

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

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

Estación Experimental del Zaidín, CSIC. Granada.

(Recibido el 31 de Octubre de 1984)

**RESUMEN.** En el estadio de joven microspora, la zona de las tres aperturas del grano de *Olea europaea* presenta una diferenciación de la endexina en forma de lente biconvexa, con estructuras lamelares en su interior. La zona basal de la exina va disminuyendo hasta desaparecer en la región de las aperturas, al mismo tiempo que lo hace la parte esculpturada, que también se hace mínima en la zona central de la apertura. Durante la vacuolación de la microspora se inicia la formación de la intina, que en las aperturas adquiere forma de bolsa o casquete cargada de túbulos, formados de evaginaciones del plasmalema. El número de estos túbulos aumenta considerablemente a lo largo de la formación del grano bicelular siendo siempre su contenido poco denso. La lente biconvexa de la endexina desaparece como tal, al producirse un aumento de volumen del grano y como consecuencia de una mayor extensión de la región apertural. En la parte externa y central de la apertura se observa material fibrilar denso a los electrones. En el polen maduro los túbulos de la intina apertural dejan de estar en contacto con el plasmalema, siendo su contenido cada vez más denso a los electrones. Previa a la dehiscencia de la antera, la zona apertural está muy abultada, desapareciendo en el ápice cualquier componente de la exina. Se discuten nuestros resultados en relación con los de otros autores.

**SUMMARY.** In the stage of the young microspore of *Olea europaea*, the endexine presents a differentiation in the zone of the three apertures which is lens-shaped in form, with lamellated structure with in. The basal zone of the exine becomes thinner until it disappears, and similarly the sculptured part also becomes minimal in the central zone of the aperture. During microspore vacuolation the formation of intine starts. In the apertures the intine takes the form of a bag, loaded with tubules, which are made out of plasmalema evaginations. The number of these tubules increases during the formation of the bicellular pollen grain whose contents are always non dense. The biconvex lens on the endexine disappears as such because of the increase in grain size and as a consequence of the extension in the area of the aperture. At the outer surface of the pollen apertures fibrillar electron dense material can be observed. In the mature grain the tubules of the apertural intine lose contact with the plasmalemma and their contents become dense to electrons. Prior to the dehiscence of the anther, the zone of the apertures is very bulky and no component of the exine is present in the aperture apex. Our results are discussed in relation to those of other authors.

## INTRODUCCION

Las aperturas en los granos de polen pueden ser consideradas como modificaciones estructurales en su pared celular por donde el tubo polínico encontrará una salida en el tiempo de la germinación.

Son numerosos los trabajos sobre la ontogenia y localización de las aperturas en los primeros estadios del esporodermo (HESLOP-HARRISON, 1963; SKVARLA & LARSON, 1966; ECHLIN & GODWIN, 1968; MERPHAM, 1970). Menos atención se ha prestado a la evolución de las aperturas durante la maduración del grano de polen (CHRISTENSEN & HORNER, 1974; ROWLEY & DAHL, 1977), si bien hay algunos aspectos ultraestructurales y bioquímicos que sí han sido tratados, como son las estructuras tubulares de la intina apertural, observadas en algunas especies y la presencia de proteínas en ellas (KNOX & HESLOP-HARRISON, 1970; HESLOP-HARRISON & Col., 1973; HESLOP-HARRISON, 1975; PACINI & JUNIPER, 1979; FRANCHI & PACINI, 1980). Continuando con nuestro estudio de la pared celular del olivo, en esta segunda parte se correlaciona la formación de las aperturas con las distintas etapas de la maduración del grano de polen (microspora recién liberada de la pared de calosa, polen vacuolado unicelular, mitosis haploide, polen bicelular joven y polen maduro).

## MATERIAL Y METODOS

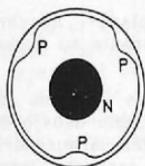
Las anteras de *Olea europaea* fueron preparadas siguiendo los métodos convencionales para microscopía, previamente descritos en el anterior trabajo (RODRIGUEZ GARCIA & FERNANDEZ, 1985).

## RESULTADOS

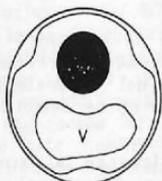
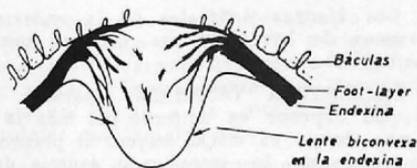
En *Olea europaea* el grano de polen tiene tres aperturas ecuatoriales y equidistantes, ya determinadas en el tiempo de tetradas, una vez terminada la meiosis. Cuando la pared especial de calosa desaparece de la tetrada las tres aperturas quedan perfectamente delimitadas en la exina. El desarrollo de la apertura corre paralelo al de la pared no aperturada del grano previamente descrita.

**JOVEN MICROSPORA.** (recién liberada de la calosa). En este estadio se observa una diferenciaci3n de la endexina en las regiones aperturales. El pasmalema presenta una depresi3n, quedando encima de 3l, un espacio poco denso a los electrones en forma de lente biconvexa (Figs. 1 y 2). Y en el que se observan lamelas muy densas a los electrones con una estructura central semejante a la unidad de membrana y an3logas en sus caracteristicas a las "white line" ya descritas en otras especies (ROWLEY & DUNBAR, 1967; HESLOP-HARRISON & HESLOP-HARRISON, 1968; NABLI, 1975a, 1975b, 1976; SEGUPTA & ROWLEY, 1974; ROWLEY & DAHL, 1977). Por encima de la endexina disminuye gradualmente la parte estructurada de la exina llegando a desaparecer la capa basal y s3lo quedan peque1as protuberancias correspondientes a los b3culos (Fig. 1 y 2).

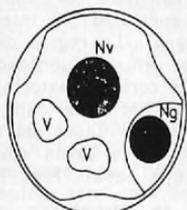
La intina a3n no ha iniciado su formaci3n, aunque comienza a detectarse una retracci3n del plasmalema con respecto a la endexina, siendo esta retracci3n m3s grande en la regi3n apertural, donde se



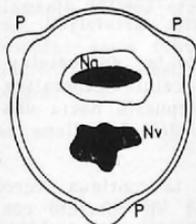
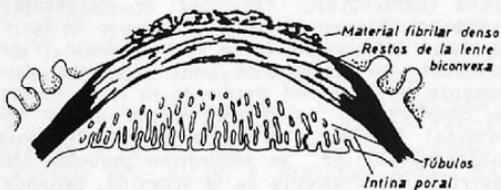
I.- Microspora joven, libre en el sáculo



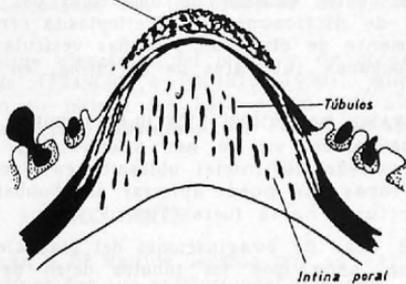
II.- Microspora vacuolada (premitosis)



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



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



Esquema sobre el desarrollo del poro en el grano de polen de *Olea Europea*

detectan unos espacios transparentes a los electrones (Fig. 2), justo donde se va a depositar el material de la intina.

Los límites laterales de la endexina diferenciados, marcan las dimensiones de las aperturas, que van aumentando durante su desarrollo (Figs. 1 y 2).

**MICROSPORA VACUOLADA.** Aparecen los primeros indicios de la intina. Su espesor es uniforme por toda la pared, excepto debajo de las aperturas donde es mucho mayor. El plasmalema continúa arqueado hacia dentro formando la intina una especie de bolsa o casquete, entre el anterior espacio en forma de lente biconvexa y el plasmalema. Simultáneamente, el plasmalema de esta región presenta delgadas evaginaciones que dan lugar a pequeños túbulos ramificados dentro de la intina (Fig. 3).

En el citoplasma de la microspora vacuolada se encuentra gran cantidad de RE, el cual forma largas cisternas agrupadas paralelamente, en las cercanías del núcleo (Fig. 4). Cerca del plasmalema se observan pequeños túbulos de RE y ribosomas, pero no se detecta una conexión directa entre estas estructuras.

**MITOSIS HAPLOIDE Y GRANO BICELULAR JOVEN** (cuando la pared de la célula generativa aún es continua con la intina del grano). Este período es el más largo en el desarrollo de la apertura. Poco a poco el plasmalema va perdiendo su curvatura hacia dentro para ponerse en un plano horizontal (Fig. 5). Se incrementa la cantidad de túbulos anastomosados entre sí, en la región de la intina apertural. El interior de estos túbulos, todavía es poco denso (Figs. 5 y 6). La región de la endexina en forma de lente biconvexa disminuye en profundidad y aumenta en longitud perdiendo su forma de lente. En cortes ecuatoriales, se observa en la parte externa de la apertura, una fina capa de material fibrilar, muy densa a los electrones. A ambos lados de esta cubierta fibrilar, se encuentran pequeñas columnas de la exina que se insertan directamente en la endexina, faltando la capa basal (Fig. 5).

En este estadio de desarrollo del polen se encuentran gran cantidad de dictiosomas en el citoplasma cercano a la región del poro. Paralelamente se observan pequeñas vesículas, de iguales dimensiones a las estructuras tubulares de la intina, en contacto con el plasmalema (Fig. 6).

**GRANO DE POLEN BICELULAR MADURO.** Cuando las dos células del grano de polen ya se han diferenciado, y la célula generativa se desplaza desde su inicial ubicación en dirección opuesta hacia una de las aperturas, se puede apreciar un abombamiento del plasmalema de la zona apertural hacia fuera (Figs. 7 y 8).

El cese de evaginaciones del plasmalema y la continua secreción de intina hace que los túbulos dejen de estar en contacto con el plasmalema aproximándose cada vez más hacia la superficie. Su contenido se hace progresivamente cada vez más denso a los electrones (Fig. 8). La región situada encima de la intina apertural (endexina diferenciada) se va haciendo más delgada, aumentando al mismo tiempo en longitud. Mientras, tanto, la masa fibrilar densa a la apertura aumenta de grosor (Fig. 8).

**DEHISCENCIA DE LA ANTERA.** Momentos previos a la dehiscencia de la antera, la zona apertural está muy abultada. En su ápice llega a desaparecer cualquier componente de la exina, que quede replegada lateralmente (Fig. 9).

## DISCUSION

En el esquema de este trabajo se resume el desarrollo de la zona apertural durante la maduración del grano de polen. El hecho de que la zona apertural evolucione durante el desarrollo del grano de polen como queda reflejado en nuestro esquema, posiblemente ha favorecido la confusión actualmente existente en cuanto a la interpretación de los diferentes componentes estructurales que la integran.

La estructura de las aperturas en *Olea europaea* es análoga a la del polen de *Artemisia vulgaris* (ROWLEY & DAHL, 1977) y de *Parietaria officinalis* (FRANCHI & PACINI, 1980). La problemática se presenta al utilizar los autores un mismo término para designar diferentes estructuras. Así ROWLEY & DAHL (1977) llaman oncus al espacio en forma de lente biconvexa de la endexina. Por el contrario otros autores, siguiendo la terminología de HYDE (1955) llaman oncus a los engrosamientos de la intina que se encuentra debajo de 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 en distintas capas de la pared del grano (exina o intina), que aparecen durante la ontogenia de la apertura. En nuestra opinión antes de proponer un nuevo término, que vendría a incrementar el número de los que ya han sido dados hasta ahora: keimhof (= centro de germinación) (ZANDER, 1935), vestíbulo (ERDTMAN, 1943), oncus (HYDE, 1954; ROWLEY & DAHL, 1977), creemos oportuno seguir utilizando el término oncus y añadir "de la exina" o "de la intina", para distinguir en que capa de la pared está localizado el engrosamiento.

Los túbulos originados por las evaginaciones del plasmalema en la intina apertural han sido descritos en otras especies (KNOX & HESLOP-HARRISON, 1975; FRANCHI & PACINI, 1980), e incluso también en *Olea europaea* (PACINI & CRESTI, 1977; PACINI & JUNIPER, 1979). Tales túbulos son considerados por los autores como lugar de almacén de proteínas gametofíticas relacionadas con los procesos de reconocimiento polen-estigma.

El carácter fuertemente alergénico del olivo y de otras especies como *Parietaria officinalis* (FRANCHI & PACINI, 1980), que también presentan estos túbulos en su intina, nos hace pensar en una posible relación entre estas estructuras tubulares, su contenido protéico y alergia.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a D<sup>a</sup> Matilde Garrido por su valiosa ayuda técnica y a D. Manuel Martínez por sus aportaciones gráficas.

## BIBLIOGRAFIA

- CHRISTENSEN, J. E. & H. T. HORNER, Jr. (1974). Pollen pore development and its spatial orientation during microsporogenesis in the grass *Sorghum bicolor*. *Amer Jour. Bot.* 61:604 - 623.
- DICKINSON, H. G. & J. HESLOP-HARRISON (1968). A common mode of depositions of the sporopollenin of sexine and nexine. *Nature (Lond.)* 213:976 - 977.

- ECHLIN, P. & H. G. GODWIN (1968). The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus foetidus*. II. Pollen grain development through the callose special wall stage. *Jour. Cell. Sci.* 3:175 - 186.
- ERDTMAN, G. (1943). An introduction to pollen analysis. Waltham, Mass.
- FRANCHI, G. G. & E. PACINI (1980). Wall projection in the vegetative cell of *Parietaria officinalis* L. pollen. *Protoplasma* 104:67 - 44.
- HESLOP-HARRISON, J. (1963). An ultrastructural study of pollen wall ontogeny in *Silene pendula*. *Grana Palynol.* 4:1 - 24.
- \_\_\_\_\_ (1975). The physiology of the pollen grain surface. *Proc. R. Soc.* 109:275 - 299.
- \_\_\_\_\_ Y. HESLOP-HARRISON, R. B. KNOX & B. HOWLETT (1973). Pollen-wall proteins: "gametophytic" and "sporophytic" fractions in the pollen walls of the Malvaceae. *Ann. Bot.* 37:403 - 412.
- KNOX, R. B. & J. HESLOP-HARRISON (1970). Pollen-wall proteins. Localization and enzymic activity. *Jour. Cell. Sci.* 6:21 - 27.
- HYDE, H. A. (1955). Oncus, a new term in pollen morphology. *New Phytol.* 54:255 - 256.
- NEPHAN, R. H. (1970). Development of the pollen grain wall: further work with *Trasdescantia bracteata*. *Protoplasma* 71:39 - 54.
- NABLI, M. A. (1975a). Mise en evidence de deux lamelles primordiales, ectexinique et endexinique, dans l'exine de quelques Labiatae. *C. R. Acad. Sci. (Paris). Serie D.* 281:251 - 253.
- \_\_\_\_\_ (1975b). Contribution á l'etude 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 & J. MULLER (Eds.). *The Evolutionary Significance of the Exine*. Linnean Society Symposium Series 1:499 - 525.
- PACINI, E. & M. CRESTI (1977). Viral particles in developing pollen grains of *Olea europaea*. *Planta* 137:1 - 4.
- \_\_\_\_\_ & B. E. JUNIPER (1979). The ultrastructure of pollen grain development in the olive (*Olea europaea*). I. Proteins in the pore. *New Phytol.* 83:157 - 163.
- RODRIGUEZ-GARCIA, M. I. & M. C. FERNANDEZ (1985). Ultraestructura y desarrollo de la pared del grano de polen (*Olea europaea*). I. Zona interapertural. *Anal. Asoc. Pal. Lengua Esp.* 2:
- ROWLEY, J. R. & A. DUMBAR (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.
- SAENZ DE RIVAS, C. (1978). *Polen y Esporas*. Blume, Madrid.
- 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.
- SKVARLA, J. J. & C. W. LARSON (1966). Fine structural studies of *Zea mays*. Pollen. I. Cell membranes and exine ontogeny. *Amer. Jour. Bot.* 53:1112 - 1125.
- ZANDER, E. (1935). *Pollengestaltung und Herkunftsbestimmung bei Blütenhönig*. Berlin.

## EXPLICACION DE LAS FIGURAS

FIGURA 1.- Apertura de joven microspora. Diferenciación de la endexina en la región de la apertura. El plasmalema (pm) se invagina hacia el citoplasma, quedando encima de él un espacio en forma de lente biconvexa (L), con un contenido grisáceo en el que se localizan unas lamelas muy densas con estructuras centrales análogas a la unidad de membrana. La intina aún no ha iniciado su formación (x20000).

FIGURA 2.- Región apertural, presentando una separación entre el plasmalema y la pared por medio de unos espacios (\*) translúcidos a los electrones (x12000).

FIGURA 3.- Apertura de una microspora vacuolada. La intina (in) ocupa un espacio en forma de bolca o casquete (Inp) debajo de la apertura. El plasmalema en esta región continua presentando una depresión hacia el citoplasma, con delgadas evaginaciones hacia la intina apertural (x14000).

FIGURA 4.- En el citoplasma de la microspora vacuolada se observan grupos de cisternas paralelas de retículo endoplásmico rugoso (RE) cerca del núcleo. Abundancia de ribosomas (ri) (x10000).

FIGURA 5.- Grano bicelular joven, con la pared (p) de la célula generativa (cg) en comunicación con la intina (in). El plasmalema de la región apertural se encuentra en un plano casi horizontal. Aumenta el número de túbulos en la intina apertural y aparentemente su contenido no difiere del resto de la intina. El engrosamiento de la endexina ha perdido su forma inicial de lente, disminuyendo en profundidad y ocupando una mayor longitud. Un material fibrilar denso (mf) está depositado en la superficie externa de la apertura (x7600).

FIGURA 6.- Dictiosomas (D) y vesículas de Golgi (v) se encuentran presentes en número elevado en el citoplasma cercano a la región apertural. Se observan vesículas en contacto con el plasmalema (flechas) (x25000).

FIGURA 7.- Grano bicelular maduro. Célula generativa en dirección de una de las aperturas. El plasmalema de la región apertural presenta un abombamiento hacia fuera (x4000).

FIGURA 8.- Grano de polen maduro. Los túbulos de la intina apertural ya no están en contacto con el plasmalema, el cual no presenta ninguna evaginación. Una capa de material de intina separa a los túbulos del plasmalema. El contenido de los túbulos ahora es denso a los electrones (x3780).

FIGURA 9.- Apertura muy abultada. La superficie externa está coronada por material fibrilar denso. A continuación se encuentra la intina apertural llena de túbulos engrosados y con un contenido muy denso. A ambos lados de la masa fibrilar densa queda la intina apertural sin ninguna capa que la proteja (doble flecha) (x39.000).

