que puede contribuir a aumentar la superficie de las zonas de síntesis de RNA así como el procesamiento y transporte del mismo. La presencia de componente granular, pero no en gran cantidad es signo de un transporte rápido hacia el citoplasma.

Este aumento en la actividad del nucleolo al final de la interfase coincide con los resultados bioquímicos hallados por Steffens en (1.966) y Mascarenhas y Bell (1.970) en microspora de Lilium y Tradescantia respectivamente en las cuales la mayor síntesis de RNA se produce al final de la interfase justo antes de la mitosis. Paralelamente al proceso de entrada en mitosis de la microspora el nucleolo adquiere la morfología segregada característica del nucleolo en dispersión y en el componente fibrilar aparecen centros fibrilares grandes con inclusiones de cromatina condensada en su interior que se van incorporando a los cromosomas, a medida que estos se condensan (Moreno Diaz de la Espina y col., 1.976).

Después de la división mitótica asimétrica la célula generativa pierde su actividad transcripcional ya que la cromatina se encuentra todo el tiempo mayoritariamente condensada y el nucleolo pierde rápidamente su componente granular para disminuir de tamaño y quedar como un resto fibrilar. Sin embargo, el núcleo de la célula vegetativa inicialmente es muy activo como lo indica la rápida descondensación de su cromatina y su nucleolo vacuolado con componente granular, posteriormente la cromatina se mantiene en semicondensación lo que sería un índice de una actividad media y el nucleolo queda como un resto fibrilar. Finalmente el núcleo pierde su forma esférica y toma una forma "ameboidea" característico de células muy diferenciadas y con bajo grado de funcionalidad.



F.P. --- fibras pericromatinicas
 F.I. --- fibras intercromatinicas
 G.P. --- gránulos pericromatinicos
 G.I. --- gránulos intercromatinicos
 C.P. --- cuerpos prenucleolares
 C.F. --- centros fibrilares
 V.N. --- vacuolas nucleolares
 N.Na. --- vacuolas nucleolares de activación
 N.V. --- núcleo vegetativo
 N.G. --- núcleo generativo

 Cromatina condensada
 Nucleolo fibrilar
 Nucleolo granular

ESQUEMA II.

Evolución del núcleo durante el desarrollo del grano de polen de *Olea europaea*.

4. RIBOSOMAS Y MATERIAL NUCLEAR CITOPLASMÁTICO: nucleoloides y masas fibrilares.

La existencia de un ciclo ribosómico durante la meiosis de plantas que florecen, parece ser un hecho hoy día generalmente aceptado, aunque se desconoce el mecanismo real de como se regula este ciclo.

La población ribosómica del citoplasma disminuye progresivamente durante la profase meiótica de las células madres de polen hasta alcanzar su valor mínimo entre diplotene y diacinesis (Mackenzie y col., 1.967, Sauter y Margnart, 1.967), seguida de una subida de RNA que se hace el doble en la diada en comparación con leptotene.

En nuestro trabajo no ha sido objeto de estudio la profase meiótica ni la meiosis propiamente dicha y por tanto no tenemos datos sobre la pérdida de ribosomas citoplasmáticos y posterior recuperación de los mismos en las células madres del polen. Pero lo que si podemos verificar es un aumento progresivo de ribosomas durante el desarrollo de la microspora, que llega a hacerse más evidente en el grano de polen bicelular.

Cuerpos parecidos a nucleolos, han sido descritos en el citoplasma de los meiocitos de Lilium con el termino de "nucleoloides" (Dickinson y Heslop-Harrison, 1.970). Cuerpos semejantes a estos encontrados en Lilium se han descrito en trabajos a microscopía óptica en plantas durante la meiosis. Ej.: en Lathyrus odoratus (Latter, 1.926), Fritilaria (Frankel, 1.937), Pisum sativum (Hakansso y Levan, 1.942), Sambucus nigra, Diervilla floribunda, Viburnum spp, Lonicera spp y Symphoricarpus racemosus (Gavaudan y Yu Chih-Chen, 1.936; Gavaudan, 1.948), Belevalia romana y Agapanthus umbellatus (Lindemann, 1.956), Allium cepa e Hyacintoides non-scripta (Sanchez - Pina, 1.983). Se ha sugerido que estos nucleoloides pueden tener un papel importante en el restablecimiento del RNA

citoplasmático (Dickinson y Heslop-Harrison, 1.970; Williams y col., 1.973) previamente eliminados durante la profase meiótica (Mackenzie y col., 1.967; Knox y col., 1.975). Sin embargo, a excepción de Lilium (monocotiledóneas) hasta ahora no hay información sobre la ultraestructura de los nucleoloides y su relación con los cambios en la población de ribosomas en los meiocitos de otras Angiospermas.

En nuestro material, Olea europaea (dicotiledóneas) se ha encontrado en el citoplasma de la microspora cuerpos semejantes en su estructura a los nucleolos. Se ha utilizado la técnica selectiva para el RNA y ribonucleoproteínas (Bernhard, 1.969) para confirmar su semejanza con la naturaleza química del nucleolo. Nuestros resultados parecen indicar en efecto, una relación entre los nucleoloides y la población ribosómica, de forma que estos cuerpos aparecen inicialmente durante la telofase II - Interfase temprana, en un citoplasma pobre en ribosomas y cuando el número de ribosomas se incrementa notablemente en la microspora, estos cuerpos dejan de observarse.

Aunque no ha sido cuantificada en nuestros estudios la población ribosómica, es evidente el aumento que esta experimenta durante el desarrollo del polen. Cabe destacar que el citoplasma de la tetraada madura aparentemente es más rico en ribosomas que la microspora recién liberada, lo que interpretamos como un mantenimiento en la cantidad de ribosomas, mientras que el volumen celular aumenta considerablemente con lo que la densidad ribosómica sería menor. Las presentes observaciones en Olea europaea parecen confirmar en Angiospermas que los nucleoloides son el principal mecanismo de repoblación ribosómica en el citoplasma después de la brusca caída de ellos durante la profase meiótica (Williams y col., 1.973).

Dickinson y Heslop-Harrison (1.970), sugieren que el proceso de formación de los nucleoloides puede parecerse al observado durante la maduración del oocito en anfibios, estando este proceso asociado con la producción de DNA adicional por multiplicación de los genes implicados con la síntesis de RNA (Gall, 1.969). La falta de evidencia de que los nucleoloides o sus precursores contengan DNA ha hecho que se deseche la posibilidad de esta ampliación genética (Williams y col., 1.973). Sin embargo, estudios autorradiográficos (Smyth y Shaw, 1.979) han revelado altos niveles de síntesis de DNA en el citoplasma durante la meiosis en Lilium. Esto indica que la falta de pruebas de la presencia de DNA en los nucleoloides o precursores no puede ser una prueba concluyente sobre la ausencia de DNA en tales estructuras ya que el DNA puede estar a concentraciones muy bajas no detectables con las técnicas empleadas por estos autores.

En Lilium se ha estudiado el origen de los nucleoloides (Williams y col., 1.973) en donde se demostró como estos o sus precursores se originaban en la región organizadora del nucleolo (NOR) del cromosoma nucleolar durante paquitene y diplotene en forma de nucleolo accesorio. Estas estructuras dejan el NOR y hacia el final de la profase son encontradas fuera del núcleo. En el curso de la división su material permanece probablemente en la superficie de los cromosomas como parte de la camiseta o funda de los cromosomas metafásicos. Cuando los cromosomas empiezan a descondensarse en anafase y después de la división este material es liberado de los cromosomas y contribuye a reorganizar los glóbulos que dan lugar a los nucleoloides. Sin embargo, queda todavía por ser explicado el mecanismo por el cual este material originado inicialmente en el núcleo y a continuación distribuido por el citoplasma es reorganizado en los glóbulos que darán lugar a los nucleoloides.

En nuestros estudios en Olea europaea se ha puesto de manifiesto que nucleolo y nucleoloides son idénticos en estructura y naturaleza estando constituidos solo por un componente, similar al que habitualmente se conoce como componente fibrilar del nucleolo (Jordan, 1.984) formando una estructura de alta densidad electrónica y naturaleza ribonucleoproteíca.

Junto a los nucleoloides en el citoplasma de tetradas de Olea se han encontrado unas masas irregulares, no descritas hasta ahora en la literatura, que carecen de membrana externa y su constituyente es fibrilar, formando una malla trabecular laxa que da una imagen menos densa a los electrones que los nucleoloides. El hecho de que estructuras comparables a estas masas fibrilares no hayan sido mencionadas en los trabajos anteriores relacionados con nucleoloides (Dickinson y Heslop-Harrison, 1.970; Williams y col. 1.973), puede ser debido a que hallan pasado desapercibidos entre las demás organelas citoplásmicas por su apariencia poco llamativa y que no siempre se encuentran cerca de los nucleoloides los cuales son más fácilmente reconocibles.

Sus características citoquímicas y estructurales sugieren que también pueden ser un material de origen nuclear. La estrecha proximidad entre nucleoloides y masas fibrilares, o bien el contacto directo encontrado entre ambas estructuras así como la disminución en número de estas masas en el tiempo en que los nucleoloides parecen desintegrarse, sugieren la hipótesis de que puedan tener un papel en la maduración de partículas preribosómicas almacenadas en los nucleoloides o bien en controlar a estos últimos en la liberación de ribosomas en el citoplasma en el momento oportuno. Se hacen necesarios más estudios para clarificar las incógnitas observadas referentes al ciclo del RNA en gametogénesis de Angiospermas.

5. DIFERENCIACION DEL CITOPLASMA

A lo largo de la evolución del polen de Olea europaea se pueden observar cambios morfológicos muy importantes en el citoplasma. Estos cambios morfológicos, reflejo de cambios metabólicos, tienen como finalidad ir estableciendo un equilibrio nucleo-citoplasma que permita llevar a termino la esporogénesis y gametogénesis ya que la microspora recién salida de la meiosis posee un núcleo haploide inmerso en el citoplasma procedente de un núcleo diploide y que por tanto está organizado para llevar a cabo las funciones propias del tejido esporofítico (Górska-Brylass y col., 1.984). También se observan cambios muy significativos en sus orgánulos inclusiones paraplásmáticas.

Py (1.932), realizó estudios sobre meiocitos en varias especies de Angiospermas observando como las organelas que constituían el "condrioma", que según Guillermond (1.920) es el conjunto de plastidios y mitocondrias, inicialmente son pequeños e indiferenciados y se van modificando posteriormente multiplicándose y acumulando almidón en los plastidos. En Olea europaea durante el inicial periodo de tetradas tanto las mitocondrias como los plastidios son pequeños y difíciles de distinguir entre sí y es a partir de la tetrada madura cuando estos orgánulos se diferencian.

Las mitocondrias parecen tener en Olea europaea un comportamiento semejante al observado en casi todas las especies estudiadas ya que inicialmente se observan de forma redondeada con pocas crestas para sufrir un incremento en la microspora vacuolada donde son observadas morfologías alargadas y en división en mayor número que en otras fases del desarrollo, y a partir de este momento vuelven a aparecer de nuevo mayoritariamente redondeadas. En nuestro material no se han observado demasiadas figuras en división,

la forma alargada que presentan en la microspora vacuolada y su posterior forma redondeada nos hace pensar que estas se dividen y aumentan , como consecuencia de la gran energía que el grano bicelular requiere, para que se pueda realizar el elevado metabolismo que tiene lugar durante la maduración del grano. Este hecho vendría apoyado por los estudios bioquímicos realizados en Larix europaea donde se ha encontrado que la actividad citocromo c-oxidasa aumenta desde la tetrada a la microspora madura (Gorska-Brylasy y col., 1.984).

En Olea europaea después de la telofase II los plastidios se encuentran indiferenciados en forma de proplastidios careciendo de almidón y presentando un estroma indiferenciado. De los diferentes modelos de comportamiento de los plastidios, en cuanto al contenido en almidón, el que parece predominar en las microsporas de la mayoría de la especies y entre ellas en la nuestra, es un proceso de amilogénesis más o menos lento que puede comenzar bien en fase de tetradas (Abreu y Dexheimer, 1.973) bien en fase de microspora ya liberada (Luck y Jordan, 1.980). Rodriguez-Garcia y Garcia (1.978) sugieren que al cargarse el grano de polen de almidón en ausencia de fotosíntesis, la síntesis de este polisacárido puede ocurrir a partir de restos de glucosa procedentes de la degradación de la pared de calosa que quedan libres en el lóculo de la antera y que pasan a la microspora antes de que empiecen a aparecer las primeras inclusiones de almidón. Esta hipótesis puede ser válida para microsporas como Olea europaea en las que el proceso de formación de almidón ocurre en estadios próximos a la degradación de calosa pero no lo es para otras especies como Cleome spinosa o Saintpaulia ionantha en las que el almidón aparece ya en tetrada (Abreu y Dexheimer, 1.973).

Los cuerpos lipídicos, comienzan a aparecer pocos y aislados en la microspora joven y aumentan continuando progresivamente hasta alcanzar su máximo en el grano maduro previo a la deshiscencia

de la antera, por lo que estos tienen que jugar como sustancias de reserva un papel muy importante una vez llegado el momento de la germinación. Merece destacar que el gran incremento de lípidos coincida con un descenso en la presencia de almidón en el grano.

El aparato de Golgi presenta durante el proceso de formación del polen unas variaciones en su grado de desarrollo y de secreción que coinciden con las fases de deposición y actividad en el crecimiento de las paredes, lo que coincide con la principal de este, es decir, relacionado con la secreción y transporte de material de paredes en las células (Dashek y Rosen, 1.966; Northcote, 1.974).

El reticulo endoplasmático comienza a hacerse visiblemente patente ya en la microspora vacuolada de Olea europaea, en donde al mismo tiempo se observa un incremento de ribosomas. El reticulo endoplasmático rugoso se va haciendo más numeroso presentándose en paquetes de cisternas paralelas entre sí. Cuando los lípidos y almidón son abundantes en el grano bicelular las cisternas se van cargando de un material más denso y se dilatan ligeramente (esquema III). Finalmente en el grano maduro estas cisternas se fragmentan dando lugar a pequeñas bolsas o sacúlos redondeados de ribosomas llenos de un material muy denso probablemente de naturaleza proteica. Estos sacúlos de retículo endoplasmático se adosan paralelamente. Cisternas de retículo endoplasmático, ribosomas, cuerpos lipídicos y pequeñas vacuolas de contenido claro se encuentran en estrecha relación física lo que nos hace pensar en una interrelación metabólica entre ellas.

En el citoplasma del grano de polen hemos intentado detectar además la presencia de cationes inorgánicos mediante la técnica del piroantimoniato potásico que es capaz de penetrar a través

de membranas y compartimentos celulares formando precipitados de sales de antimonio con los cationes inorgánicos celulares Mg^{++} , Ca^{++} y Na^{+} (Tandler y col., 1.970; Tandler y Kierszenbaum 1.971; Tandler y col., 1.973). Los precipitados originados por el piroantimoniato han sido localizados en distintos lugares del citoplasma (Kierszenbaum y col., 1.971), núcleo (Tres y col., 1.972) y regiones extrcelulares (Tandler y Kierszenbaum 1.971). En Olea europaea hemos localizado en el citoplasma cationes inorgánicos de dos tipos distintos debido a observarse dos clases de precipitado, uno de ellos más fino en el interior de las vacuolas y otro (precipitado en anillos) por todo el citoplasma, lo que nos hace pensar en una elevada cantidad de cationes en estos momentos. En el polen maduro próximo a la deshidratación de la antera no se encuentra precipitado de piroantimoniato pero si en la superficie de la pared entre las arcadas de la exina. Esto puede ser debido bien a la ausencia de cationes en esta fase, lo que no parece probable, o bien a la notable pérdida de permeabilidad en la pared del polen como ha sido demostrado por medio del lantano que impide el paso de sustancias en esta fase.

Dentro del citoplasma de la célula vegetativa del grano de polen se encuentra inmersa la célula generativa, que durante todo el proceso de maduración mantiene su tamaño aunque no su forma ya que varía siendo en principio alargada, cuando está todavía unida a la pared del grano; posteriormente se hace esférica al desprenderse de la pared y en el grano maduro toma una típica forma alargada. El escaso número de organelas de la célula generativa y la ausencia total de plastidios es una característica general de la mayoría de las especies estudiadas (Sassen, 1.964; Larson, 1.965; Hoefert, 1.969; Sanger y Jackson, 1.971 a, b).

La célula generativa cuando al final de su desarrollo presenta forma alargada tiene en su citoplasma microtúbulos en dirección

al eje longitudinal de esta. Dickinson y Sheldon (1.984) han descrito durante la haplofase masculina temprana de Lilium un sistema radial de microtúbulos que ellos sugieren juegan un papel importante en la orientación del núcleo y en el transporte de material a la superficie celular en nuestro material sin embargo, no parece probable dicho transporte, puesto que la pared de la célula vegetativa no aumenta en grosor una vez formada, tampoco parece ser que los microtúbulos intervengan en mantener la orientación de la fibrillas de celulosa ya que la delgada pared de esta célula no presenta una marcada ordenación en su estructura. Más bien parece que los microtúbulos son un verdadero citoesqueleto responsable de mantener la forma alargada de la célula generativa, que es una forma más hidrodinámica para "navegar" y así desplazarse por el citoplasma de la célula vegetativa en busca del poro germinativo por el que saldrá al germinar el tubo polinico, a la vez que el núcleo vegetativo lo hará antes que esta, adquiriendo una forma "ameboidea" que igualmente le facilita la salida por un citoplasma tan denso como lo es el del grano bicelular maduro antes de la germinación del polen.

Finalmente solo nos queda señalar que el grano maduro presenta una organización celular semejante a una semilla con un citoplasma muy rico en sustancias de reserva, especialmente de naturaleza lipídica.

	MICROSPORA JOVEN	MICROSPORA VACUOLADA	GRANO BICELULAR JOVEN	GRANO BICELULAR MEDIO	GRANO BICELULAR MADURO
TAMAÑO CELULAR Y VACUOLAS (V)					
PLASTIDIOS Y ALMIDON					
LIPIDOS					
RETICULO ENDOPLASMICO					

Núcleo
 Vacuola
 Almidón

ESQUEMA III

Evolución de estructuras citoplasmáticas durante el desarrollo del polen de *Olea europaea*.

6. DESARROLLO DE LA PARED

Las microsporas de la tetraada, inicialmente están rodeadas solo por la pared especial de calosa que ya comenzó a segregarse en las células madres del polen durante la profase meiótica. La pared de calosa ha sido descrita como una pared gelatinosa (no rígida) con propiedades físicas y fisiológicas especiales así es sintetizada rápidamente y degradada con igual facilidad (Eschrich 1.961; Eschrich, 1.964; Waterkeyn, 1.964). La calosa aísla al tejido esporágeno del tejido somático a la vez que aísla a las microsporas individualmente estableciendo entre ellas una barrera que las provee de autonomía genética. La calosa es un constituyente normal y universal de la pared especial en el estadio de tetradas. Hechos muy importantes ocurren cuando la pared de calosa está todavía presente.

En el citoplasma del meiocito de algunas especies se han observado gran cantidad de dictiosomas y vesículas de Golgi, indicando el posible papel de ellos en la producción de calosa (Heslop-Harrison 1.966). También se le ha atribuido al retículo endoplasmático un papel en la segregación de esta sustancia (Angol, 1.967). En nuestro material, no se han encontrado dictiosomas activos ni retículo endoplasmático en cantidad para suponer un origen a partir de ellos.

La pared de calosa no es uniforme sino que está formada por varios estratos de distinta densidad (Waterkeyn, 1.962; Skavarla y Larson 1.966) relacionados con distintos estadios meióticos durante los que la calosa se ha segregado sin embargo, Christensen y col., (1.972) suponen estos distintos estratos en la calosa vienen de un mal proceso de fijación. en Olea europaea durante el comienzo del periodo de tetradas la calosa está formada por

varios estratos siendo el menos denso el que está en contacto con la microspora en cuyo citoplasma encontramos gran cantidad de vesículas o áreas claras de tamaño variable y de contenido similar al estrato menos denso de la calosa que en ocasiones se encuentran fundiendo con el plasmalema. Estas vesículas o áreas claras han sido ya observadas en otros materiales, así en Helleborus foetidus (Echlin y Godwin, 1.968 a) que suponen ese material calosa. En nuestra opinión se trataría de un precursor de la calosa o precalosa que en el espacio extraplasmático por acción enzimática daría lugar a la síntesis de calosa más densa, como se visualiza en estadios posteriores de las tetradas, con los primeros depósitos de la primexina.

Durante todo el periodo de tetradas es muy frecuente la presencia en el interior de la pared de calosa de unas partículas densas de distintos tamaños y que ya han sido descritos en Hyacinthoides (Rodríguez - García, 1.978). Estas partículas en nuestra opinión llegan a la calosa procedentes del tapetum, haciéndose más grandes y patentes en los tabiques centrales enmascarados por la calosa y que originariamente separaban las cuatro microsporas de la tetrada. Estas partículas contribuirán posteriormente a la formación de la exina, ya que quedarán en libertad al degradarse la calosa.

La calosa se ha considerado altamente impermeable, a partir de los estudios realizados por Heslop-Harrison y Mackenzie (1.967) que mostraron como la timidina marcada no pasaba la pared de calosa de las células madres del polen. Existen otras pruebas a favor de la impermeabilidad de la calosa ya que durante la formación de esta pared en la microsporogénesis disminuye notablemente el paso de componentes marcados de RNA y proteínas (Taylor, 1.959; Heslop-Harrison, 1.966; Sauter, 1.967). Con la desaparición de la pared de calosa, se vuelve a incrementar la toma de estos compuestos. Por el contrario Southworth (1.970) muestra en sus estudios que la pared de calosa sólo representa una barrera para

determinadas sustancias.

Rowley y Dunbar (1.970) muestra como el hierro coloidal atraviesa la pared de calosa y se acumula en la superficie de la tetrada, con lo cual mostró por primera vez la posibilidad de un transporte de sustancias a través de la calosa. Mascarenhas (1.975) también cuestiona las pruebas a favor de la permeabilidad de la calosa, ya que según él los resultados obtenidos por Heslop-Harrison y Mackenzie (1.967) sobre la toma de timidina, se han realizado en periodos de tiempo en que la síntesis de DNA no tiene lugar en el meiocito.

La presencia de partículas densas embebidas en la calosa, como las observadas en Olea europaea y también las encontradas en Tradescantia (Horvat, 1.966) Eleocharis (Dunbar, 1.973) y Scilla non-cripta (Rodríguez-García, 1.978) son nuevos argumentos en contra de la idea de considerar a la calosa como una barrera infranqueable. Realmente parece que la permeabilidad de la pared de calosa es menor que la de una pared celulósica (Rodkiewicz, 1.970), pero esto no excluye que en determinadas condiciones haya paso de sustancias a través de la calosa, debido a que posiblemente esta tiene una estructura porosa.

La pared de calosa al degradarse produce compuestos carbonados del tipo de la glucosa que según algunos autores son utilizados para la formación de la primexina que está constituida por fibrillas de celulosa (Larson y Lewis, 1.962), sin embargo esto no parece probable ya que la calosa aún no se ha degradado. Otra opinión que está más sustentada por los acontecimientos fisiológicos es la utilización de estos restos de monosacáridos para la posterior síntesis y almacenamiento de almidón en un estadio en que la calosa ya ha desaparecido (Rodríguez-García y García, 1.978).

Alrededor de las microsporas de la tetrada posteriormente comienza a aparecer la primexina entre el plasmalema y la calosa. Tanto en Lilium Longiflorum como en Allium cepa se han observado vesículas de golgi funcionando con el plasmalema y vertiendo su contenido en la primexina (Dickinson, 1.970; Rodriguez-Garcia y col., 1983). sin embargo en Olea europea no hemos visto tal asociación primexina - golgi.

La pared de calosa parece tener un papel importante en el establecimiento de la estructura de la exina en sus primeros estadios, actuando como un molde o réplica negativa de la exina en sus primeros estadios, (Waterkeyn y Bienfait, 1.970). Esta hipótesis está apoyada por el trabajo de Ford (1.971), que muestra en Epaeridaceae como en la parte de la tetrada carente de calosa, la exina es delgada e irregular y en Pergularia daenia en donde hay total ausencia de calosa durante la microsporogénesis y la exina es delgada, fragmentaria y carente de ornamentación (Vijayaraghavan y Shukla 1977).

Las zonas de las aperturas también quedan determinadas ya que el estadio de tetradas. En los lugares de las futuras aperturas, se observan gran cantidad de cisternas de retículo endoplasmático paralelas al plasmalema impidiendo de esta forma el depósito de la primexina en esta regiones (Godwin, 1968 a, b; Heslop-Harrison, 1.971; Vasil 1.973). En nuestro material también se ha observado en las zonas de las futuras aperturas cisternas de retículo endoplasmático rugoso adosadas paralelamente al plasmalema.

Una vez constituida la primexina, aparecen al final del periodo de tetradas unos depósitos grises de material fibrilar que se disponen perpendiculares a modo de columnas dentro de la primexina que se corresponden a las probáculas o primeros depósitos de exina

procedentes del citoplasma de la microspora (Echlin y Godwin 1.969; Dickinson, 1.970; Rodríguez - García y col., 1.983).

El citoplasma de microspora de Olea europaea en estos momentos se llena de gran cantidad de pequeñas vacuolas con inclusiones en su interior y que funden con el plasmalema y cuerpos lipídicos que desaparecen rápidamente en la fase siguiente. Esto nos sugiere un aporte de lípidos y de contenido de las vacuolas por parte del citoplasma a la formación de la exina (Echlin y Godwin 1.968 b).

Coincidiendo con la degradación de la calosa, las probáculas se consolidan en báculos y se forman la capa basal, observándose como el material denso embebido dentro de la pared especial procedente del tapetum queda libre entre las báculos. Al mismo tiempo se inicia la formación de la endexina y la microspora en estos momentos expulsa al exterior restos de membranas que posteriormente se reorganizan para dar las "whithe line" (Rowley y Dunbar, 1.967; Nabli 1.976; Sengupta y Rowely, 1.974; Rowley y Dahl, 1.977).

La exina una vez consolidada estructuralmente continúa engrosando a lo largo del desarrollo de la microspora a lo que contribuye un material osmiófilo químicamente diferente al depositado antes de la degradación de la calosa denominado esporopolenina, polímero de carotenoides y ésteres de carotenoides (Shaw, 1.971) extremadamente resistente a la degradación química y biológica. La esporopolenina se forma en las células tapetales (Rowley, 1.967; Heslop-Harrison 1.962; Risueño y col., 1.969). El engrosamiento de la exina a lo largo del desarrollo también ocurre en Olea europaea (esquema IV) que ya desde el principio presenta diferentes características de tinción en sus dos partes: la endexina de elevada densidad electrónica y la ectexina más gris. Estas características en la tinción no presentan ningún cambio a lo largo del desarrollo

de esta pared (Rodríguez - García y Fernández, 1.985) indicativo de una posible alteración química de sus componentes como ha sido señalado en Gibasis (Owens y Dickinson, 1.983).

Antes del comienzo del depósito de la intina en Olea europaea hemos detectado gran cantidad de pequeñas áreas claras redondeadas que desaparecen rápidamente ya que fusionan y vierten su contenido fuera del plasmalema debajo de la exina, justo en los lugares donde inmediatamente después se depositará la intina, dando unos espacios claros debajo de la exina que en principio son grandes y esparcidos y cuando la microspora crece de volumen se hacen más delgados y continuos, llegando a rodear a toda la superficie y dando lugar a la intina.

Parece generalizado que la intina inicie su deposición antes de la primera mitosis haploide del polen (Rowley, 1.959; Mephan, 1.970; Mephan y Lane, 1.970; Mattson, 1.979) y continúe a lo largo del polen bicelular (Owens y Dickinson, 1.983). La intina del grano de polen del olivo, al igual que en otras especies, es de naturaleza pectocelulósica al dar positiva a la reacción de PAS (Pacini y Juniper, 1.979 a) y a la reacción de Thiery probada por nosotros, lo que concuerda con los resultados de otros autores (Knox y Heslop-Harrison, 1.969; Roland, 1.971) los que también indican la continuidad e identidad de la pared de la célula generativa con la intina.

Durante el desarrollo de la intina, se observa en el olivo, gran cantidad de vesículas de golgi en contacto con el plasmalema (Pacini y Juniper, 1.979 b). También se observan ribosomas y retículo endoplasmático en las cercanías del plasmalema, ya que ambos son muy abundantes por todo el citoplasma del grano de polen.

En la parte externa de la exina se observa una cubierta de material fibrilar que también ha sido detectada en Artemisia vulgaris, que se tiñe intensamente para proteínas a lo largo de la maduración del polen (Rowley y Dahl, 1.977). Pacini y Juniper, (1.979 a) en sus trabajos de Olea europaea describen un material fibrilar entre las báculas de la exina también de naturaleza proteínica que según estos autores desaparece en la madurez del grano para acumularse exclusivamente en la parte externa de las zonas aperturales. Sin embargo en las fotografías de sus trabajos, aunque no lo mencionan expresamente, se puede observar una cubierta fibrilar entre las arcadas en la parte más superficial de la capa basal o en los laterales de las báculas, idéntica a la que nosotros hemos descrito en nuestros resultados. Pensamos que esta cubierta es también de naturaleza protéica, procedente del tapetum y semejante a las Trifinas descritas en la superficie de exinas de otras especies (Dickinson y Lewis, 1.973; Heslop-Harrison y col., 1.973; Vithanage y Knox, 1.976).

Entre el material fibrilar ya descrito y la parte superficial de la exina, con tinciones normales hay una banda clara transparente a los electrones que puede pasar desapercibida y que al utilizar la técnica de Thiery para mucopolisacáridos da positiva y se hace muy patente debido a la elevada densidad del precipitado que se deposita en ella y la hace diferenciable de la capa de material fibrilar. Esta banda ha sido obviada por los autores cuando se estudian las diferentes capas de la exina debido posiblemente a su falta de identidad con tinciones normales.

Finalmente cuando la antera está madura para la dehiscencia se depositan en la superficie del polen unos glóbulos grises de aspecto lipídico que se encuentran tanto en el lóculo de la antera como embebidos en las arcadas de la exina y que evidentemente proceden de la degradación del tapetum. La naturaleza lipídica

de estos glóbulos ha sido mostrada por Pacini y Casadoro (1.981) y corresponden al "pollenkitt" (Pankow, 1.957) procedente de las células tapetales y que es de naturaleza carotenoide o lipídica en general. En cuanto a la función de este material en la pared del polen no parece probable que sea para la adherencia a los insectos (Knoll, 1.930) ya que se trata de una planta anemófila sino más bien para proteger al grano de polen de la desecación y/o los posibles efectos mutagénicos de la radiación ultravioleta sobre la célula generativa (Linskens y Kroh, 1.967) ya que el olivo es una planta de regiones secas y soleadas durante la floración (Pacini y Casadoro, 1.981).

Las aperturas de los granos de polen pueden ser consideradas modificaciones estructurales de la pared celular por donde el tubo polínico encontrará una salida en la germinación. Son numerosos los trabajos sobre la ontogénesis y localización de las aperturas en los primeros estadios de la microspora (Heslop-Harrison, 1.963; Skvarla y Larson, 1.966; Echlin y Godwin, 1.968 a,b; Mephram, 1.970). Menos atención se ha presentado a la evolución de las aperturas durante la maduración del grano de polen (Christensen y Horner, 1.974; Rowley y Dahl, 1.977), si bien algunos aspectos ultraestructurales y bioquímicos si han sido estudiados como las estructuras tubulares de la intina poral, así como la presencia de proteínas en su interior (Knox y Heslop-Harrison, 1.970; Heslop-Harrison y col., 1.973; Heslop-Harrison, 1.975; Pacini y Juniper, 1.979 a; Franchi y Pacini, 1.980). A estas proteínas de la intina poral se les ha dado un papel importante en la germinación del tubo polínico (Horner y Lernsten, 1.971).

El carácter fuertemente alergénico del olivo y de otras especies como Parietaria officinalis (Franchi y Pacini, 1.980), que también presentan estos túbulos en su intina, nos hace pensar en una posible relación entre estas estructuras tubulares, un

contenido proteico y la alergia.

El hecho de que la zona apertural evolucione durante el desarrollo del grano de polen como queda reflejado en el esquema V, posiblemente ha favorecido la confusión actualmente existente en cuanto a interpretación de los diferentes componentes estructurales que la integran (Fernández y Rodríguez-García, 1.985).

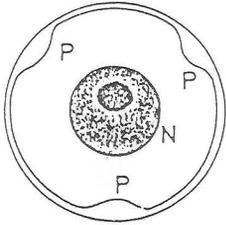
La estructura de las aperturas de Olea europaea es análoga a la del polen en Artemisa vulgaris (Rowley y Dahl, 1.977) y de Parietaria officinalis (Franchi y Pacini, 1.980). La problemática surge al utilizar los autores un mismo término para designar diferentes estructuras. Así Rowley y Dahl (1.977), llaman "oncus" al espacio en forma de lente biconvexa de la endexina. Por el contrario, otros autores, siguiendo la terminología de Hyde (1.955) llaman oncus a los engrosamientos de la intina localizados bajo la región de la apertura. Si nos atenemos a la etimología de oncus (=tumor, inflamación) la utilización de este término sería correcta en ambos casos, ya que bajo este nombre los autores se refieren a quistes o inflamaciones localizados ya en la exina o en la intina que aparecen en distintas etapas durante la ontogenia de las aperturas. Antes de proponer un nuevo término, que vendría a incrementar el número de los ya dados hasta ahora: Keimhof (=centro de germinación) (Zander, 1.935), vestibulo (Erdtman, 1.943), oncus (Hyde, 1.954; Rowley y Dahl, 1.977) y al objeto de simplificar la nomenclatura nos parece acertado seguir utilizando el término oncus pero añadiendo "de la exina" o "de la intina", según la capa donde se localice (Fernández y Rodríguez-García, 1.985).

La exina del grano de polen no es una pared inerte ni estática sino que es permeable a pequeñas moléculas como hierro coloidal, lantano, azul alciano y rojo de rutenio (Rowley y Dahl, 1.977) lo que nos indujo a localizar las posibles rutas de penetración de estas sustancias una vez consolidada totalmente la exina.

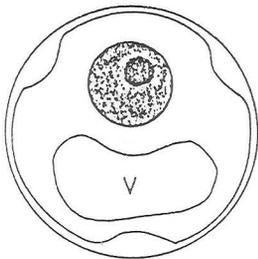
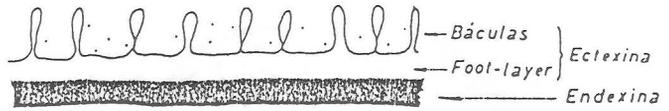
En nuestros estudios se han utilizado trazas de nitrato de lantano para observar el o los posibles lugares de paso a través de la pared del grano. El lantano ha sido poco utilizado en materiales vegetales como elemento traza. (Rowley y Flynn, 1.971; Nagahashi y col., 1.974; Robards y Robb, 1.974; Van Steveninck y col., 1.976; Wilson y Robards, 1.980), sin embargo los resultados obtenidos nos parecen optimos. Se ha detectado paso de lantano a través de la exina o a través de las aperturas germinativas según el momento fisiológico del grano de polen. Inicialmente cuando en la intina poral aún se estan formando las estructuras tubulares no hay paso evidente de lantano a través de las aperturas sin embargo, si hay un paso a través de la exina localizándose en los microcanales tanto de la capa basal como en las báculos por lo que estos microcanales parecen tener una función determinada y no deben obviarse, al ser utilizados por el grano de polen para su comunicación con el exterior.

Posteriormente cuando las tubulaciones de la intina poral han dejado de formarse y estas se desplazan hacia el ápice de la apertura por el nuevo estrato de la intina, se localizan los depósitos de lantano preferentemente en los túbulos de la intina apertural y dentro del grano, lo que indica que el paso se produce a través de la aperturas en este tiempo.

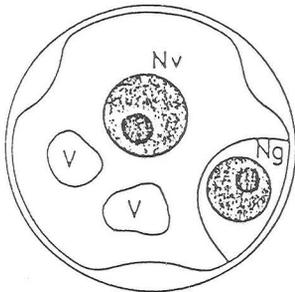
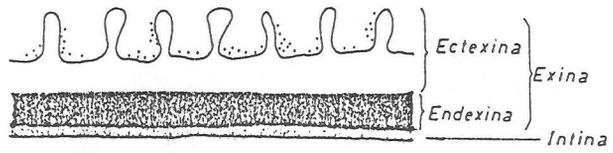
En el grano maduro, cuando las tubulaciones ya estan llenas de material denso de naturaleza proteínácea, las aperturas dejan de ser un lugar de paso de sustancias, volviendo a ser el único lugar a través de los microcanales de la exina. En estos momentos los depósitos de lantano se acumulan mayoritariamente en la intina interperatural y no en el citoplasma lo que nos indica que no hay paso de sustancias del exterior en un momento fisiológico en el que el grano de polen ya está maduro y tiene las suficientes sustancias almacenadas para la polinización y posterior germinación no necesitando tomarlas del exterior.



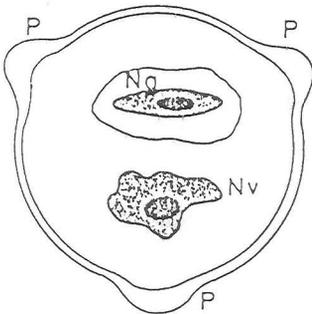
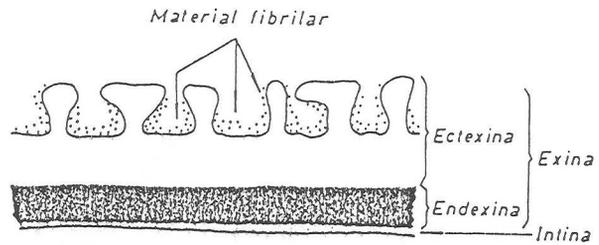
I.-Microspora joven, libre en el sáculo



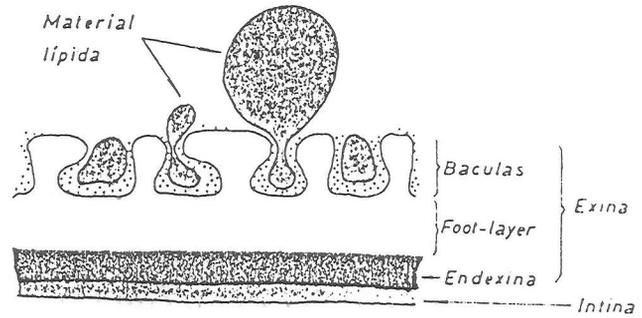
II.- Microspora vacuolada (premitosis)



III.- a) Mitosis microspora
b) Grano de polen bicelular

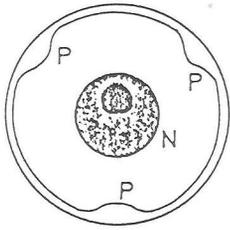


IV.- Grano de polen maduro, previo a la dehiscencia de la antera

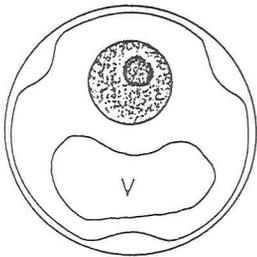
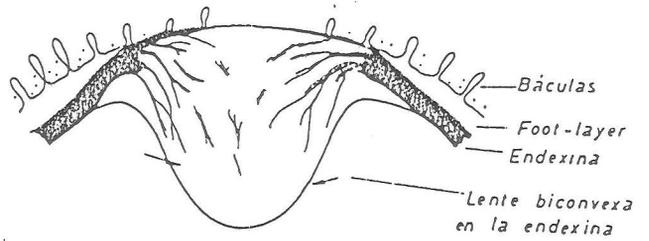


ESQUEMA IV

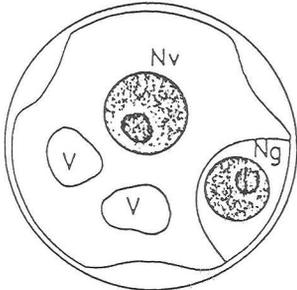
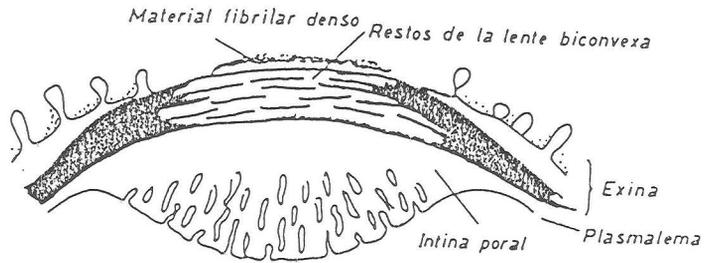
Evolución de la pared durante el desarrollo del grano de polen de *Olea europaea*



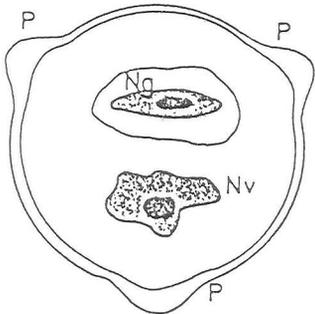
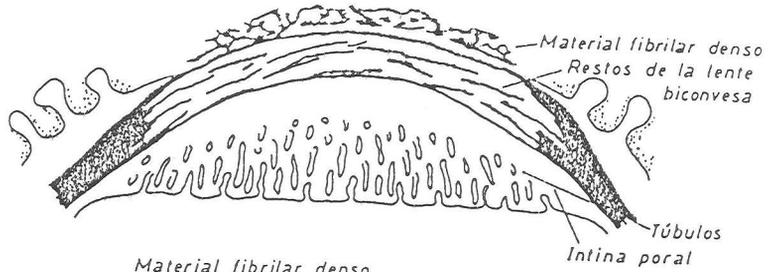
I.- Microspora joven, libre en el sáculo



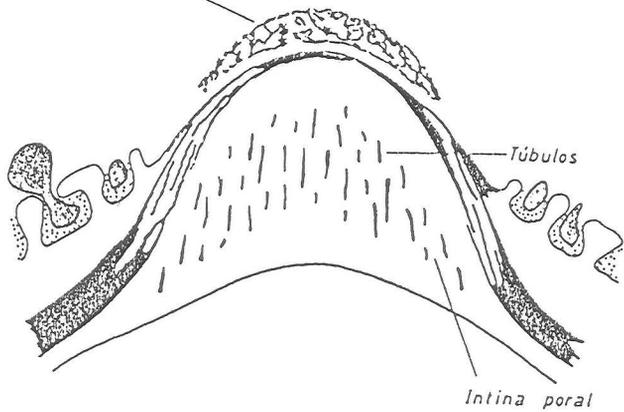
II.- Microspora vacuolada (premitosis)



III.- a) Mitosis microspora
b) Grano de polen bicelular



IV.- Grano de polen maduro, previo a la dehiscencia de la antera



ESQUEMA V

Evolución de las aperturas durante el desarrollo del grano de polen de *Olea europaea*

C O N C L U S I O N E S

1. El tiempo de formación del polen del olivo (en la variedad estudiada por nosotros) es de un mes y medio. El periodo más breve es el de la división meiótica (paso de esporofito a gametofito que suele ser de una semana; sigue el desarrollo de la microspora de unos 10 días de duración y finalmente el periodo más largo coincide con la maduración del grano de polen que abarca más de la mitad de todo el proceso.
2. El grano de polen aumenta de volumen durante todo su desarrollo, hasta llegar al grano bicelular medio en que se estabiliza. Este aumento se hace más notable en la microspora coincidiendo con la vacuolización citoplasmática de la misma, y es menos espectacular durante la formación y desarrollo de la intina.
3. La vacuolización citoplásmica de la microspora tiene como misión alcanzar en un periodo de tiempo mínimo el volumen crítico necesario para que tenga lugar la división celular, así como equilibrar el diferente reparto citoplásmico que se produce en la división asimétrica que da lugar al grano de polen.
4. Otra función de la vacuola, sería almacenar material procedente del lóculo de la antera y del tapetum que el grano utilizará más tarde al reabsorverse la vacuola, para sintetizar nuevo citoplasma fundamental y continuar su crecimiento.
5. División asimétrica, polarización celular y presencia de una gran vacuola central, son hechos constantes y estrechamente relacionados entre si, observados en células vegetales en diferentes procesos fisiológicos (gametogénesis, formación de estomas y formación de pelos radiculares).

6. La actividad nuclear viene reflejada en parte por el grado de condensación que presenta la cromatina. Durante la interfase de la microspora se observa alternativamente cromatina condensada y descondensada lo que indica una actividad nuclear fluctuante a lo largo de este periodo. En el grano de polen, la célula vegetativa presenta la cromatina semidescondensada índice de alta actividad transcripcional, mientras que en la célula generativa la cromatina no llega a descondensarse en ningún momento como consecuencia de su baja actividad.

7. Otro índice de la actividad nuclear viene reflejado por la morfología nucleolar. Durante el periodo de microspora esta actividad es inicialmente baja debido a la presencia constante de nucleolos inactivos en tetradas y que posteriormente van activandose hasta la microspora vacuolada. Sin embargo, en el grano de polen bicelular el comportamiento del nucleolo (tanto en la célula vegetativa como en la generativa) inicialmente presenta actividad que progresivamente va disminuyendo hasta hacerse mínima.

8. La presencia de nucleoloides durante el periodo de tetradas y su relación con el aumento de la población ribosómica citoplásmica durante el desarrollo de la microspora, confirma la hipótesis de la intervención de los nucleoloides como mecanismo de la microspora para restaurar la población ribosómica durante la gametogénesis en Angiospermas.

9. La presencia junto a los nucleoloides de masas fibrilares de posible origen nuclear, indica una estrecha relación entre ambas estructuras hasta ahora no conocida.

10. La reserva de almidón se inicia en la microspora joven y aumenta progresivamente hasta el grano bicelular medio donde se alcanza la máxima cantidad, para a partir de este periodo sufrir un rápido metabolismo en el polen maduro donde prácticamente desaparece.

11. Los cuerpos lipídicos y retículo endoplásmico rugoso cargado de material protéico alcanza su máximo en el grano maduro. El grano de polen maduro presenta una similitud con la semilla en cuanto a almacenamiento de sustancias de reserva necesarias para su germinación, en el caso del olivo se trata de proteínas y lípidos.

12. La exina inicia y determina su estructura definitiva en el periodo de tetradas, para consolidarse durante toda la gametogénesis hasta la dehiscencia de la antera.

13. El material de la primexina, probáculas y endexina procede del citoplasma de la microspora (gametofítico), mientras que el de la ectexina (capa basal y consolidación de las báculos) procede del exterior (esporofítico).

14. La presencia de partículas densas inmersas en la pared de calosa de la tetrada procedentes del exterior, indica que esta sustancia no es una barrera infranqueable como hasta ahora ha sido generalmente aceptado.

15. En la ectexina se localizan desde el inicio de su formación y durante todo su desarrollo unos microcanales que ponen en comunicación al grano con su exterior (como lo demuestra el paso de lantano a través de ellos).

16. Entre la parte superior de la exina y el material fibrilar que está sobre ella se observa en el polen del olivo un estrato delgado de naturaleza polisacáridica que no ha sido descrito hasta ahora, debido probablemente a que es transparente a los electrones en condiciones normales de fijación y tinción.

17. La intina inicia su formación a partir de la microspora vacuolada antes de la mitosis, para continuar progresivamente su desarrollo hasta la dehiscencia de la antera.

La intina de naturaleza pectocelulósica se puede considerar la pared celular propiamente dicha del grano y con su presencia disminuye la permeabilidad del mismo.

En la última fase de su desarrollo se ha encontrado contribución del material protéico que transporta el retículo endoplásmico hacia la intina.

18. Las regiones aperturales, sufren una evolución gradual durante el desarrollo de la pared, siendo la intina poral la parte más característica. En ella se encuentran unas tubulaciones procedentes del plasmalema que posteriormente se cargan de material denso (proteínas) y se desplazan hacia el exterior de la apertura. La aperturas inicialmente son lugar de paso de sustancias y posteriormente esta permeabilidad se pierde con el desplazamiento de los túbulos hacia el exterior de la apertura y el taponamiento de estas por nuevo material de la intina y proteínas procedentes del retículo endoplásmico.

B I B L I O G R A F I A

- ABREU, I. DEXHEIMER, J. 1973. Étude des variations présentées pendant la gamétogénese, par les organites cytoplasmiques de la cellule végétative des grains de pollen de quelques espèces d'angiospermes. Rev. gén. Bot. 80: 245 - 278
- AMICI, G. B. 1824. Observations microscopiques sur diverses espèces de plantes. Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. 2: 41 - 70, 211 - 248
- AMICI, G. B. 1830. Note sur le mode d'action du pollen sur le stigmate. Extrait d'une lettre d'Amici à Mirbel. Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. 21: 329 - 332
- ANGOLD, R.E. 1967. The ontogeny and fine structure of the pollen grain of Endymion non-scriptus. Rev. Palaeobot. Palynol. 3: 205 - 212
- BAILEY, I. W. 1960. Some useful technique in the study and interpretation of pollen morphology J. Arnold. Arbor. 41: 141 - 148
- BANERJEE, U. C., ROWLEY, J. R., ALESSIO, M. L. 1965. Exine plasticity during pollen grain maturation. J. Palynol. 1: 70 - 89
- BELIN L., ROWLEY J. R. 1971. Demonstration of birch pollen allergen from isolated pollen grains using immunofluorescence and a single radial immunodiffusion technique. Intl. Arch. Allergy. Appl. Immunol. 40: 754 - 769
- BERNHARD, W. 1969. A new staining procedure for electron microscopical cytology. J. Ultr. Res. 27: 250 - 265
- BHANDARI, N. N. 1968. Studies in the family Ranulaceae X. Embriology of Anemone L. Phytomorphology. 18: 487 - 497

- BHANDARI, N. N. 1971. Embriology of the Magnoliales and Comments on their relationships. J. Arnold. Arbor. Harv. Univ. 52: 1 - 39, 285 - 304
- BHANDARI, N. N., RISHORI, R., NATESH, S. 1976. Ontogeny cytology and histochemistry of anther tapetum in relation to pollen development in Nigella damacena. Phytomorphology. 26: 46 -59
- BIDDLE. J. A. 1979. Anther and pollen development in garden pea and cultivated lentil. Can. J. Bot. 57: 1883 - 1900
- BREWBAKER, J. L. 1967. The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the angiosperms. Am. J. Bot. 54: 1069 - 1083
- BROOKS, J., SHAW, G. 1978. Sporopollenin: A review of its chemistry, palaeochemistry, and geochemistry. Grana 17: 91 - 97
- CAMERARIUS, R. J. 1694. De sexu plantarum epistola. Tübingen
- COCHRAN, W. G., COX, G. M. 1950. Experimental Design. New York: Wiley, 2^a ed. 1957
- CRANG, R. E., MAY, G. 1974. Evidence for silicon as a prevalent elemental component in pollen wall structure. Can. J. Bot. 52: 2171 - 2174
- CURRIER, H. B. 1956. Callose substance in plant cells. American Journal of Botany. Vol. 44 pp 478 - 488
- CHRISTENSEN, J. E., HORNER, H. T., LERSTEN, N. R. 1972. Pollen wall development in Sorghum bicolor (Graminae). Am. J. Bot. 59: 43 - 58

- CHRISTENSEN, J. E., HORNER, H. T. 1974. Pollen pore development and its spatial orientation during microsporogenesis in the grass Sorghum bicolor. Am. J. Bot. 61: 604 - 623
- DAS, N. K., ALFERT, M. 1963. Silver staining of a nucleolar fraction its origin fate during the mitotic cycle. Ann. Histochem. 8: 109 - 114
- DASHEK, W. V., ROSEN, W. G. 1966. Electron microscopical localization of chemical components in the growth zone of lily pollen tubes. Protoplasma. 61: 192
- DAVIS, G. L. 1966. Systematic Embriology of the Angiosperms. John Wiley and Sons, New York.
- DERENZINI, M., LORENZONI, E. MARINOZZI, V., BARSSOTT, P. 1977. Ultrastructural cytochemistry of active chromatin in regenerating rat hepatocytes. J. Ultras. Res. 59: 250 - 262
- DICKINSON, H. G. 1970. Ultrastructural aspects of prmxime formation in the microspore tetrad of Lilium longiflorum. Cytobiol., 1: 437 - 449
- DICKINSON, H. G. 1976. The deposition of acetolysis-resistant polymers during the formation of pollen. Pollen Spores. 18: 321 - 334
- DICKINSON, H. G. 1982 The development of pollen. Rev. Cytol. Biol. Végét-Bot. 5: 5 - 19
- DICKINSON, H. G., HESLOP-HARRISON, J. 1970. The ribosome cycle, nucleoli and cytoplasmic nucleoloids in the meiocytes of Lilium. Protoplasma 69: 187 - 200

- DICKINSON, H. G., LEWIS, D. 1973. The formation of tryphine coating the pollen grains of Raphanus, and its properties relating to the self incompatibility system. Proc. Roy. Soc. London, B, 184: 149 - 165
- DICKINSON, H. G., SHELDON, J. M. 1984. A radial system of microtubulos extending between the nuclear envelope and the plasma membrane during early male haplophase in flowering plants. Planta 161: 86 - 90
- DUNBAR, A. 1973. Pollen development in the Eleocharis palustris group (Cyperaceae). I Ultrastructure and ontogeny. Bot. Not. 126: 197 - 254
- ECHLIN, P., GODWIN, H. 1968 a. The ultrastructure and ontogeny of pollen in Helleborus foetidus. L. The development of tapetum and Ubisch bodies. J. Cell Sci. 3: 161 - 174
- ECHLIN, P., GODWIN, H. 1968 b. The ultrastructure and ontogeny of pollen of Helleborus foetidus L. I.: Pollen grain development through the callose special wall stage. J. Cell Sci. 3: 175 - 186
- ECHLIN, P., GODWIN, H. 1969. The ultrastructure and ontogeny of pollen in Helleborus foetidus L. III. J. Cell Sci. 5: 459 - 474
- ESCHRICH, W. 1961. Untersuchungen über den Aufbau und den Aufbau der callose. Z. Bot. 49: 153 - 218
- ESCHRICH, W., ESCHRICH, B. 1964. Das Verhalten isolierter Callose gegenüber wässriger Lösungen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 77: 329 - 331

- ERDTMAN, G. 1943. An introduction to pollen analysis. Waltham. Mass.
- ERDTMAN, G. 1952. Pollen morphology and plant taxonomy. I. Angiosperms 2nd. Ed. Walthm. Mass. *Chronica Bottanica* pp 7 - 15
- FAEGRI, K., INVERSEN, J. 1975. Textbook of pollen analysis. 3nd edn. Hafner, New York.
- FAKAN, S., BERHARD, W. 1971. Localization of rapidly and slowly Labeled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography. *Exp. Cell Res.* 67: 129 - 141
- FERNANDEZ-FERNANDEZ, M. C., RODRIGUEZ-GARCIA, M. I. 1985. Ultraestructura y desarrollo de la pared celular del grano de polen del olivo Olea europaea: II. Zona Apertural. *An. Asoc. Palinol. Leng. Esp.* 2: 237 - 246
- FORD, J. H. 1971. Ultrastructural and chemical studies of pollen wall development in the Epacridaceae In: Brooks. J. Grant, P. R., Muir, M., Gijzel, P. van Shaw, G. (eds) *Sporopollenina*. Academic. Press. London, pp 686 - 707
- FRANCHI, G.G., PACINI, E. 1980. Wall projections in the vegetative cell of Parietaria officinalis L. pollen. *Protoplasma* 104: 67 - 74
- FRANKEL, O. 1937. The nucleolar cycle in some species of Fritillaria *Cytologia* 8: 37 - 47
- FRENSTER, J. H. 1969. En "Handbook of Molecular Cytology" Ed. A. Lima de Faria. North-Holland publ. Amsterdam. pp 251 - 276
- GALL, J. C. 1969. The genes for ribosomal RNA in oogenesis. *Genetics Supplement* 61: 121 - 132

- GAVAUDAN, P. 1948. Exchanges de matériaux figurés entre moyan et cytoplasme. Gallica. Biol. Acta. 1: 225 - 226
- GAVAUDAN, P., YU CHIN-CHEN, 1936. Centrosomes et extrusions chromatiques chez les angiospermes. Actualités Scientifique et Industrielles 319. Paris: Hermann and C^{ia}.
- GODWIN, H. 1968_a. The origin of exine New Phytol 67: 667 - 678
- GODWIN, H. 1968_b. Pollen exine formation. Nature 220: 389
- GORSKA-BRYLASS, A., CHWIROT, W., MAJEWSKA, A. 1984. Ultrastructural and metabolic transformations of the larch microspore during G₁ period of the postmeiotic interphase. Comunicación personal.
- GUIGNARD, L. 1899. Sur les anthérozoides et la double copulation sexuelle chez le végétaux angiospermes. Rev. Gén. Bot. 11: 129 - 135
- GUILLERMOND, A. 1920. Sur l'evolution du chondriome pendant la formation des grains de pollen de Lilium candidum. C.R. Acad. Sci. Paris, 170: 1003 - 1006
- HAKANSSON, A., LEVAN, A. 1942. Nucleolar conditions in Pisum. Hereditas 28: 436 - 440
- HARDIN, J.H., AND SPICER, S. S. 1970. Ultrastructure of neuronal nucleoli of rat trigeminal ganglia =comparison of routine with pyroantimonate-osmium tetroxide fixation. J. Ultrastruct. Res. 31: 16 - 36
- HARVEY, P. H., LEVINGS, C.S., WERNSMAN, E. A. 1972. The role of extrachromosomal inheritance in plant breeding. Adv. Agron 24: 127

- HESLOP-HARRISON, J. 1962. Origin of exine. *Nature* 195: 1069 - 1071
- HESLOP-HARRISON, J. 1963. An ultrastructural study of pollen wall ontogeny in *Silene pendula*. *Grana Palynol.* 4: 7 - 24
- HESLOP-HARRISON, J. 1966. Cytoplasmic connections between angiosperm meiocytes. *Ann. Bot.* 30: 221 - 230
- HESLOP-HARRISON, J. 1968 a. Wall development within the microspore tetrad of *Lilium longiflorum*. *Can. J. Bot.* 46: 1185 - 1191
- HESLOP-HARRISON, J. 1968 b. The pollen grain wall. *Science* 161: 230 - 237
- HESLOP-HARRISON, J. 1971. The cytoplasm and its organelles during meiosis. In: *Pollen: Development and physiology*, ed. by HESLOP-HARRISON Butterworth, London, pp 16 - 31
- HESLOP-HARRISON, J. 1972. Sexuality in angiosperms. In: Steward, F. C. (ed) *Plant physiology*. Vol 6C. Academic Press. New York. pp 133 - 289
- HESLOP-HARRISON, J. 1975. Physiology of the pollen-grain surface *Proc. R. Soc. London. B Biol Sci* 190: 275 - 300
- HESLOP-HARRISON, J. 1979. Aspects of the structure, cytochemistry, and germination of the pollen of rye. (*Secale cereale* L.) *Ann. Bot. Suppl* 1: 1 - 47
- HESLOP-HARRISON, J. MACKENZIE, A 1967. Autoradiography of (¹⁴C) - thymidine derivative during meiosis and microsporogenesis in *Lilium* anthers. *J. Cell Sci.* 2: 387 - 800

- HESLOP-HARRISON, J., HESLOP-HARRISON, Y., KNOX, R. B., HOWLET, B. 1973. Pollen wall protein: "Gametophytic" and "Sporophytic" fractions in pollen walls of Malvaceae Ann. Bot. 37: 402 - 412
- HOEFERT, L. L. 1969. Fine structure of sperm cell in pollen grain of Beta. Protoplasma 68: 237 - 240
- HOEFERT, L. L. 1971. Pollen grain and sperm cell ultrastructure in Beta. In: Heslop-Harrison, J. (ed) Pollen: Development and physiology. Butterworth, London. pp 68 - 69
- HOFMEISTER, W. 1849. Die Entstehung des Embryo der Phanerogamen. Leipzig
- HORNER, H. T. Jr., LERSTEN, N. R. 1971. Microsporogenesis in Citrus Limon (Rutaceae) Ann J Bot 58: 72 - 79
- HORVAT, F. 1966. Contribution á la connaissance de l'ultrastructure des parois du pollen de Tradescantia paludosa L. Protoplasma, 70: 1 - 20
- HOWLETT, B. J., KNOX, R.B. , HESLOP-HARRISON, J. 1973. Polle-wall proteins: Release of the Allergen Antigen E from intine and exine sites in the pollen grains of ragweed and Cosmos J. Cell Sci 13: 603 - 619
- HOWLETT, B. J., VITHANAGE HIMV., KNOX, R.B. 1979. Pollen antigens, allergens, and enzymes. Curr. Adv. Plant Sci. 35: 1 - 17
- HOWLETT B. J., KNOX R. B. 1983. Allergic interactions. In: Heslop-Harrison J., Linskens H.F. (eds). Cellular interactions. Encycl. Plant Physiol 14: Springer, Berlin Heidelberg New York.



- HUYNH, K.L. 1976. Arrangement of some monosulcate, disulcate, trisulcate, dicolpate and tricolpate pollen types in the tetrads, and some aspects of evolution in the angiosperms. In: Ferguson I. K. Muller J. (eds). The evolutionary significance of the exine. Academic Press. London, pp 101 - 124
- HYDE, H. A. 1955. Oncus, a new term in pollen morphology. *New Phytol* 54: 255 - 256
- JAKOB, K. M. 1972. RNA Synthesis during the DNA Synthesis period of the first cell cycle in the root meristem of germinating Vicia faba. *Exptl Cell Res.* 72: 370 - 376
- JORDAN, E. G. 1984. Nucleolar nomenclature *J Cell Sci.* 67: 217 - 220
- KIERSZENBAUM, A. L., LIBANATI, C. M., TANDLER, C. J. 1971. The distribution of inorganic cations in mouse testis. Electron microscope and microprobe analysis. *J. Cell Biol.* 48: 314 - 323
- KNOLL, F. 1930. Über Polenkitt und Bestäubungsart. *Z. Bot.* 23: 610 - 675
- KNOX, R. B., HESLOP-HARRISON, J. 1969. Cytochemical Localization of enzymes in the wall of pollen grain. *Nature* 223: 92 - 94
- KNOX, R. B., HESLOP-HARRISON, J. 1970. Pollen-wall proteins: Localization and enzymic activity. *J. Cell Sci.* 6: 1 - 27
- KONX, R. B., HESLOP-HARRISON, J. 1971. Pollen-wall proteins: Fate of intine-held antigens in compatible and incompatible Pollinations of Phalaris tuberosa L. *J. Cell Sci.* 9: 239 - 251

- KNOX R. B., HESLOP-HARRISON J., HESLOP-HARRISON Y. 1975. Pollen-wall proteins. In: Duckett J. G., Racey P A (eds). The biology of the male gamete. Biol. J. Linn soc, vol 7, Suppl. Academic Press, London, pp 177 - 187
- KNOX, R. B. 1976. Cell recognition and pattern formation in plants. In: Graham, C. F. Wareing P. F. (eds). The developmental biology of plants and animals. Saunders. Philadelphia , pp 141 - 168
- KNOX, R. B. 1979. Pollen and allergy. Studies in Biology No 107, Arnold, London
- KNOX, R. B. 1984. The pollen grain in: Embriology of Angiosperms. Johri, B. M. (ed.). Springer - Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. Tokyo. pp 197 - 271
- KOLATTUKUDY, P. E. 1980. Cutin, suberin, and waxes. In: Stumpf, P. K, Conn E.E. (eds). The biochemistry of plants. Vol 4. Stumpf P. K (ed) Lipids: Structure and function. Academic Press, New York, pp 571 - 645
- KÖLREUTER, J. C. 1761. Vorläufige Nachricht von einigen das Geschlecht der Pflanzen betrettenden Versuchen un Beobachtungen.
- KUROIWA, T. 1974. Fine structures of interphase nuclei. III. Replication site analysis of DNA during the S Period of Crepis capillaris. Exp. Cell Res. 83: 387 - 398
- KUROIWA, T., TANAKA, N. 1971. Fine structures of interphase nuclei. IV. The behaviour of late replicating chromatin during a late portion of the S period as revealed by electron microscope radioautoradiography. J. Cell Biol. 49: 939 - 942

- LARSON, D. A. 1965. Fine structural changes in the cytoplasm of germinating pollen. *Am J. Bot.* 52: 139 - 154
- LARSON, A., LEWIS, C.W. 1962. Pollen wall development in Parkinsonia aculeata Grana *Palynol* 3: 21 - 27
- LASER. K. D., LERSTEN, N. R. 1972. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. *Bot. Rev.* 38: 425 - 454
- LATTER, J. 1926. The pollen development of Lathyrus odoratus. *Ann Bot* 40: 272 - 314
- LINDEMANN, R. 1956. Vergleichende cytologische Untersuchungen an den Liliaceen Bellevalia romana, Agapanthus umbellatus und Lilium regale. *Planta* 48: 2 - 28
- LINSKENS, H.F., KROH, M. 1967. Pollen. In: W. Ruhland (ed). *Encyclopedia of plant Physiology*. 18: 506 Springer-Verlag. Berlin
- LUCK, B. T., JORDAN, E. G. 1980. The mitochondria and plastids during microsporogenesis in Hyacinthoides non-scripta (L.) Chouard. *Ann Bot.* 45: 511 - 514
- MACKENZIE, A., HESLOP-HARRISON, J., DICHINSON, H. G. 1967. Elimination of ribosomes during meiotic prophase. *Nature* 215: 997 - 999
- MAHESHWARI, P. 1949. The male gametophyte in angiosperms. *Bot. Rev.* 15: 1 - 75
- MAHESHWARI, P. 1950. An introduction to the embryology of angiosperms. Mc Graw - Hill, New York.

- MASCARENHAS, J.P. 1975. The Biochemistry of angiosperm pollen development. Bot. Rev. 41: 259 - 314
- MASCARENHAS, J. P., BELL, E. 1970. RNA synthesis during development of the male gametophyte of Tradescantia. Develop. Biol. 21: 475 - 490
- MATTSON, O. 1979. The development of dimorphic pollen in Tripogondra Commelinaceae. In: I.K. Ferguson, J. Muller (eds). The evolutionary significance of the Exine. Linnean Society Symposium series. 1: 163 - 183 Academic Press, London
- MEDINA, F. J., RODRIGUEZ-GARCIA, M. I., RISUEÑO, M. C. 1978. Behavior of the nucleolar fibrillar centres in reproducing plant cells. Electron Microscopy. Ed Struguess. J. M. Toronto Vol. II: 210 - 211
- MEDINA, F. J., RISUEÑO, M. C., RODRIGUEZ-GARCIA M. I., SANCHEZ-PINA, M. C. 1983. The nucleolar organizer (NOR) and fibrillar centres in plan cells in relation to nucleolar activity. Biol.Cell 48: 31 - 38
- MEPHAM, R. H. 1970. Development of the pollen grain wall: Further work with Tradescantia bracteata. Protoplasma 71: 39 - 54
- MEPHAM, R. H., LANE, G. R. 1970. Observations on the fine structure and developing microspores of Tradescantia bracteata. Protoplasma 70: 1 - 20
- MEZQUITA, J. 1969. Electron microscope study of the origin and development of the vacuoles in root tip cells of Lupinus albus L. J. Ultrastruct. Res 26: 242 - 250

- MITCHELL. 1969. In. "Cell division in higher plants" Ed. Yeoman, M. M. Acad. Press
- MORCILLO, G., DE LA TORRE, C. 1979. Mapping nucleologenesis in relation to transcription. *Biol. Cell* 36: 1 - 6
- MORENO DIAZ DE LA ESPINA, S., MEDINA, F. J., RISUEÑO, M. C. 1980. Correlation of nucleolar activity and nucleolar vacuolation in plant cells. *Eur. J. of cell Biol* 22: 724 - 279
- MORENO DIAZ DE LA ESPINA, S., RISUEÑO, M. C., FERNANDEZ-GOMEZ, M. E., TANDLER, C. J. 1976. Ultrastructural study of the nucleolar cycle in meristematic cells of Allium cepa. *J. Micros. Biol. Cell* 25: 265 - 278
- UHLETHALER, K. 1953. Untersuchungen über die struktur der Pollenmembran. *Mikroskopie (Wien)* 8: 103 - 112
- NABLI, M. A. 1976. Etude ultrastructurale comparée de l'exine chez quelques genres de Labiatae. In. I.K. Ferguson and J. Muller (eds): The evolutionary significance of the exine. *Linnea Soc. Symp. Ser.* N° 1: 499 - 525
- NAGAHASHI, G., TOMPSON, W. W., LEONNARD, R. T. 1974. The casparian strip as a barrier to the movement of lanthanum in corn roots. *Sci.* 183: 670
- NASH, R., PUVION, E., BERNHARD, W. 1975. Perichromatin fibrils as components of rapidly labelled extranucleolar RNA. *J. Ultra. Res.* 53: 395
- NAWASCHIN, S.G. 1898. Resultate einer Revision der Befruchtungsvorgänge bei Lilium artagon und Fritillaria tenella. *Bull acad Imp. Sci St Pertersburg* 9: 377 - 382
- NORTHCOLE, D. H. 1974. Membrane systems of plant cells. *Phil. Trans. R Soc. London. B* 268: 119

- OKSALA, T., THERMAN, E. 1977. Endomitosis in tapetal cells of Eremurus (Liliaceae). Am. J. Bot. 64: 866 - 872
- OWENS, S. J., DICKINSON, H. G. 1983. Pollen wall development in Gibasis. Ann Bot 51: 1 - 15
- PACINI, E., CRESTI, M. 1977. Viral particles in developing pollen grains of Olea europaea. Planta 137: 1 - 4
- PACINI, E., JUNIPER, B. E. 1979a. The ultrastructure of pollen grain development in the olive, Olea europaea. 1. Proteins in the pore. New Phytol. 83: 157 - 163
- PACINI, E., JUNIPER, B. E. 1979 b. The ultrastructure of pollen grain development in the olive, Olea europaea. II Secretion by The tapetal cells. New Phytol. 83: 165 - 174
- PACINI, E., CASADORO, G. 1981. Tapetum plastids of Olea europaea L. Protoplasma 106: 289 - 296
- PANKOW, H. 1957. Uber den pollenkitt bei Galauthis nivolis. Flora (Jena) 146: 240
- PERIASAMY, K. SWAMY, B. G. L. 1966. Morphology of the anther tapetum in angiosperms. Curr. Sci. 35: 427 - 430
- PUVION, E., MOYNE, G. 1981. In situ localization of RNA structures. En "the cell nucleus". Ed. H. Busch. Vol. VIII pp 59 - 109
- PY, G. 1932. Recherches cytologiques sur l'assise mourricière des microspores et les microspores des plants vasculaires. Rev. Gen. Bot. 44: 316 - 413, 450 - 462, 484 - 512

- REYNOLD, E. S. 1963. The use of lead citrate at high a pH as an electron-opaque Stain in electron microscopy. *J. Cell Biol* 17: 208 - 212
- RISUEÑO, M. C., GIMENEZ-MARTIN, G., LOPEZ-SAEZ, J. F., RODRIGUEZ-GARCIA, M. I. 1969. Origin and development of sporopollenin bodies. *Protoplasma* 67: 361 - 374
- RISUEÑO, M. C., SOGO, J. M., GIMENEZ-MARTIN, G., RODRIGUEZ-GARCIA, M. I. 1970. Vacuolation in the cytoplas of Plant Cells *Cytologia* 35: 609 - 621
- RISUEÑO, M. C., MORENO DIAZ DE LA ESPINA, S. 1979. Ultrastructural and cytochemical study of the quiescent root meristematic cell nucleus. *J Submicr. Cytol* 11(1): 85 - 98
- RISUEÑO, M. C., MEDINA, F. J., MORENO DIAZ DE LA ESPINA, S. 1982. Nucleolar fibrillas centres in plant meristematic cells: ultrastructure , cytochemistry and autoradiography. *J Cell Sci* 58: 313 - 329
- ROBARDS, A. W., ROBB, M. E. 1974. The entry of ions and molecules into roots: an investigation using electron opaque tracers. *Planta* 120, pl.
- RODKIEWICZ, B. 1970. Callose in cell walls during megasporogenesis in Angiosperms. *Planta* 93: 39 - 47
- RODRIGUEZ-GARCIA, M.I. 1978. Electronemikroskopische Untersuchungen von Tapetum und meiocyten wehrend der mikrosporogenesis bei Scilla non-scripta. *Pollen et Spore*, XX: 468 - 484

- RODRIGUEZ-GARCIA, M. I. GARCIA, A. 1978. Differentiation of the plastid population during microsporogenesis and development of the pollen grain in the Liliaceae. *Biol Cell* 33: 63 - 70
- RODRIGUEZ-GARCIA, M. I., STOCKERT, J. 1979. Localization of the pyroantimonate-osmium reaction product in plant cell nucleoli. *J. Ultrast. Res* 67: 65 - 72
- RODRIGUEZ-GARCIA, M. I., RISUEÑO, M. C., SANCHEZ-PINA, M. A. 1983. Estructura y formación de la exina en el grano de polen de Liliaceas. *Actas IV Simp. Pal. (APLE)* 141 - 148
- RODRIGUEZ-GARCIA, M. I., FERNANDEZ-FERNANDEZ, M. C. 1985. Ultraestructura y desarrollo de la pared celular del grano de polen del olivo *Olea europaea*: I. Zona interapertural. *Ann. Asoc. Palinol. Leng. Esp.* 2: 227 - 235
- ROLAND, F. 1971. Characterization and extraction of the polysaccharides of the intine and of the generative cell wall in the pollen grains of some Ranunculaceae. *Grana* 11: 101 - 106
- ROWLEY, J. R. 1959. The fine structure of the pollen wall in the Commelinaceae. *Grana Palynol* 2: 3 - 31
- ROWLEY, J. R. 1967. Fibrils, microtubules, and lamellae in grains. *Rev. Palaeobotan. Palynol.* 3: 213 - 226
- ROWLEY, J. R., DUNBAR, A. 1967. Sources of membranes for exine formation. *Bot. Tidskr.* 61: 49 - 64
- ROWLEY, J. R., DUNBAR, A. 1970. Transfer of colloidal iron from sporophyte to gametophyte. *Pollen et Spore* 12: 305 - 328

- ROWLEY, J. R., Flynn, J. J. 1971. Migration of Lanthanum through the pollen wall. *Cytobiologie*. 3: 1 - 12
- ROWLEY, J. R., DAHL, A. D. 1977. Pollen development in Artemisia vulgaris with special reference to glyco-calix material. *Pollen et Spores* 19: 169 - 284
- SANCHEZ-PINA, M. A. 1983. Estudio de las proteínas argirófilas durante el ciclo nucleolar de las células reproductoras masculinas en Liliaceas. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense. Madrid.
- SANGER, J. M., JACKSON, W. T. 1971a. I. Formation of vegetative and generative cells. *J. Cell Sci.* 8: 289 - 301
- SANGER, J. M., JACKSON, W. T. 1971b. II. Microtubules and elongation of the generative cells. *J. Cell Sci.* 8: 303 - 315
- SASSEN, M. M. 1964. Fine structure of Petunia pollen grain and pollen tube. *Acta Bot Neerl* 13: 175 - 181
- SAUTER, J. J. 1967. Histoautographische Untersuchungen zur Ribonucleinsäure-Synthese während der meiosis bei paeonia tenuifolia L. *Naturwissenschaften*. 55: 546
- SCHLEIDEN, M. J. 1837. Einige Blicke auf die Entwicklungsgeschichte des vegetabilischen Organismus bei den phanerogamen. *Arch Bwl Naturgeschichte III*. 1: 289 - 320
- SCHLEIDEN, M. J. 1845. Über Amici's letzten Beitrag zur Lehre von der Befruchtung der Pflanzen. *Flora*: 593 - 600
- SCHNARF, K. 1931. Vergleichende Embriologie der Angiospermen Bornträger. Berlin

- SCH RÖTER, K., RODRIGUEZ-GARCIA, M. I., SIEVERS, A. 1973. Die Rolle des endoplasmatischen Retikulums bei der Genese der Chara-stolithen. Protoplasma 76: 435 - 442
- SENGUPTA, S., ROWLEY, J. R. 1974. Re - exposure of tapes at high temperature and pressure in the Lycopodium cavatum spore exine. Grana 14: 143 - 151
- SHAW, G. 1971. The chemistry of sporopollenin. In: Brooks J. Grant PR. Muir M. Gijssel P. van. Shaw, G. (eds). Sporopollenin. Academic Press. London New York, pp 305 - 350
- SITTE, P. 1953. Untersuchungen zur submikroskopischem Morphologie der Pollen un Sporenmembranen. Mikroskopie 8: 290 - 299
- SKVARLA, J. J., LARSON, J. R. 1966. Fine structural studies of Zea mays, Pollen I. Cell membranes and exine ontogeny. Amer. Jour Bot. 53: 1112 - 1125
- SMYTH, D. R., SHAW, J. 1979. Cytoplasmic DNA synthesis at meiotic prophase in Lillium henryi. Aus. J. Bot. 27: 273 - 284
- SOUTHWORTH, D. 1970. Incorporation of radioactive precursors into developping pollen walls. In: Pollen development and physiology (ed. by HESLOP-HARRISON, J. London) pp. 115 - 120
- SOUTHWORTH, D. 1973. Cytochemical reactivity of pollen walls. J. Histochem. Cytochem. 21: 73 - 80
- STANLEY, R. G., LINSKENS, H. F. 1974. Pollen. Springer. Berlin Heidelberg New York.

- STEER, M. W. 1977. Differentiation of the tapetum in avena. The cell surface. *J. Cell Sci.* 25: 125 - 138
- STEFFENSEN, D. M. 1966. Synthesis of ribosomal RNA during growth and division in Lillium. *Exp. Cell Res.* 44: 1 - 12
- STOCKERT, J. C., FERNANDEZ-GOMEZ, M. E., GIMENEZ-MARTIN, G., LOPEZ-SAEZ, J. F. 1970. Organization of argiophilic nucleolar material through the division cycle of meristematic cell. *Protoplasma* 69: 265 - 278
- STRASBURGER, E. 1879. Die Angiospermen und die Gymnospermen. Jena
- STRASBURGER, E. 1884. Neue Untersuchungen über den Befruchtungsvorgang bei den Phanerogamen. Jena
- TANDLER, C. J., LIBANATI, C. M., SANCHIS, C. A. 1970. The intracellular localization of inorganic cations with potassium pyroantimonate. Electron microscope and microprobe analysis. *J. Cell Biol.* 45: 355 - 366
- TANDLER, C. J., KIERSZENBAUM, A. L. 1971. Inorganic cations in rat kidney, localization with potassium pyroantimonate-perfusion fixation. *J. Cell Biol.* 50: 830 - 839
- TANDLER, C. J., RISUEÑO, M. C., FERNANDEZ-GOMEZ, M. E. 1973. Inorganic cations in Allium cepa roots intracellular localizations. *Protoplasma* 77: 201 - 210
- TAYLOR, J. H. 1959. Autoradiographic studies of nucleic acids and proteins during meiosis in Lillium Longiflorum. *Amer. J. Bot.* 46: 477 - 484

- THIERY, J. P. 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopie* 6: 987 - 1018
- TRES, L. L., KIERSZENBAUM, A. L., TANDLER, C. J. 1972. Inorganic cations in the cell nucleus. Selective accumulation during meiotic prophase in mouse testis. *J. Cell Biol.* 53: 483 - 493
- TSINGER, V. N., PETROVSKAYA-BARANOVA, T. P. 1961. The pollen grain-wall a living physiologically active structure. *Dokl. Akad. Nauk, SSSR* 138: 466 - 469
- TOKUYASU, K., MADDEN, S. C., ZELDIS, L. 1968. Fine structural alterations of interphase nuclei of Lymphocytes stimulated to growth activity in vitro. *J. Cell Biol.* 39: 630
- VAN STEVENINCK, R. F. M., VAN STEVENINCK, M. E., CHESCOE, D. 1976. Intracellular loading of lanthan in the root tip of barley, *Hordeum vulgare*. *Protoplasma* 90: 89
- VASIL, I. K. 1973. The new biology of pollen. *Naturwissenschaften* 60: 247 - 253
- VIJAYARAGHAVAN, M. R., SHUKLA, A. K. 1977. Absence of callose around the microspore tetrad and poorly developed exine in *Pergularia daenia*. *Ann Bot* 41: 923 - 926
- VITHANAGE, H. I. M. V., KNOX, R. B. 1976. Pollen-wall proteins: Quantitative cytochemistry of the origins of intine and exine enzymes in *Brassica oleracea*. *J. Cell Sci.* 21: 423 - 435
- WATERKEYN, L. 1962. Les parois microcytaires de nature callosique chez *Helleborus* et *Tradescantia*. *Celule* 62: 225 - 255

- WATERKEYN, L. 1964. Callose microsporocytaire et callose pollinique.
In: Linskens, H. F. (ed). Pollen physiology and fertilization.
North Holland AMSTERDAM, pp 52 - 58
- WATERKEYN, L., BIENFAIT, A. 1970. On a possible function of the
callose special wall in Ipomea purpurea L. Roth. Grana
10: 13 - 20
- WILSON, A. J., ROBARDS, A. W. 1980. Observations of the pattern of se
condary wall development in the hypodermis of onion allium
cepa roots. Protoplasma 104: 149
- WILLIAMS, E., HESLOP-HARRISON, J., DICKINSON, H. G. 1973. The
activity of the nucleolus organizing region and the origin
of cytoplasmic nucleoloids in meiocytes of Lillium. Protoplasma
77: 79 - 93
- WODEHOUSE, R. P. 1935. Pollen grains. Mc Graw-Hill, New York
- ZANDER, E. 1935. Pollengestaltung und Herkunftsbestimmung bei
Blütenhönig. Berlin.

APENDICE:

TABLAS DE DATOS Y
CLAVE DE ABREVIATURAS
DE LAS FIGURAS

TETRADAS

área nuclear	área nucleolar	área celular
11.7	0.5	95.0
28.6	2.2	84.4
9.1	1.4	40.3
10.5	1.4	116.0
21.1	2.3	93.4
7.4	0.9	30.1
24.8	2.8	130.4
5.5	0.5	41.3
7.3	1.2	33.3
8.2	0.3	38.8
13.1	1.8	64.3
20.6	1.0	59.3
19.2	2.5	32.9
11.3	0.6	26.0
19.0	2.7	59.2
23.6	1.9	99.2
17.5	0.5	27.9
22.6	1.6	50.2
32.4	2.0	104.0
8.0	1.5	80.5
6.0	0.5	127.4
9.1	0.4	

MICROSPORA RECIENTE

área celular	área nuclear	área nucleolar	área vacuolar	plastidios nº	plastidios área	almidon nº	almidon área	nº de lípidos
86.8	18.0	1.5	3.5	12	1.9	0	0	0
110.5	11.4	2.3	5.4	9	0.8	0	0	0
124.1	14.5	2.1	3.1	6	2.6	0	0.2	0
111.6	15.1	1.0	8.5	0	0.9	0	0	4
125.2	31.9	3.9	5.9	4	1.0	0	0	6
68.6	15.6	0.9	3.4	2	0.4	0	0.1	4
96.2	13.7	2.9	5.0	4	1.2	0	0	4
127.9	16.5	0.9	4.0	6	4.5	2	0.2	0
121.2	13.5	2.4	3.7	8	3.3	0	0.3	0
135.6	15.3	2.6	5.0	7	3.4	0	0.2	0
119.9	21.3	2.0	7.1	10	2.8	0	0.2	0
112.3	20.4	2.2	1.6	12	5.6	0	0.2	0
91.8	21.2	1.3	4.3	4	0.3	0	0	0
82.2	19.3	1.1	2.9	13	3.8	2	0.4	0
143.4	28.9	3.2	12.6	10	4.6	0	0	0
98.1	20.4	2.8	8.2	10	0.9	0	0	0
83.8	18.1	2.0	7.7	5	2.3	1	0.2	0
80.1	25.1		7.8	5	1.4	0	0	9
70.0	32.0		11.1	7	1.1	0	0	7
93.6	42.7		4.7	5	1.5	0	0	5
112.7	27.5							
93.3	15.2							
97.0	12.0							
50.7	24.3							
	23.1							
	14.0							
	16.8							
	15.2							
	24.6							
	14.4							
	27.7							
	27.9							
	22.1							



MICROSPORA VACUOLADA

área celular	área nuclear	área nucleolar	área vacuolar	plastidios nº	plastidios área	almidón nº	almidón área	nº de lípidos
225.5	79.5	10.8	34.3	5	2.3	4	0.7	5
108.7	74.7	12.7	52.5	12	6.7	6	3.7	3
105.4	57.6	7.3	71.6	7	5.2	2	3.3	4
183.3	60.7	4.8	93.9	8	7.5	7	4.9	7
204.5	44.2	6.3	76.0	4	2.3	3	0.2	6
335.7	43.1	13.7	35.0	7	5.9	2	2.3	12
227.2	51.5	13.5	44.0	2	2.5	0	0.3	6
249.7	53.7	13.5	31.5	8	6.0	1	1.0	6
344.4	45.8	7.3	30.6	9	4.5	4	0.8	2
144.9	53.4	11.0	43.4	11	5.2	2	3.2	4
142.4	61.3	4.0	13.3	6	6.3	3	2.0	7
105.0	56.9	8.0	24.6	9	4.4	1	1.4	4
245.8	64.1	2.2	23.5	6	7.9	3	3.0	3
265.1	73.2	10.6	45.2	3	5.4	0	5.5	6
191.9	82.9	5.0	58.2	10	3.0	3	2.6	8
255.0	60.1	5.6	15.8	5	4.3	0	0.3	6
267.9	52.6	6.9	43.3	8	3.5	4	2.0	3
460.1	80.2	8.9	105.4	6	8.3	3	2.0	3
294.5	33.3	8.0	65.1	7	3.3	3	0.8	8
177.0	53.9	5.9	28.1	12	5.5	1	0.8	4
128.9	59.7	4.6						
205.8	27.9	6.7						
317.0	46.9	5.7						
277.1	49.4							
	60.4							
	47.2							
	54.4							
	47.6							

POLEN BICELULAR JOVEN

CELULA VEGETATIVA

área celular	área nuclear	área nucleolar	área vacuolar	plastidios nº	área	almidón nº	área	nº de lípidos
274.4	45.4	12.1	16.5	10	16.5	7	12.7	5
306.1	42.2	8.1	17.7	8	25.0	7	17.5	3
335.6	26.6	10.6	49.5	10	10.0	5	7.0	12
297.7	31.3	6.6	25.1	13	18.6	12	11.8	7
263.4	49.4	9.6	30.5	12	6.3	12	2.8	4
274.7	50.2	11.3	11.4	6	18.7	10	14.0	5
366.0	50.2	5.4	20.2	9	11.5	10	9.0	7
301.4	57.9	11.9	11.0	15	9.3	21	5.3	8
297.5	22.7	3.7	58.4	7	24.9	7	18.3	3
245.8	68.2	7.9	25.5	8	10.6	10	7.4	6
168.8	39.3	9.5	28.7	7	15.2	7	11.5	5
329.2	53.6	7.3	19.3	8	13.7	11	7.5	3
276.1	29.7	6.3	22.1	12	25.2	16	16.4	4
294.1	32.3	5.2	43.0	5	10.9	5	9.1	4
308.9			16.5	10	13.3	5	10.4	9
301.0			16.3	10	16.0	9	12.0	6
314.0			10.6	9	21.0	9	14.1	9
271.9			32.7	11	10.0	10	7.2	8
203.7			15.7	9	9.6	8	9.4	4
365.9			34.6	6	20.4	7	16.0	5

POLEN BICELULAR JOVEN

CELULA GENERATIVA

área celular área nuclear área nucleolar

42.8	26.7	5.1
32.4	15.0	9.6
71.2	36.7	3.6
34.4	11.2	2.9
52.5	24.9	4.9
11.8	15.3	2.7
22.2	16.8	5.8
29.9	19.7	2.2
46.2	12.7	1.4
30.2	24.8	3.2
54.4	8.2	3.6
17.7	17.4	3.0
20.0	8.7	2.3
31.6	8.9	4.4
16.5	16.2	3.4
18.0	13.6	
29.2	18,7	
33.4	14.8	
27.2	8.5	
16.8	16.5	
30.2	19.2	
29.3	10.6	

POLEN BICELULAR MEDIO

CELULA VEGETATIVA

área celular	área nuclear	área nucleolar	área vacuolar	plastidios		almidón		nº de lípidos
				nº	área	nº	área	
410.8	63.8	11.1	17.7	16	24.4	16	14.1	41
335.0	31.7	9.4	17.4	14	20.1	12	14.0	8
272.6	46.5	9.5	7.0	12	30.5	12	22.7	16
424.0	61.7	4.7	25.4	15	35.7	13	31.5	6
428.9	28.6	3.6	37.6	8	15.3	8	10.4	14
261.1	47.1	7.8	5.7	9	29.4	19	24.8	13
391.5	58.5	7.7	32.5	16	27.7	22	23.0	11
359.0	50.4	6.0	15.9	6	26.6	16	22.3	14
413.1	36.9	8.3	33.4	6	32.2	9	25.8	53
285.1	30.3	7.4	13.5	19	27.3	19	22.3	4
346.0	35.6	3.4	24.0	13	16.5	13	11.6	9
296.2	48.2	6.9	22.8	15	29.9	14	20.0	14
386.9	44.0	3.1	18.7	11	34.2	15	25.4	18
259.0	35.1	7.5	8.0	11	22.1	12	15.9	11
384.4	36.6	4.0	39.5	7	21.7	12	18.0	14
312.6	51.2		15.2	13	38.4	21	29.9	21
396.3	20.6		31.5	14	44.7	17	38.6	8
273.4			28.8	10	38.9	13	36.3	12
397.8			13.3	9	44.0	17	43.1	12
290.6			9.9	7	13.9	8	13.0	6
					12.1		10.3	
					27.8		22.5	

POLEN BICELULAR MEDIO

CELULA GENERATIVA

área celular	área nuclear	área nucleolar
48.0	18.4	2.3
40.0	13.0	2.5
49.8	16.8	1.2
40.3	20.9	1.7
27.3	17.6	1.4
22.5	14.3	0.8
36.7	17.7	1.4
32.3	16.4	2.0
39.0	21.2	1.0
31.2	11.7	
33.3	18.7	
29.7	15.7	
28.8	9.6	
23.2	11.4	
31.8	6.7	
31.6	15.9	
18.2	18.0	
28.1	11.3	
19.8	11.0	
20.1	12.3	
10.6	11.7	
10.0	6.9	

POLEN MADURO

CELULA VEGETATIVA

área celular	área nuclear	área vacuolar	plastidios		almidón		nº de lípidos
			nº	área	nº	área	
339.9	26.9	36.5	0	0	15	0	19
445.1	35.4	22.8	0	0	0	0	24
308.9	33.1	30.8	6	17.5	0	8.4	58
391.6	42.5	59.8	0	7.1	4	0	60
485.0	25.9	31.0	1	6.4	0	0.9	66
422.4	26.0	30.3	4	5.2	1	2.2	40
372.0	19.2	21.6	5	6.1	3	1.4	18
341.1	19.1	36.6	9	9.5	2	0	18
337.1	15.2	31.4	10	6.9	0	4.9	15
350.9	35.8	49.0	12	13.8	0	1.2	13
333.6	23.7	41.3	8	4.9	1	0.9	18
344.5	30.6	20.4	6	10.8	6	10.8	12
416.8	40.2	13.4	4	7.6	5	3.4	26
352.9	15.7	33.7	10	5.0	2	5.0	12
346.2	12.4	34.3	6	5.6	8	4.2	14
420.8		31.5	6	10.7	2	1.3	7
373.7		16.7	3	1.3	2	1.3	35
325.2		11.7	4	9.2	2	2.2	7
359.4		7.6		0	2	0	18
310.6		28.4		2.2		2.2	
244.2				3.3		0	

POLEN MADURO

CELULA GENERATIVA

área celular

área nuclear

13.9	7.1
15.5	7.3
16.7	9.3
32.0	16.5
19.4	11.0
27.1	14.0
40.4	19.9
43.9	22.7
62.1	29.8
14.7	6.7
14.3	6.8
43.5	19.2
31.5	12.8
29.8	18.6
27.7	11.6
25.8	14.5
27.0	17.3
23.5	10.9
18.6	11.5
10.3	6.4
20.9	6.1
11.4	14.0
13.1	11.5
23.1	

Clave de abreviaturas de las figuras

A	:::::::	Almidón
BA	:::::::	báculas de la exina
Ca	:::::::	calosa
CG	:::::::	célula generativa
cp	:::::::	cuerpo prenucleolar
CR	:::::::	cromatina condensada, cromosoma
D	:::::::	dictiosoma
ECT	:::::::	ectexina
END	:::::::	endexina
EX	:::::::	exina
In	:::::::	intina
L	:::::::	lípidos
La	:::::::	lamelas de la endexina
M	:::::::	mitocondrias
MF	:::::::	masa fibrilar
mt	:::::::	microtúbulos
N	:::::::	núcleo
ND	:::::::	nucleoloides
NG	:::::::	núcleo generativo
Nu	:::::::	nucleolo
Nv	:::::::	Núcleo vegetativo
P	:::::::	plastidio
PBA	:::::::	probáculas de la exina
PMX	:::::::	primexina
RE	:::::::	retículo endoplasmático
ri	:::::::	ribosomas
tu	:::::::	túbulos de la intina
V	:::::::	vacuolas
Vn	:::::::	vacuolas nucleolares

Las Barras en las fotografías indican 1micra. salvo indicación.

La fijación de las muestras de las figuras se ha realizado con glutaraldehído al 3% en cacodilato 0.025 M y OsO4 al 1% en cacodilato 0.025 M salvo indicación .

La tinción se realizó siempre con uranilo-plomo. En las láminas de citoquímica la fijación y tinción son las descritas en el apartado correspondiente en métodos.



Biblioteca Universitaria de Granada



01051711