

## ULTRAESTRUCTURA Y DESARROLLO DE LA PARED CELULAR DEL GRANO DE POLEN DEL OLIVO (OLEA EUROPAEA): I. ZONA INTERAPERTURAL

M. I. RODRIGUEZ-GARCIA & M. C. FERNANDEZ-FERNANDEZ

Estación Experimental del Zaidín, CSIC. Granada.

(Recibido el 31 de Octubre de 1984)

**RESUMEN.** Se hace un estudio ultraestructural de la pared del grano de polen del olivo (*Olea europaea*), relacionando su desarrollo con la evolución del grano, desde el estado de microspora joven hasta la dehiscencia de la antera. Cuando la microspora se encuentra libre en el lóculo de la antera ya está totalmente definida la exina. Durante la vacuolación de la microspora se consolida la exina estructurada por un aporte de esporopolenina. En este tiempo también se inicia la deposición de la intina. Durante la formación del grano bicelular se deposita entre las arcadas de la exina, una cubierta externa de material fibrilar densa a los electrones, procedente del tapetum, y presumiblemente de naturaleza proteica. Finalmente, cuando la antera ya está preparada para la dehiscencia, se completa la pared del grano con un material de apariencia lipídica. La presencia de este material en el lóculo de la antera coincide con la degeneración del tapetum.

**SUMMARY.** The sequential development of the wall of the pollen grain of the olive (*Olea europaea*) from young microspore stage to anther dehiscence is described. When the microspore is released from the tetrad and the callose special wall is degraded, the exine is clearly established. At the time of vacuolation of the microspore cytoplasm the exine structure is consolidated with new sporopollenin from the tapetum and this coincides with the onset of intine development. During the formation of the bicellular grain, a fibrillar electron dense coating material is found in the interbacular spaces. This coating probably has a protein nature produced from tapetum. Finally, when the anther is ready for dehiscence, the pollen grain wall is completed with a weak grey-stained dense mass which is probably lipoidal in nature, located between the exine arcade. The appearance of these lipidic globules coincides with the degeneration of tapetum cells.

### INTRODUCCION

Si bien ciertos aspectos ultraestructurales del grano de polen del olivo ya han sido previamente descritos (PACINI & CRESTI, 1977; PACINI, 1977; PACINI & JUNIPER, 1979; PACINI & CASADORO, 1981), sin embargo, la enorme importancia de esta especie tanto desde el punto de vista económico, dada la incidencia en la agricultura de nuestro país,

como desde un punto de vista sanitario, si se tiene en cuenta que se trata de una especie fuertemente alergénica, nos ha inducido a profundizar en el conocimiento del grano de polen de esta especie.

En este trabajo se hace un estudio ultraestructural de la pared del polen maduro (grano bicelular), relacionando su desarrollo con el del grano de polen, desde el estadio de microspora joven hasta la dehiscencia de la antera. Si consideramos que la pared del grano se puede dividir en zonas aperturales e interaperturales, son a éstas últimas a las que aquí nos vamos a referir.

## MATERIAL Y METODOS

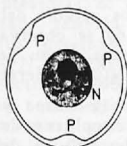
Anteras de *Olea europaea* fueron recolectadas en el mes de Junio de olivos crecidos en el jardín de la Estación Experimental del Zaidín de Granada. Las muestras fueron prefijadas durante dos horas, a temperatura ambiente, en glutaraldehído al 3% en tampón cacodilato Na 0.025 M y postfijadas en  $\text{OsO}_4$  al 1% en el mismo tampón durante dos horas. Después de lavar en tampón cacodilato, se deshidrataron en series graduales de alcohol y se incluyeron en Epón. Los cortes realizados en un ultramicrotomo REICHERT ULTRACUT III, fueron teñidos con una solución de acetato de uranilo y citrato de plomo y observados en un microscopio electrónico de transmisión ZEISS EM 10C.

## RESULTADOS

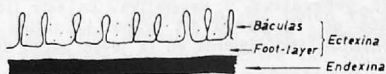
Una vez terminada la meiosis y la microspora deja de formar parte de la tetrada para ser un grano independiente, la exina o parte externa de la pared prácticamente ya está íntegramente formada en sus diferentes elementos (báculos, foot-layer y endexina), aunque posteriormente se produzcan variaciones en sus dimensiones (Fig. 1). Desde el principio, se observa una marcada diferencia de contrastes entre la ectexina y endexina, siendo ésta última mucho más densa. En la zona interapertural, endexina y capa basal, tienen aproximadamente igual espesor, mientras en las proximidades de las aperturas, la capa basal llega a desaparecer, quedando sólo la endexina y pequeños báculos. En la parte externa de la endexina, limitando con la capa basal, se puede distinguir ocasionalmente unas estructuras lamelares semejantes a las "white line" previamente descritas en la literatura (ROWLEY & DUNBAR, 1967; DICKINSON & HESLOP-HARRISON, 1968; NABLI, 1975a, 1975b, 1976; SENGUPTA & ROWLEY, 1974; ROWLEY & DAHL, 1977).

Los báculos o columelas son más gruesas en sus ápices, estrechándose en sus bases. Entre las arcadas de las columelas se aprecia un material fibrilar tenue, sin ninguna ordenación determinada (Fig. 2). En este estadio aún no se observa la intina, aunque esporádicamente se observan algunas retracciones del plasmalema con respecto a la endexina, quedando un espacio periplásmico transparente a los electrones. Este espacio es mucho más frecuente en las regiones de las aperturas.

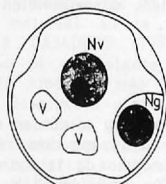
Progresivamente el citoplasma de la microspora se va vacuolando hasta formarse una o varias vacuolas grandes que desplazan lateralmente al núcleo en interfase de la microspora. En este tiempo se observa una delgada zona poco densa entre plasmalema y endexina, que corresponde a la intina (Fig. 3). Las columelas se engruesan en sus bases y algunas se pueden unir entre sí por engrosamiento de sus ápices



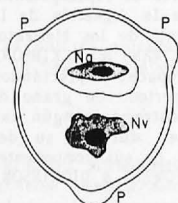
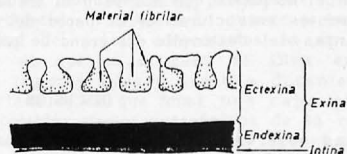
I- Microspora joven, libre en el sáculo



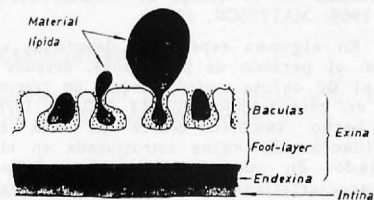
II- Microspora vacuolada (premitosis)



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



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



Esquema de la pared celular durante el desarrollo del grano de polen

(Figs. 3 y 5). El material fibrilar anteriormente observado, se condensa en la base de las arcadas, formando una cubierta de la capa basal de la exina (Figs. 3, 4 y 5). Continuando con el desarrollo de la microspora, una vez que el núcleo alcanza una posición lateral se inicia la mitosis de la microspora y se forman las dos células del grano de polen: generativa y vegetativa. En este tiempo no se observan grandes cambios en la pared del grano. La intina progresa en su desarrollo y se continúa inicialmente en la joven pared de la célula generativa.

Más tarde, esta pared se independiza de la intina y la célula generativa queda totalmente inmersa dentro del citoplasma de la célula vegetativa. Este período de tiempo en que las dos células del grano se diferencian entre sí, es relativamente largo, considerando el desarrollo global del grano de polen. Sin embargo en este tiempo no se observan nuevos elementos estructurales en la pared del grano (excepto en la región de las aperturas). Solamente se aprecia un aumento del material de la ectexina (esporopolenina) y el material fibrilar que en estadios anteriores se observa en la base de las arcadas de la exina, se extiende hacia las columelas, llegando a formar una cubierta de la ectexina, salvo en la parte externa de la misma (Fig. 5). La ectexina aumenta considerablemente en sus dimensiones, especialmente la capa basal en relación con la endexina, cuyo espesor se hace mucho menor. Finalmente, cuando la antera está cerca de la dehiscencia (color amarillo), se observa gran cantidad de gotas lipídicas en el lóculo de la antera que se depositan entre las arcadas de la exina (Figs. 6 y 7).

En el esquema que acompaña al trabajo se resume la formación de las diferentes estructuras de la pared del polen, correspondiéndose con las distintas del desarrollo del grano de polen.

#### DISCUSION

Las observaciones presentadas en este trabajo coinciden en líneas generales con las anteriormente descritas en otras especies. Se puede establecer como característica general que el modelo de la exina queda determinado en el tiempo de tetradas (ROWLEY, 1959; MEPHAM & LANE, 1968, 1969; MATTSSON, 1976).

En algunas especies se detecta un aporte de esporopolenina tapetal, en el período de posttetradas, después de la digestión de la pared especial de calosa, produciéndose un crecimiento de los elementos de la exina en este tiempo (ROWLEY & DAHL, 1977; OWENS & DICKINSON, 1983). Este hecho también ocurre en *Olea europaea*, apreciándose una consolidación de exina estructurada en el período de grano de polen vacuolado. En nuestras observaciones no encontramos ningún cambio en las características de tinción de la exina, durante su desarrollo indicativo de una posible alteración química de sus componentes, como ha sido señalado en *Gibasis* (Commelinaceae) (OWENS & DICKINSON, 1983).

También parece generalizado en otras especies el que la intina inicie su deposición antes de la primera mitosis haploide del polen (ROWLEY, 1959; MEPHAM, 1970; MEPHAM & LANE, 1970; MATTSSON, 1976) y continúa a lo largo del estadio de polen bicelular (OWENS & DICKINSON, 1983). La intina del grano del olivo, al igual que en otras especies, es de naturaleza pectocelulósica al dar positiva la reacción de PAS (PACINI & JUNIPER, 1979). Nosotros no hemos encontrado microtúbulos ni ningún otro orgánulo directamente relacionado con la deposición de la intina. 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.

La presencia de una cubierta fibrilar de la superficie externa ha sido detectada también en *Artemisia vulgaris*, la cual se tiñe intensamente para proteínas a lo largo de la maduración del polen (ROWLEY & DAHL, 1977). PACINI & JUNIPER (1979) describen en *Olea europaea* un material fibrilar, también de naturaleza proteínica, entre las columnas de la exina, que según los autores desaparece en la madurez del grano para acumularse exclusivamente en las regiones aperturales. Sin embargo, en las fotografías de su trabajo, aunque ellos no lo mencionen expresamente, se puede apreciar una cubierta fibrilar entre las arcadas, bien en la parte externa de la capa basal de la exina o bien en los laterales de los báculos idéntica a la que nosotros hemos descrito previamente en nuestros resultados. Pensamos que esta cubierta también es de naturaleza proteínica, procedente del tapetum y se puede analogar con las trifinas descritas en la superficie de exinas de otras especies (DICKINSON & LEWIS, 1973; HESLOP-HARRISON & col., 1973; VITHANAGE & KNOX, 1976).

Finalmente, cuando la antera está madura para la dehiscencia, los glóbulos grises de aspecto lipídico, que se encuentran tanto en el lóculo de la antera como embebidos dentro de las arcadas de la exina, evidentemente son de origen tapetal. La naturaleza lipídica de estos glóbulos ha sido mostrada por PACINI & CASADORO (1981) y corresponde al "pollen-kitt" en el sentido de PANKOW (1957), procedente de células tapetales y compuestos de carotenoides y lípidos. En cuanto a la función de este material en la pared del polen, compartimos la opinión de PACINI & CASADORO (1981), de que en el caso de *Olea europaea*, tratándose de una planta de regiones secas y soleadas durante la floración, la hipótesis más acertada es de que forma una capa para prevenir la desecación y/o los posibles efectos mutagénicos de la radiación UV sobre la célula generativa (LINSKENS & KROH, 1967). Por el contrario no es probable que estas sustancias sirvan para que los granos de polen se adhieran a los insectos (KNOLL, 1930), ya que se trata de una especie que se poliniza por el aire.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer a D<sup>a</sup> Matilde Garrido y D. Manuel Martínez su valiosa colaboración técnica y de delineación.

#### BIBLIOGRAFIA

- DICKINSON, H. G. & J. HESLOP-HARRISON (1968). Common mode of de position for the sporopollenin of sexine and nexine. *Nature* (Lond.) 220:926 - 927.
- \_\_\_\_\_ & D. LEWIS (1973). Cytochemical and ultrastructural differences between intraspecific compatible and incompatible pollinations in *Raphanus*. *Proc. R. Soc. B.* 183.
- HESLOP-HARRISON, J., Y. HESLOP-HARRISON, B. R. KNOX & B. HOWLETT (1973). Pollen wall proteins: gametophytic and sporophytic fractions in the pollen walls of the Malvaceae. *Ann. Bot.* 37:403 - 412.
- KNOLL, K. (1930). Über Pollenkitt und Bestäubungsart. *Z. Bot.* 23:609 - 675.

- LINSKENS, H. F. & M. KROH (1967). Pollen. In: W. RUHLEND (ed.). *Encyclopedia of Plant Physiology* 18:506. Springer-Verlag, Berlin.
- MATTSON, O. (1979). The development of dimorphic pollen in *Triopogondra* (Commelinaceae). In: I. K. FERGUSON & J. MULLER (eds.). *The Evolutionary significance of the Exine*. Linnean Society Symposium Series 1:163 - 183. Academic Press, London.
- MEPHAM, R. H. (1970). Development of the pollen grain wall: further work with *Tradescantia bracteata*. *Protoplasma* 71:39 - 54.
- \_\_\_\_\_ & G. R. LANE (1968). Exine and the role of the tapetum in pollen development. *Nature* (Lond.) 219:961 - 962.
- \_\_\_\_\_ (1969). Role of the tapetum in the development of *Tradescantia* pollen. *Ibid.* 221:282 - 284.
- \_\_\_\_\_ (1970). Observations on the fine structure of developing microspores of *Tradescantia bracteata*. *Protoplasma* 70:1 - 20.
- NABLI, M. A. (1975a). Mise en évidence de deux lamelles primordiales, ectexinique et endexinique, dans l'exine de quelques Labiatae. *C. R. Acad. Sc. (Paris) serie D.* 281:251 - 253.
- \_\_\_\_\_ (1975b). Contribution a l'étude ultrastructurale et ontogénique de l'exine de quelques genres de Labiatae. Thesis Centre Universitaire de Marseille-Luminy C.N.R.S. A.O. 11. 647.
- \_\_\_\_\_ (1976). Etude ultrastructurale comparée de l'exine chez quelques genres de Labiatae. In: I. K. FERGUSON & MULLER (eds.). *The Evolutionary Significance of the Exine*. Linnean Society Symposium Series 1:499 - 525.
- OWENS, S. J. & H. G. DICKINSON (1983). Pollen wall development in *Gibasis*. *Ann. Bot.* 51:1 - 15.
- PANKOW, H. (1957). Über den Pollenkitt bei *Galanthis nivalis*. *Flora (Jena)* 146:240.
- PACINI, E. (1977). Vacuolization and amylogenesis during *Lycopericum peruvianum* and *Olea europea* pollen development. *Caryologia* 30(4).
- \_\_\_\_\_ & M. CRESTI (1977). Viral particles in developing pollen grains of *Olea europea*. *Planta* 137:1 - 4.
- \_\_\_\_\_ & B. E. JUNIPER (1979). The ultrastructure of pollen grain in the olive (*Olea europaea*). 1. Proteins in the pore. *New Phytol.* 83:157 - 163.
- \_\_\_\_\_ & G. CASADORO (1981). Tapetum plastids of *Olea europaea* L. *Protoplasma* 106:289 - 296.
- ROWLEY, J. R. (1959). The fine structure of the pollen wall in Comelinaceae. *Grana Palynol.* 2:3 - 30.
- \_\_\_\_\_ & A. DUNBAR (1967). Sources of membranes for exine formation. *Sven. Bot. Tidskr.* 61:49 - 64.
- \_\_\_\_\_ & A. O. DAHL (1977). Pollen development in *Artemisia*. *Pollen et Spores* 11:169 - 180.
- SENGUPTA, S. & J. R. ROWLEY (1974). Re-exposure of tapes at high temperature and pressure in the *Lycopodium clavatum* spore exine. *Grana* 14:143 - 151.
- VITHANAGE, H. I. M. V. & R. S. KWOK (1976). Pollen-wall proteins: quantitative cytochemistry of the origins of intine and exine enzymes in *Brassica oleracea*. *Jour. Cell Sci.* 21:424.

## EXPLICACION DE LAS FIGURAS

FIGURA 1.- Pared de joven microspora recién liberada de la tetrada. La exina ya está completa con sus tres partes: báculos o columelas (b); foot-layer o capa basal (c) y endexina (en). La endexina presenta un mayor contraste que el resto de la exina. (x 20.790).

FIGURA 2.- Citoplasma de joven microspora con retracciones del plasmalema con respecto a la endexina (\*). Entre las arcadas de las columnas se observa un material fibrilar sin ninguna ordenación determinada (flechas). (x 16.000).

FIGURA 3.- Joven microspora vacuolada (v) con el núcleo (N) desplazado lateralmente. Entre el plasmalema y la endexina se encuentra una delgada zona, poco densa y uniforme en toda la superficie del grano, excepto en la región de las aperturas, en donde es más grande, y que corresponde a la intina (in) o pared interna del grano. (x 7.600).

FIGURA 4.- Pared de microspora vacuolada. En la endexina, en el límite con la capa basal, se pueden distinguir estructuras lamelares, con una zona central más clara (flechas). Una fina capa de material fibrilar (mf) entre las arcadas cubre a la capa basal. Cisternas de retículo endoplásmico rugoso (RE), se encuentran paralelas y próximas a la superficie del grano. (x 32.000).

FIGURA 5.- Pared de grano de polen bicelular joven. Las columnas llegan a fundir entre sí por engrosamiento de sus cabezas o ápices. La capa de material fibrilar condensado en la base de las arcadas de la exina, se extiende hacia las columnas, formando una cubierta de la ectexina, salvo en la superficie externa de la misma. La intina sigue una delgada pared con respecto a la exina. (x 16.400).

FIGURAS 6 Y 7.- Grano de polen bicelular maduro. La pared celular ya está terminada. La intina ha engrosado con respecto a estadios anteriores. las arcadas de la exina se encuentran rellenas con un material gris osmíófilo (O). En determinados sitios (flechas) se encuentra la procedencia externa al grano de este material, por deposición en la superficie del polen de gotas de aspecto lipídico, procedentes del lóculo de la antera. (x 3.750 y x 17.000).



