

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA PARED DEL POLEN DEL ARGÁN (*ARGANIA SPINOSA* L.)

M'rani-Alaoui, M.; Alché, J.D. & Rodríguez-García, M.I.*

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas,
Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda, 1,
18008 - Granada, España.

(Manuscrito recibido el 12 de Diciembre de 2002, aceptado el 13 de Mayo de 2003)

RESUMEN: El argán (*Argania spinosa* L.; Fam. Sapotaceae) es una especie endémica de Marruecos en peligro de extinción. La estructura del polen de esta especie no ha sido previamente caracterizada. La pared del polen maduro del argán presenta una exina bien desarrollada y una estructura bien definida: tectum continuo de tipo rugulado-estriado, columelas cortas y una capa basal en la que no se observan "white lines". La endexina está bien diferenciada de la ectexina, debido a su mayor densidad electrónica. Finalmente la intina está representada por una capa delgada excepto en las cinco regiones aperturales donde se engruesa. Se trata de un polen pentacolporado. Las características de esta pared así como el elevado número de aperturas indican que este polen está preparado para sufrir agresiones climáticas debido a la aridez de la zona donde se localiza este árbol.
PALABRAS CLAVE: Argán, polen, pared, exina, aperturas.

SUMMARY: The argan (*Argania spinosa* L.; Fam. Sapotaceae) is a Moroccan endemic species in danger of extinction. The structure of the pollen grain of this species has not been previously characterized. The mature pollen wall shows a well developed and structured exine: rugulate-striate ornamentation, continuous tectum, short columellae and a foot layer apparently lacking white lines. The endexine is well differentiated from the ectexine, with a higher electron density. Finally, the intine appears as a thin layer except in the aperture regions where it appears thickened. The pollen of argan is 5-colporate. The characteristics of this pollen wall and the high number of apertures may be interpreted as adaptations to the dry and arid climate present in the areas where it grows.
KEY WORDS: Argan, pollen, wall, exine, apertures.

INTRODUCCIÓN

El argán (*Argania spinosa* L.) es un árbol leñoso y endémico de Marruecos de la familia *Sapotaceae*. Se desarrolla a lo largo del suroeste, entre el norte de Safi y el sur de Sidi Ifni (BAEHNI, 1948; EHRIG, 1974; PRENDERGAST & WALKER, 1992). Este árbol, en peligro de extinción, ha despertado el interés de los investigadores debido a sus propiedades

farmacológicas y sus múltiples e interesantes aplicaciones tanto en alimentación como en ganadería y cosmética (MORTON & VOSS, 1987).

Es un árbol monoico, en el que las flores se desarrollan solas o agrupadas en inflorescencia (FERRADOUS *et al.*, 1996). Las flores son pequeñas y hermafroditas (BAEHNI, 1948; SAUVAGE & VINDIT, 1952; BIONDI, 1981).

El ciclo de vida de las plantas con flores alterna entre una generación esporofítica diploide y una generación gametofítica haploide. El grano de polen tiene un papel fundamental en la reproducción de las plantas superiores. Constituye la expresión de la fase gametofítica masculina y contiene los gametos masculinos o sus células progenitoras. Esta estructura es uno de los sistemas celulares aislados más simples que se conocen.

La diversidad en forma y estructura del grano de polen en las diferentes especies sugiere que los diferentes tipos de granos han surgido a partir de un extraordinario proceso de adaptación a muy diferentes factores que incluyen el medio ambiente, la interacción por otros individuos y el modo de dispersión por el agua, viento o por otros animales (KNOX, 1984; HORMAZA & HERRERO, 1995).

Los trabajos existentes en el argán se han centrado en el establecimiento de diferencias entre cultivares y análisis genéticos (MSANDA *et al.*, 1994; EL MOUSADIK & PETIT, 1996; ZAHIDI *et al.*, 1996; FERRADOUS *et al.*, 1997). Sin embargo no existen estudios sobre la biología reproductiva del argán, que analicen cuestiones como la polinización, fecundación y los posibles mecanismos de compatibilidad e incompatibilidad. En este trabajo estudiamos la morfología de la pared del polen de esta especie y la comparamos con otros pólenes de especies similares.

MATERIAL Y MÉTODOS

La recogida de la flor del argán se ha hecho de árboles localizados en la región de Ait Melloul, que se encuentra en la planicie Souss, en el sur de las montañas del gran Atlas (Marruecos).

Las anteras del argán fueron procesadas para microscopía óptica y electrónica de transmisión siguiendo las técnicas convencionales: prefijación durante dos horas a 4 °C en paraformaldehído 4 % y glutaraldehído 2 % en tampón cacodilato 0.1M, pH 7.2 y postfijación con OsO₄ 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 la resina Epon. Se prepararon cortes semifinos de aprox. 1 mm de grosor que fueron teñidos con azul de toluidina. Los cortes ultrafinos (aprox. 70 nm) realizados en un ultramicrotomo REICHERT ULTRACUT, fueron contrastados con una solución de acetato de uranilo y citrato de plomo y observados en un microscopio ZEISS EM 10 C. Las anteras y granos de polen también fueron procesados para su observación a microscopía electrónica de barrido previa metalización de los mismos con una película de oro-paladio en alto vacío.

RESULTADOS

Las flores del argán se desarrollan directamente en las axilas de las hojas por lo que se trata de flores sésiles y axilares y se encuentran agrupadas en número de 5 a 15 flores. Se observa que el desarrollo de las flores no es sincrónico, ya que su tamaño es variable (Fig. 1a). Cuando el botón floral se abre, se aprecian 5 estambres constituidos por un filamento largo y las anteras en su ápice (Fig. 1b). A mayor aumento se puede apreciar que la antera está constituida por dos tecas (Fig. 1c). Después de la fertilización se caen los pétalos y se engruesa el ovario (Fig. 1 d), para finalmente llegar a ser un fruto si la fecundación llega a buen término.

Las observaciones del grano de polen al microscopio electrónico de barrido nos

muestran un polen prolado de pequeñas dimensiones (el eje polar mide 25 mm mientras que el diámetro ecuatorial mide 15 mm). Las aperturas son colpo-poradas, con colpos perforados en el centro por donde germina el tubo polínico (Fig. 2 a). La exina es de tipo regulada-estriada (Fig. 2b).

En cortes semifinos de la antera del argán, se puede apreciar que el polen maduro tiene cinco aperturas (Fig. 3a), por lo que se trata de un polen penta-colpo-porado.

Al microscopio electrónico de transmisión se observan claras diferencias entre la zona apertural y el resto de la pared (zona no

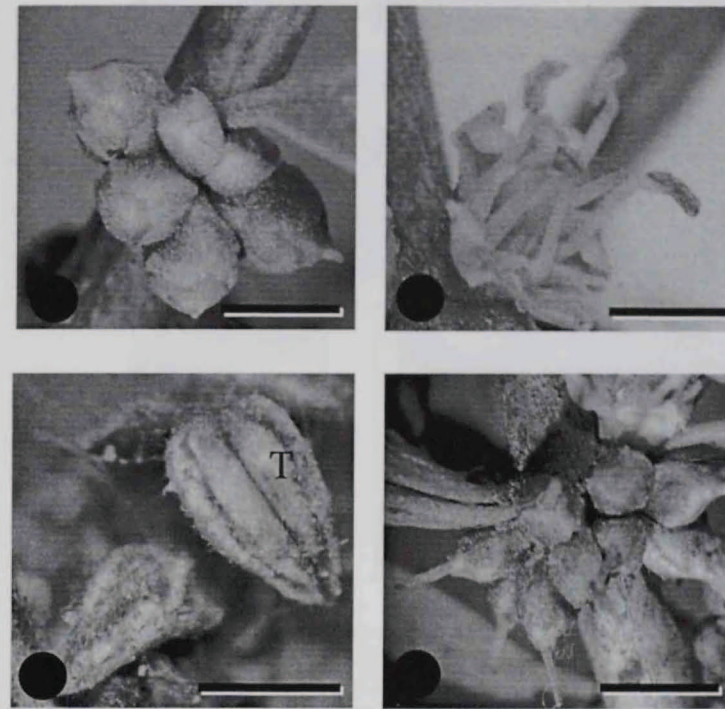


FIGURA 1. Inflorescencias florales del argán en diferentes estadios de su desarrollo; a, botones florales jóvenes sésiles y axilares y agrupados en glomérulo; b, botón floral abierto; c, anteras; teca de la antera (T); barras representa 1 mm, pistilo después de la fecundación. La barra representa 0.5 mm.

apertural) (Fig.3b). La pared interapertural está bien estructurada y muy desarrollada en sus diferentes partes, con unas dimensiones alrededor de 1mm de espesor (Fig. 3c). Se trata de una exina en la que la parte externa o ectexina está constituida por un techo o tectum continuo, de unos 360 nm de grosor, soportado por columelas cortas (160 nm) y delgadas, por lo que el espacio entre columelas (arcadas) es largo y estrecho. La capa basal tiene un espesor similar al tectum

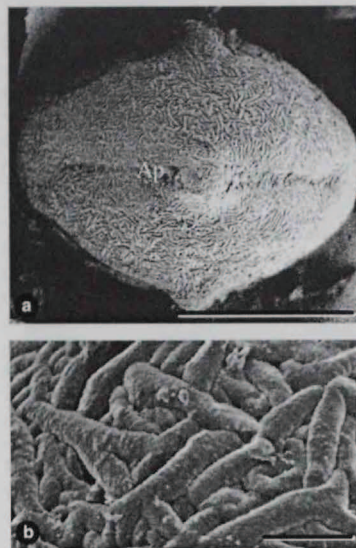


FIGURA 2. Polen del argán visto al microscopio electrónico de barrido. a, Vista general del polen en el que se observa una apertura colpo-porada (Ap). La barra representa 10 μm.; b, detalle de la exina del polen del argán en donde se aprecia una estructura de tipo rugulada-estriada. La barra representa 0,5 mm.

(260 nm). El tectum aparentemente no presenta microcanales. La endexina, de un espesor casi igual a la parte basal (290 nm), se distingue muy bien por su elevada densidad a los electrones con respecto a la ectexina. Finalmente la intina es una capa delgada (140 nm), de material translúcido a los electrones como corresponde a su naturaleza pecto-celulósica. Un esquema de la pared se muestra en la figura 3e.

La región apertural al microscopio electrónico de transmisión, en un corte que alcanza los colpos pasando por el poro germinativo, muestra un engrosamiento de la intina (hasta 1,5 μm) cubierta por una exina desorganizada (Fig. 3d). La presencia de tubulaciones características de la intina apertural es escasa. A ambos lados de las aperturas la endexina se ensancha en su espesor hasta 1,26 μm. La figura 3f esquematiza la estructura de la apertura en el polen del argán.

DISCUSIÓN

En angiospermas, la pared del polen tiene un papel importante en la protección del gametofito masculino durante el periodo de su dispersión desde la antera hasta su llegada al estigma. La pared tiene que ser muy resistente para evitar las agresiones climáticas y mecánicas que pueden alcanzar al polen durante su trayectoria. La exina es la parte externa de la pared del polen que le confiere esa resistencia, gracias a su composición mayoritaria de esporopolenina, un material muy resistente a la acetólisis (STANLEY & LINSKENS, 1974; KNOX, 1984; SHIVANNA & JOHRI, 1985). La exina puede llegar a tener un alto grado de estructuración en la que se distinguen tectum, columelas y capa basal, que constituyen la ectexina y una

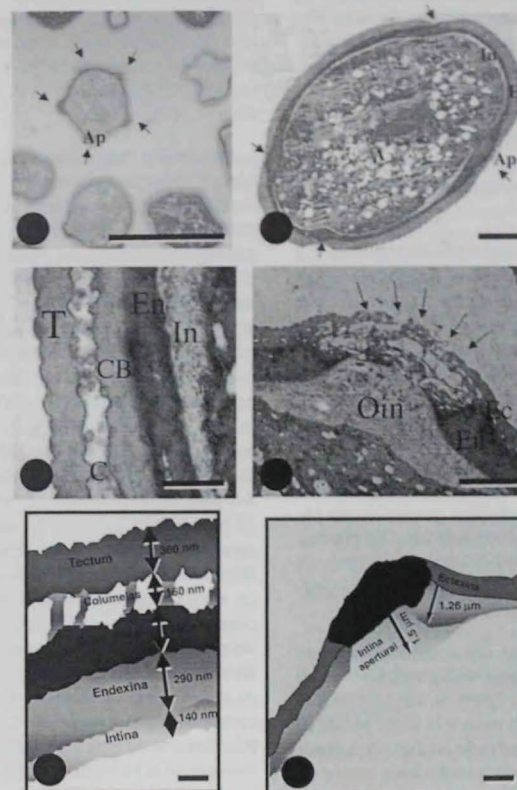


FIGURA 3. Secciones del polen de argán observadas al microscopio óptico (MO) y microscopio electrónico de transmisión (MET). a, Corte meridional del polen observado al MO, en el que se ven las cinco aperturas (flechas). La barra representa 50 μm. b, Sección transversal del polen al MET: exina (Ex); intina (In); apertura (Ap); almidón (A); la barra representa 10 μm. c, Pared inter apertural del polen en donde se distinguen las diferentes estructuras: tectum (T); columela (C); capa basal (CB); endexina (En) intina (In); la barra representa 0,5 mm. d, Sección meridional de una apertura en la pared del polen: oncus o engrosamiento de la intina (Oin); endexina (En); ectexina (Ec); material de la exina con estructura desorganizada (flechas); la barra representa 1 mm. e, Esquema de la estructura de la pared del polen del argán. La barra representa 0,6 mm; f, Esquema de la estructura de la apertura en el polen del argán; la barra representa 1 mm.

capa más interna o endexina (ROWLEY, 1981; 1990). Sin embargo, algunos de estos elementos pueden estar ausentes o quedar reducidos a su mínima expresión, dependiendo de las especies. En zonas muy áridas con un medio ambiente inhóspito (agresivo), el polen tiene que protegerse de la sequía; ésto se consigue mediante una exina gruesa y bien desarrollada en todas sus partes, como es el caso del argán.

El polen de argán (*Argania spinosa* L.) presenta características morfológicas, en cuando la forma del grano y la estructura de la exina, semejantes a las del polen de *Apium nodiflorum* (MOORE et al., 1991). Los dos tipos de pólenes son prolados y tienen una exina rugulada-estriada.

La intina o capa más interna de la pared del polen es de naturaleza pecto-celulósica (HESLOP-HARRISON, 1987) y es la que tiene la función y características propias de una pared celular de células vegetales. En el polen de argán, la intina es una capa delgada en relación con la exina, como ocurre en la mayoría de los pólenes de otras especies.

Las aperturas son consideradas como zonas especializadas de la pared. En el polen maduro, la intina apertural adquiere un mayor grosor que el resto y la exina pierde su estructura, quedando reducida a unos engrosamientos de la endexina a ambos lados de la apertura y cubierta por material desorganizado de la exina como es el caso del polen del argán. Fisiológicamente las aperturas son la zona de la pared por donde germina, emerge y crece el tubo polínico. Estas zonas también se han considerado como áreas para transferir nutrientes, iones y microelementos durante el crecimiento y la maduración del polen (ROWLEY & SKVARLA, 1976). Efectivamente hay evidencias de que

durante la etapa de maduración del polen dentro de la antera, la región apertural es una ruta de paso desde el exterior hacia el interior del polen (FERNÁNDEZ & RODRÍGUEZ-GARCÍA, 1990; CARRETERO & RODRÍGUEZ-GARCÍA, 1995).

Existen pólenes inaperturados, en los que la exina aparentemente no presenta modificaciones. Sin embargo, la germinación del tubo polínico tiene lugar en este tipo de pólenes, lo que nos indica que la estructura esencial de la apertura está localizada en la intina. Ésta se revela como un engrosamiento, generalmente conocido como "oncus", y en el que se pueden apreciar tres capas, diferenciadas estructural, química y funcionalmente (HESLOP-HARRISON, 1987) y en donde se encuentran unas tubulaciones en mayor o menor número (DUMAS et al., 1984; HESLOP-HARRISON et al., 1984), cargadas de proteínas gametofíticas (PACINI & JUNIPER 1979). Se ha sugerido que estas proteínas se liberan durante el periodo inicial de la hidratación (HESLOP-HARRISON et al., 1984) y que se trata de enzimas que facilitan la germinación (HESLOP-HARRISON et al., 1986). Las aperturas del polen de argán responden al esquema general que se acaba de describir. La presencia de tubulaciones es escasa, pero éstas están cargadas de un material electrodenso que posiblemente se trata de proteínas. Otra función que se le ha atribuido a las zonas aperturales es la de regular los cambios de forma y volumen del grano en relación al grado de hidratación. Este proceso es lo que se conoce como harmomegata y que fue descrito por primera vez por WODEHOUSE (1935). El polen del argán es penta-colpo-porado, lo que le facilita su adaptación al medio ambiente, ya que al tener cinco aperturas se incrementa su capacidad de regular los cambios de volumen como respuesta a un am-

biente muy seco y también a poder hidratarse rápidamente cuando las condiciones le son favorables.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación obtenida a través de los proyectos CA099-003 (INIA) y BMC2000-1484 (ambos del MCYT) y a la Profesora Fouzia Bani-aameur (Facultad de Ciencias Agadir, Marruecos), su ayuda en la recolección del material biológico. El Dr. Mohammed M'rani Alaoui agradece la AECL la concesión de una beca postdoctoral (2001-2003).

BIBLIOGRAFIA

- BAEHNI, C. (1948). Memories sur les Sapotacees 1. Systeme de classification. *Candola* 7:394-476.
- BIONDI, E. (1981). *Arganioxylum sardum* N. Gen., N. Sp. Et *Sclerocaryoxylon chiarugii* N. Gen., N. Sp.: Bois fossiles du Miocene de la Sardaigne (Italie). *Rev. Paleobot. Palynol.* 34:301-320.
- CARRETERO, B. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M.I. (1995). The pollen grain wall as a site for pasaje of lanthanum in tomato, *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae). *Amer. J. Bot.* 82:31-36.
- DUMAS, C.; KNOX, R.B. & GAUDE, T. (1984). Pollen-pistil recognition. New concepts from electron microscopy and cytochemistry. *Int. Rev. Cytol.* 90:239-272.
- EHRIG, F.R. (1974). Die Arganie: Charakter, Ökologie und wirtschaftliches Bedeutung eines Tertiärelktes in Morokko. *Petermanns Geogr. Mitt.* 118:117-125.
- EL MOUSADIK, A. & PETIT, R.J. (1996). High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* L. Skeels) endemic to Morocco. *Theor. Appl. Genet.* 92:832-839.
- FERNÁNDEZ, M.C. & RODRÍGUEZ-GARCÍA, M.I. (1990). Passage of lanthanum through the pollen wall of *Olea europaea* during pollen development. *Plant Cell Rep.* 8:667-761.
- FERRADOUS, A.; BANI-AAMEUR, F. & DUPUIS, P. (1997). Diversité génétique du fruit de la graine de l'arganier. In: A. BIROUK & M. RAIDALI (eds). *Ressources phylogénétiques et développement durable*, pp. 310-324. Rabat.
- FERRADOUS, A.; BANI-AAMEUR, F. & DUPUIS, P. (1996). Climastationnel, phénologie et fructification de l'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels). *Actes de l'institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II*, 17(1):51-60. Rabat.
- HESLOP-HARRISON, J. (1987). Pollen germination and pollen tube growth. *Int. Rev. Cytol.* 107:1-78.
- HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y. & SHIVANNA, K.R. (1984). The evaluation of pollen quality and a further appraisal of the flurochromatic (FCR) test procedure. *Theor. Appl. Genet.* 67:367-375.
- HESLOP-HARRISON, Y.; HESLOP-HARRISON, J.S. & HESLOP-HARRISON, J. (1986). Germination of *Corylus avellana* L. (hazel) pollen: hydration and the function of the oncus. *Acta Bot. Neerl.* 35:265-284.
- HESLOP-HARRISON, Y.; REGER, B.J. & HESLOP-HARRISON, J. (1984). "The pollen-stigma interaction in the grasses. 6. The stigma (silk) of *Zea mays* L. as host to the pollens of *Sorghum bicolor* (L.) Moench and *Pennisetum americanum* (L.) Leeke. *Acta Bot. Neerl.* 33:205-227.
- HORMAZA, J.I. & HERRERO, M. (1995). El polen como individuo interactivo. *Polen* 7:5-18.
- KNOX, R.B. (1984). Pollen-pistil interactions. In: H.F. LINSKENS & J. HESLOP-HARRISON (eds). *Encyclopedia of Plant Physiology*, 17:508-608. Springer-Verlag, Berlin.
- MOORE, P.D.; WEBB, J.A. & COLLINSON, M.E. (1991). *Pollen Analysis*. Second Edition, Blackwell Sci. Pub. Oxford.
- MORTON, J.F. & VOSS, G.L. (1987). The Argan tree (*Argania sideroylon*, Sapotaceae). A desert source of edible oil. *Econ. Bot.* 41:221-223.

- MSANDA, F.; GASQUEZ, J.; CHAUSSOD, R. & PELTIET, J.P. (1994). Polymorphisme, régime de reproduction de trois populations d'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels) endémiques du Maroc. Premiers résultats. Actes des deuxièmes journées de l'arbre, pp. 154-158. Marrakech.
- PACINI, E. & JUNIPER, B.E. (1979). The ultrastructure of pollen grain development in the olive (*Olea europaea* L.). Proteins in the pore. *New Phytol.* 83:157-164.
- PRENDERGAST, H.D. & WALKER, C.C. (1992). The argan multipurpose tree of Morocco. *The Kew Mag.* 9:76-85.
- ROWLEY, J.R. (1981). Pollen wall characters with emphasis upon applicability. *Nord. J. Bot.* 1:375-380.
- ROWLEY, J.R. (1990). The fundamental structure of the pollen exine. *Plant Syst. Evol.* 5:13-29.
- ROWLEY, J.R. & SKVARLA, J.J. (1976). Surface coating of germinal apertures of pollen and evolution of apertures. 34th *Annu. Proc. Electron Microsc. Soc. Am.*, pp. 42-43.
- SAUVAGE, CH. & VINDIT, J. (1952). Flore du Maroc analytique, descriptive et illustrée. Spermatophytes, Fascicule 1, Ericales, Primulales, Plombaginales, Ebénales et Contortales. *Trav. Inst. Scient. Chérifien.* 4:83-85.
- SHIVANNA, K.R. & JOHRI, B.M. (1985). *The angiosperm pollen, structure and function.* New Delhi, Wiley Eastern LTD.
- STANLEY, R.G. & LINSKENS, H.F. (1974). *Pollen, biology, biochemistry, management.* Springer, Berlin.
- WODEHOUSE, R.P. (1935). *Pollen Grains, their structure, identification and significance in science and medicine.* McGraw-Hill, New York.
- ZAHIDI, A.; FERRADOUS, A. & BANI-AAMEUR, F. (1996). *Morphological diversity of three argan populations (Argania spinosa (L) Skeels).* Abstract on Plant Taxonomy, pp. 82. Barcelona.

ANÁLISIS PRELIMINAR DEL PERFIL PROTEICO DEL POLEN DE VARIEDADES DE OLIVO. DIFERENCIAS EN EL CONTENIDO DEL ALERGENO OLE E 1

Jiménez-López, J.C.; Alché-Ramírez, J.D. & Rodríguez García, M.I.

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de plantas, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda 1, 18008 - Granada, España.

(Manuscrito recibido el 12 de Diciembre de 2002, aceptado el 13 de Mayo de 2003)

RESUMEN: Mediante SDS-PAGE han sido analizados los perfiles proteicos de extractos crudos de 19 variedades de polen de olivo, procedentes mayoritariamente de Andalucía. Los resultados obtenidos muestran que existe una gran variabilidad intervarietal en estos perfiles, estableciéndose fundamentalmente la presencia de diferencias cualitativas y cuantitativas en el contenido del alérgeno mayoritario Ole e 1. Así, esta proteína puede tener un papel relevante como marcador molecular para la discriminación de variedades, así como dar idea del potencial más o menos alérgico de las distintas variedades. Los test utilizados tienen una utilidad potencial en la caracterización de variedades con bajo contenido alérgico para su utilización en agricultura o con fines ornamentales.

PALABRAS CLAVE: Olivo, polen, alérgenos, Ole e 1, variedades.

SUMMARY: Protein profiles of crude pollen extracts corresponding to 19 widespread Andalusian olive cultivars were analysed by SDS-PAGE. The results obtained show a high degree of inter-varietal variability in these profiles, in which qualitative and quantitative differences, mainly concerning the amount of the major allergen Ole e 1, have been established. Thus, this protein could play an outstanding role as a molecular marker able to discriminate between cultivars, as well as to assess the allergenic potential of cultivars. The tests used here have a potential utility to characterize low-allergenic varieties for agricultural or ornamental uses.

KEY WORDS: Olive, pollen, allergen, Ole e 1, cultivars.

INTRODUCCIÓN

Hasta el momento en España se han caracterizado 262 variedades de olivo en base a esquemas pomológicos bien definidos (BARRANCO & RALLO, 1984; BARRANCO, 1997). Del mismo modo, esta identificación morfológica se está corroborando mediante técnicas básicas en las que se lleva a cabo el análisis de marcadores moleculares con objeto de rela-

cionar, identificar, distinguir y caracterizar diferentes cultivares y genotipos y para obtener información sobre el origen y la dispersión del olivo, así como para evaluar características genéticas deseables e importancia agronómica. Entre las técnicas bioquímicas se usa el análisis isoenzimático en polen (TRUJILLO *et al.*, 1995) y entre las técnicas moleculares utilizadas figuran la detección de marcadores RAPD (random amplified polymorphic DNA) (FABBRI